



Nota

Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS

Ivana Maldonado^{a,*}, Silvana Cataldi^b, Claudia Garbasz^c, Silvia Relloso^f, Pablo Striebeck^a, Liliana Guelfand^d, Laura López Moral^e y Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (RMCABA), Argentina[◇]

^a Hospital Alemán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Hospital General de Agudos C. G. Durand, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^c Hospital General de Agudos I. Pirovano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^d Hospital General de Agudos J. A. Fernández, Argentina

^e Hospital Ciudad Autónoma de Buenos Aires Cosme Argerich, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^f Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de junio de 2017

Aceptado el 26 de febrero de 2018

On-line el 3 de agosto de 2018

Palabras clave:

Candida spp.

MALDI-TOF MS

Identificación de levaduras

R E S U M E N

Antecedentes: Las infecciones fúngicas invasivas han ido aumentando y las levaduras del género *Candida* son la principal causa de las mismas. Las especies distintas de *Candida albicans* son cada vez más frecuentes y algunas pueden presentar patrones variables de sensibilidad a los antimicóticos, por lo que es importante la correcta identificación de la especie. Los métodos de identificación convencionales con los que cuentan la mayoría de los laboratorios pueden presentar inconvenientes. La espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) surgió como una alternativa a los mismos.

Objetivos: Evaluar la concordancia de los resultados de identificación de diferentes especies de *Candida* mediante dos técnicas: una convencional (galerías API) y MALDI-TOF MS.

Métodos: Se analizaron las siguientes especies y número de aislamientos: *Candida parapsilosis* (28), *Candida glabrata* (34), *Candida krusei* (24), *Candida tropicalis* (45), *Candida guilliermondii* (30), *C. albicans* (28), *Candida dubliniensis* (6), *Candida kefyr* (1) y *Candida lipolytica* (1) del cepario de RMCABA; también se utilizaron las cepas *C. parapsilosis* 22019, *C. glabrata* 90030, *C. krusei* 6258 y *C. albicans* 68548, pertenecientes a la American Type Culture Collection (ATCC). Las discrepancias en la identificación se resolvieron mediante genotipificación.

Resultados y conclusiones: La concordancia directa entre la identificación convencional y MALDI-TOF MS fue del 92,5% (186/201).

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

Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS

A B S T R A C T

Keywords:

Candida spp.

MALDI-TOF MS

Yeast identification

Background: Invasive fungal infections are increasing, and *Candida* yeasts are the main cause. Species other than *Candida albicans* are becoming more frequent, and some of them may have variable patterns of susceptibility to antifungal agents, making it important to identify them correctly. Conventional identification methods used by most laboratories may present with drawbacks. Mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as an alternative method.

Aims: The aim of this study was to evaluate the concordance of the identification, at species level, by conventional methods (API) and MALDI-TOF MS.

Methods: The following species and number of isolates were studied: *Candida parapsilosis* (28), *Candida glabrata* (34), *Candida krusei* (24), *Candida tropicalis* (45), *Candida guilliermondii* (30),

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ivanam27@gmail.com (I. Maldonado).

◇ Los componentes del grupo están relacionados en el anexo 1.

C. albicans (28), *Candida dubliniensis* (6), *Candida kefyr* (1), and *Candida lipolytica* (1) from the strain collection of Autonomous City of Buenos Aires Mycology Network (RMCABA). The strains *C. parapsilosis* 22019, *C. glabrata* 90030, *C. krusei* 6258 and *C. albicans* 68548 from the American Type Culture Collection (ATCC) were also included. Discrepancies were resolved by genotyping.

Results and conclusions: The direct concordance between the conventional identification method and MALDI-TOF MS was 92.5% (186/201).

© 2018 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

En los últimos años se ha observado un incremento en las infecciones fúngicas invasivas. Las especies de *Candida* distintas de *Candida albicans* se recuperan cada vez con más frecuencia y pueden presentar patrones variables de sensibilidad a los antifúngicos, por lo que es muy importante identificarlas correctamente^{1,5,12}.

Los métodos de identificación convencionales incluyen estudios micromorfológicos, medios cromogénicos y sistemas comerciales basados en pruebas bioquímicas. Estos presentan inconvenientes, tales como un tiempo de identificación prolongado, bases de datos limitadas e identificaciones incorrectas¹⁴. La espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) surgió como una alternativa a los mismos^{1,10}.

La mayoría de los laboratorios asistenciales de nuestro país cuenta con métodos convencionales para la identificación de levaduras de importancia clínica. El objetivo del estudio fue evaluar la concordancia en los resultados de la identificación de especies de *Candida* obtenidos por dos metodologías: una convencional (galerías API) y otra novedosa (MALDI-TOF MS).

Material y métodos

Se analizaron 197 aislamientos de *Candida*: 28 *Candida parapsilosis*, 34 *Candida glabrata*, 24 *Candida krusei*, 45 *Candida tropicalis*, 30 *Candida guilliermondii*, 28 *C. albicans*, 6 *Candida dubliniensis*, 1 *Candida kefyr* y 1 *Candida lipolytica*, provenientes de materiales clínicos; se incluyeron las cepas de la colección ATCC *C. parapsilosis* 22019, *C. glabrata* 90030, *C. krusei* 6258 y *C. albicans* 68548 (tabla 1). Todos los aislamientos fueron identificados por métodos convencionales y MALDI-TOF MS. Las discrepancias se resolvieron mediante genotipificación.

Identificación convencional

A todos los aislamientos se les realizó un estudio micromorfológico en agar harina de maíz con 1% de Tween 80 (Corn-Meal agar, Oxoid, Reino Unido) y se sembraron en agar cromogénico para levaduras (CHROMagar™ *Candida*, París, Francia). Para la identificación según el patrón de asimilación de azúcares se utilizaron las galerías API® ID 32C o API® 20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Además, se incluyeron otras pruebas bioquímicas para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*¹³.

Tabla 1
Aislamientos clínicos y cepas ATCC evaluados de especies de *Candida*

Especie según galería API	Aislamientos (n)	Cepas ATCC
Complejo <i>C. parapsilosis</i>	28	1
Complejo <i>C. glabrata</i>	34	1
<i>C. krusei</i>	24	1
<i>C. tropicalis</i>	45	
<i>C. guilliermondii</i>	30	
<i>C. albicans</i>	28	1
<i>C. dubliniensis</i>	6	
<i>C. kefyr</i>	1	
<i>C. lipolytica</i>	1	
Total	197	4

Análisis por MALDI-TOF MS

Los resultados se leyeron y analizaron por el sistema Bruker Microflex LT versión 3.1 (Bruker Daltonics, Alemania). Se consideró un score mayor o igual a 1,7 como identificación aceptable de la especie, entre 1,5 y 1,6 identificación aceptable del género, y menor o igual a 1,5 como identificación no fiable. La identificación se realizó a partir de un extendido directo de la colonia con 1 µl de ácido fórmico al 70% (Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) y 1 µl de matriz alfa-ciano-4 hidroxí-ácido cinámico (Bruker Daltonics, Alemania). Cuando los scores fueron < 1,70, se realizó el método de extracción en tubo con etanol absoluto (Sigma-Aldrich, Francia) y acetonitrilo al 100% (Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante Bruker Daltonics.

Identificación genotípica

Para cada aislamiento discordante se realizó la extracción de ADN según Silva et al.¹⁷. Se emplearon los primers universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados con ABI 3730xl (Applied Biosystems, EE. UU.). Para la identificación se empleó la herramienta BLAST y se estableció como criterio una concordancia > 97% y una cobertura de al menos el 99%.

Métodos estadísticos

Se aplicó la prueba de concordancia kappa⁸ para la estimación de la concordancia entre ambas técnicas diagnósticas, y el programa estadístico EpiDat 4.1 versión 2014 (Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, España; Organización Panamericana de la Salud; Universidad CES, Colombia; <http://dxsp.sergas.es>).

Resultados y discusión

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos con ambas metodologías. El porcentaje de acuerdo o concordancia directa entre la identificación convencional y la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) fue del 92,5% (IC del 95%: 91,64-93,43) (186 aislamientos de 201), y un índice kappa igual a 0,751 (IC del 95%: 0,633-0,869), lo que indica una buena concordancia entre ambas técnicas diagnósticas. Se observaron discrepancias con las siguientes especies y número de aislamientos: *C. parapsilosis* (3/29); *C. glabrata* (5/35); *C. krusei* (1/25); *C. tropicalis* (2/45); *C. guilliermondii* (3/30) y *C. dubliniensis* (1/6). No hubo discordancia entre los resultados obtenidos mediante secuenciación y los de MALDI-TOF MS.

Como ya ha sido publicado por otros autores, una limitación de los métodos convencionales es la incapacidad de identificar especies crípticas de los complejos *C. parapsilosis* y *C. glabrata*^{4,9,16}. Por el contrario, MALDI-TOF MS permitió diferenciar entre especies del complejo *C. parapsilosis*, como *Candida orthopsilosis* y *C. parapsilosis sensu stricto*, y las del complejo *C. glabrata*, como *Candida bracariensis*, *Candida nivariensis* y *C. glabrata sensu stricto*. La identificación

Tabla 2

Resultados de la identificación de levaduras según el método convencional (API), por técnica proteómica (MALDI-TOF MS) e identidades discrepantes confirmadas por genómica (ITS)

Especie	API (n)	MALDI-TOF MS (n)	SCORE (rango)	Identidades discrepantes con MALDI-TOF MS	ITS	
Complejo <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> <i>C. orthopsilosis</i>	29	24	1,725-2,176	3 <i>C. guilliermondii</i>	3 <i>C. guilliermondii</i>
Complejo <i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata sensu stricto</i> <i>C. bracariensis</i> <i>C. nivariensis</i>	35	28	1,795-1,901 1,89-2,321	2 <i>C. guilliermondii</i> 2 <i>C. parapsilosis</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>	2 <i>C. guilliermondii</i> 2 <i>C. parapsilosis</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>
<i>C. krusei</i>		25	24	2.159 2.101 1,982-2,424	1 <i>Magnusiomyces capitatus</i>	1 <i>Magnusiomyces capitatus</i>
<i>C. tropicalis</i>		45	43	1,707-2,282	1 <i>Lodderomyces elongisporus</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>	1 <i>Lodderomyces elongisporus</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>
<i>C. guilliermondii</i>		30	27	1,643-2,263	2 <i>C. parapsilosis</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>	2 <i>C. parapsilosis</i> 1 <i>C. lusitaniae</i>
<i>C. albicans</i>		29	29	2,021-2,258		
<i>C. dubliniensis</i>		6	5	1,796-2,034	1 <i>C. albicans</i>	1 <i>C. albicans</i>
<i>C. kefyri</i>		1	1	2,261		
<i>C. lipolytica</i>		1	1	1,96		
Total		201	186	1,643-2,424	186/201 (CS: 92.5%, K: 0.751)	

CS: porcentaje de concordancia directa; ITS: secuenciación de los espacios intergénicos; K: índice kappa; MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

de las especies crípticas de estos complejos es importante no solo desde el punto de vista epidemiológico, sino también por las posibles diferencias de sensibilidad a los antifúngicos y la virulencia de las especies que los integran⁹. Otro inconveniente que presentan los métodos convencionales es el de no poder diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, cuya importancia radica en la diferente sensibilidad al fluconazol entre ambas especies^{9,15}. En este trabajo, MALDI-TOF MS permitió identificar correctamente la levadura *Magnusiomyces capitatus*, erróneamente identificada por los métodos convencionales como *C. krusei*. Aunque *M. capitatus* es un hongo poco frecuente puede causar infecciones graves. Su identificación puede ser difícil y requerir mucho tiempo si no se cuenta con la tecnología MALDI-TOF MS^{2,7,11}.

La dificultad para identificar *C. guilliermondii* por métodos fenotípicos es bien conocida. En el presente trabajo, 3 de los 30 aislamientos de *C. guilliermondii* estaban erróneamente identificados; algunos aislamientos identificados como *C. parapsilosis* (3) y *C. glabrata* (2) por métodos convencionales resultaron ser *C. guilliermondii* por MALDI-TOF MS y secuenciación^{3,9}. Otra especie que presenta limitaciones con la metodología convencional es *C. lusitaniae*, que en este estudio fue identificada por los métodos convencionales como *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y complejo *C. glabrata*⁹. Un aislamiento identificado como *C. tropicalis* por el sistema API fue identificado por MALDI-TOF MS como *Lodderomyces elongisporus*, levadura a la que las últimas revisiones taxonómicas describen como una especie estrechamente relacionada con *C. parapsilosis*⁶. Los scores obtenidos por MALDI-TOF MS estuvieron comprendidos entre 1,643 y 2,424. *C. guilliermondii* fue la especie con scores más bajos: en 7 aislamientos de esta especie se requirió extracción en tubo y solo en un caso de estos no se llegó al score de identificación aceptable. La extracción en tubo se realizó solo en 8 ocasiones (7 *C. guilliermondii* y 1 *C. tropicalis*).

Estos resultados permiten concluir que las metodologías convencionales siguen siendo útiles para identificar en forma confiable las especies más frecuentemente aisladas de muestras clínicas, pero cuando se trata de especies de *Candida* poco comunes o raras, o especies crípticas, es importante su confirmación utilizando tecnologías como MALDI-TOF MS.

Anexo 1.

Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires:

Ana María Romeo (Hospital Penna), Mariela Schijman (Hospital Álvarez), Graciela Ponce (IREP), Laura Dufranc (Hospital Zubizarreta), Nora Franco (Hospital Piñero), Mónica López (Hospital Ramos Mejía), Ricardo Iachini (Instituto Pasteur), Rosana Pereda (Hospital P. Elizalde), Alicia Arechavala (Hospital Muñiz), Analía Fernández (Fundación Favaloro), Agustina Forastiero (Hospital Británico), Norma Fernández (Hospital de Clínicas), Andrea P. Marucco (Hospital de Agudos Santojanni), Patricia Minerini (Hospital Oftalmológico Santa Lucía), Gabriela V. Snitman (Hospital de Quemados), Adriana Sorge (Instituto de Oncología Roffo).

Bibliografía

- Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1359-65.
- Brunetti G, Visconti V, Ghezzi MC, Mantovani S, Ferretti G, Raponi G. Management and treatment of *Magnusiomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*) pleural infection in a non-neutropenic patient with posaconazole. A new therapeutic opportunity? *New Microbiol.* 2016;39:307-9.
- Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA. *Candida guilliermondii* and other species of candida misidentified as *Candida famata*: Assessment by vitek 2 DNA sequencing analysis, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in 2 global antifungal surveillance programs. *J Clin Microbiol.* 2013;51:117-24.
- Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods.* 2015;111:50-6.
- Cuenca-Estrella M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter.* 2010;23:169-76.
- De Carolis E, Hensgens LA, Vella A, Posterano B, Sanguinetti M, Senesi S, et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Med Mycol.* 2014;52:123-30.
- Desnos-Ollivier M, Blanc C, Garcia-Hermoso D, Hoinard D, Alanio A, Dromer F. Misidentification of *Saprochaete clavata* as *Magnusiomyces capitatus* in clinical isolates: Utility of internal transcribed spacer sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and importance of reliable databases. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2196-8.

8. Fleiss JL, Levin B, Cho Paik M. Statistical methods for rates and proportions. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc; 2003.
9. Galán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, et al. Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33:372–8.
10. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:635–44.
11. Kolečka A, Khayhan K, Groenewald M, Theelen B, Arabatzis M, Velegraki A, et al. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2491–500.
12. López Moral L, Tiraboschi IN, Schijman M, Bianchi M, Guelfand L, Cataldi S. Fungemias en hospitales de la Ciudad de Buenos Aires Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 2012;29:144–9.
13. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamientos de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40:211–7.
14. Relloso MS, Nieves J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF. M.S. para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Rev Argent Microbiol*. 2015;47:103–7.
15. Roberts AL, Alelew A, Iwen PC. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry to differentiate between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85:73–6.
16. Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Lovig A, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *Mycoses*. 2013;56:229–35.
17. Silva GA, Bernardi LT, Carvalho PD, Menegotto M, Valente P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz Arch Biol Technol*. 2012;55:319–27.