

Carta a los Directores

Restriction fragment length polymorphism de las regiones ITS1-ITS2 como método para identificar *Candida auris*



Restriction fragment length polymorphism of ITS1-ITS2 region to identify *Candida auris*

Señores Directores:

Candida auris fue aislada por primera vez en Japón en el año 2009, como agente causal de una infección de oído⁷. Desde 2016 diversos organismos nacionales e internacionales de salud han alertado sobre la aparición y expansión de este hongo⁶.

C. auris está filogenéticamente relacionada con *Candida haemulonii* y es identificada erróneamente por técnicas bioquímicas y de proteómica⁵. La mayoría de las plataformas de diagnóstico comerciales no ofrecen una identificación fiable, por lo que *C. auris* no debería descartarse cuando un aislamiento es identificado por API[®] 20C AUX como *Rhodotorula glutinis* o *Candida sake*; por MicroScan[®] como *Candida famata*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii* o *Candida parapsilosis*; por BD Phoenix[™] como *C. haemulonii* o *Candida catenulata*; por Vitek 2[®] como *C. haemulonii*, o cuando no se obtiene una identificación por espectrómetro de masas, MALDI-TOF Vitek-MS[®] (bioMérieux)^{1,4}.

Artículos recientes sobre el brote de *C. auris* que tuvo lugar en España mencionan la posibilidad de confundir *C. auris* con *C. haemulonii* y *C. lusitanae* por MALDI-TOF Vitek-MS[®], y con *Saccharomyces cerevisiae* por métodos basados en la asimilación de azúcares como el AUXACOLOR[®]⁶. Ante la posibilidad de una incorrecta identificación, y dada la importancia de una respuesta a corto plazo sobre la presencia de *C. auris*, se explica a continuación el uso de una técnica convencional (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) para su correcta identificación. Se recopiló ocho especies (seis de ellas pertenecientes al género *Candida*) de las nueve que pueden ser confundidas con *C. auris*: *C. haemulonii*, *S. cerevisiae*, *R. glutinis*, *C. famata*, *C. sake*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*. *C. catenulata* no se aisló de ninguna muestra hospitalaria por lo que nos basamos en datos bibliográficos². Todas ellas fueron identificadas mediante MALDI-TOF Vitek-MS[®].

A partir de algunas colonias de las diferentes especies cultivadas en el medio cromogénico CAN2 (bioMérieux) para *C. albicans* se obtuvieron eluidos de ADN mediante el sistema de extracción automatizado MagCore[®]. Una vez hecha la extracción del ADN se realizó la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2, y del 5,8 S rRNA, según lo descrito por Esteve-Zarzoso et al.³. El producto obtenido fue digerido a una temperatura de 37 °C mediante las enzimas de restricción HaeIII y HinfI durante 2 h, y durante 9 h con la enzima HhaI. Una vez terminada la digestión, el producto de PCR obtenido se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% con el empleo de SYBR[®] Safe como fluoróforo. Para la realización



Figura 1. Patrón de restricción característico de *Candida auris* (1), *Candida haemulonii* (2) y *Candida lusitanae* (3).

del control interno de la técnica se incluyeron controles positivos y negativos. Como controles positivos se emplearon dos cepas de *C. auris* previamente secuenciadas en el Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia.

Mediante la amplificación fue posible diferenciar *C. auris* (401 pares de bases [pb]) de siete de las especies estudiadas; fueron indiferenciables *C. lusitanae* y *C. catenulata* debido al similar peso molecular de los fragmentos obtenidos tras la digestión (383 y 402 pb, respectivamente). Los aislamientos de *C. auris* presentaron un tamaño de 401 pb con la enzima de restricción HaeIII, dos fragmentos de 206 y 187 pb con la enzima de restricción HinfI, y dos fragmentos de aproximadamente 216 y 185 pb con la enzima de restricción HhaI (fig. 1). Todos los aislamientos estudiados presentaron patrones de restricción característicos y fácilmente diferenciables por esta técnica, excepto *C. catenulata* (tabla 1). La identificación correcta de *C. auris* puede llevarse a cabo por métodos moleculares como la secuenciación de las regiones ITS o D1-D2 y también mediante MALDI-TOF si incluye las librerías RUO.

Con los resultados obtenidos y considerando el caso falso positivo del aislamiento de *C. catenulata* (aunque el resultado fuese teórico y no real) la sensibilidad y especificidad de la técnica fueron de un 100% (intervalo de confianza [IC] del 95%: 15,8-100%) y 85,7% (IC 95%: 42,1-99,6%), respectivamente. No obstante, hay que considerar que el número de aislamientos estudiados fue muy limitado. El RFLP de las regiones ITS1/ITS2 permite la caracterización de *C. auris*, diferenciándola del resto de especies, excepto de *C. catenulata*.

Tabla 1
Patrones de restricción (fragmentos en pb) de los aislamientos estudiados

Cepa	HaeIII (pb)	Hinfl (pb)	HhaI (pb)	Total (pb)
Control <i>C. auris</i> 1	401	206 + 187	216 + 185	401
Control <i>C. auris</i> 2	401	206 + 187	216 + 185	401
<i>Rhodotorula glutinis</i>	607	210 + 123 + 117 + 90	298 + 213 + 96	607
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	311 + 229 + 172	362 + 354 + 116	363 + 333 + 134	840
<i>Candida sake</i>	450	230 + 220	250 + 200	450
<i>Candida parapsilosis</i>	401 + 105	266 + 246	295 + 225	520
<i>Candida haemulonii</i>	374	188 + 178	207 + 167	374
<i>Candida guilliermondii</i>	390 + 116 + 79	314 + 285	293 + 255	607
<i>Candida lusitanae</i>	383	194 + 181	209 + 86	383
<i>Candida catenulata</i>	402	206 + 188	217 + 185	402

pb: pares de bases.

Esta técnica puede considerarse una alternativa para aquellos laboratorios que no dispongan de los sistemas que permitan su correcta identificación.

Bibliografía

- Centers for Diseases Control. *Candida auris* Questions and Answers for Healthcare Workers; 2017. [consultado 22 May 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/qa-healthcare-workers.html>
- El-Sharoud WM, Belloch C, Peris D, Querol A. Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *J Food Sci.* 2009;74: M341-6.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:329-37.
- Mizusawa M, Miller H, Green R, Lee R, Durante M, Perkins R, et al. Can multidrug-resistant *Candida auris* be reliably identified in clinical microbiology laboratories? *J Clin Microbiol.* 2017;55:638-40.
- Ruiz AC, Moret A, Magraner A, Chouman Arcas R, Gómez Alfaro I, Lozano N, et al. Epidemiology and clinical features of the first candidaemia outbreak by *Candida auris* in a tertiary care hospital in Spain, 2017; Session: OS0588 Fungal disease epidemiology, 27th ECCMID Congress in Vienna, Austria.

- Ruiz Gaitán A, Moret A, López Hontangas J, Molina J, Alexandre López A, Cabezas A, et al. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. *Rev Iberoam Micol.* 2017;34:23-7.
- Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009;53:41-4.

Berta Pino-Calm*, Diego García Martínez de Artola,
Helena Gil-Campesino y Julia Alcoba-Flórez

Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Tenerife, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bpinocalm@gmail.com (B. Pino-Calm).

<https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.10.002>

1130-1406/

© 2018 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Aislamiento de *Hanseniaspora opuntiae* de hemocultivos de una paciente inmunodeprimida: un hallazgo infrecuente y de difícil valoración



Isolation of Hanseniaspora opuntiae from blood cultures of an immunosuppressed patient: An infrequent and difficult to assess finding

Señores Directores:

El género *Hanseniaspora* (*Kloeckera* es su forma anamórfica) comprende levaduras apiculadas de cuya patogénesis apenas existe documentación. La actual taxonomía⁵ comprende 10 especies, cuatro de las cuales (*H. opuntiae*, *H. meyeri*, *H. clermontiae* y *H. lachancei*) fueron incorporadas al género por Cadez et al.¹. *Hanseniaspora* se ha aislado de fuentes ambientales^{4,6,7}. Solo se encuentran dos artículos de 4 casos en el ser humano, con *H. uvarum* (*K. apiculata*) implicada en todos los casos. Uno se aisló de lesiones orales que guardaban similitud con las lesiones de la candidiasis oral². De los otros 3 casos, uno procede de coprocultivo y dos de lesiones ungueales, lo que se interpretó como colonización transitoria, además de sugerirse la ingestión de alimentos marinos como fuente de infección³.

Presentamos el caso de una paciente de 8 años con fiebre de 3 días, tos y mucosidad nasal en los 7 días previos, anore-

xia y taquipnea. Parámetros analíticos relevantes: hemoglobina 6,5 g/dl, leucocitos $41,57 \times 1.000/\mu\text{l}$, plaquetas $65 \times 1.000/\mu\text{l}$, blastos 21%, protrombina 52%, ácido úrico 11,31 mg/dl, bilirrubina total 2,26 mg/dl, calcio 7,64 mg/dl, LDH 856 U/l, PCR 6,54 mg/dl y PCT 1,37 ng/ml. Por un rápido empeoramiento respiratorio la paciente ingresa en cuidados intensivos con ventilación mecánica no invasiva, y ante la sospecha de neumonía atípica se añadió azitromicina (5 mg/kg/día) al tratamiento con cefepime (150 mg/kg/día) y vancomicina (40 mg/kg/día). El día siguiente a su ingreso se diagnosticó una leucemia mieloide aguda tipo M6 (LMA-M6). A las 48 h del diagnóstico se comienza con el primer ciclo de quimioterapia, lo que lleva a un nuevo deterioro respiratorio que requirió ventilación mecánica invasiva. Se comenzó un tratamiento con anfotericina B (3 mg/kg/día), cotrimoxazol (5 mg/kg/día) y amikacina (30 mg/kg/día). La paciente presentó dificultad respiratoria grave y dos neumotórax, por lo que se añadió meropenem (60 mg/kg/día) y linezolid (20 mg/kg/día) al tratamiento. Por sospecha de una neumonía fúngica se administró voriconazol (16 mg/kg/día). Las determinaciones negativas fueron las siguientes: PCR para *Aspergillus* en aspirado traqueo-bronquial, PCR para *Histoplasma*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis* en suero, cultivos de orina, exudado bronquial, líquido pleural, lavado broncoalveolar (LBA) y heces, estudio de micobacterias en líquido pleural y LBA, y PCR para virus respiratorios en LBA y aspirado nasofaríngeo. Se aisló *Staphylococcus aureus*