



Revisión

Aplicación de las técnicas de tipificación molecular al estudio de brotes hospitalarios de candidemia

Laura Judith Marcos-Zambrano^{a,b}, Pilar Escribano^{a,b,c}, Emilio Bouza^{a,b,c,d} y Jesús Guinea^{a,b,c,d,*}

^a Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^b Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES CD06/06/0058), Palma de Mallorca, España

^d Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de febrero de 2013

Aceptado el 5 de junio de 2013

On-line el 19 de junio de 2013

Palabras clave:

Candidemia

Candida

Caracterización molecular

Tipificación molecular

Genotipado

Microsatélites

Brotes hospitalarios

R E S U M E N

La candidemia es una complicación infecciosa que afecta fundamentalmente a pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos así como en otros servicios hospitalarios, y cuya mortalidad puede alcanzar el 40%. La candidemia es una infección de adquisición típicamente hospitalaria, por lo que la transmisión horizontal de *Candida* spp. puede traducirse en la aparición de brotes nosocomiales. La caracterización genotípica de los aislamientos de *Candida* causantes de candidemia puede ayudar a esclarecer el origen de la infección, detectar los servicios hospitalarios con transmisión activa y, consecuentemente, mejorar su prevención. Diversas técnicas de tipificación molecular han sido empleadas para el estudio genotípico de aislamientos de *Candida*. Las técnicas basadas en microsatélites son reproducibles y presentan un alto poder de discriminación, lo que las convierte en opciones atractivas para el estudio de brotes de candidemia. La mayor parte de los brotes han sido descritos en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, fundamentalmente en neonatos. La presente revisión pretende discutir el papel de la caracterización genotípica de aislamientos de *Candida* causantes de candidemia para el estudio de brotes hospitalarios, así como describir las poblaciones más frecuentemente afectadas por las cepas epidémicas.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia

A B S T R A C T

Candidemia is an infectious complication mainly affecting hospitalized patients, particularly those admitted to intensive care units. Patient mortality can reach up to 40%. Candidemia is typically nosocomially-acquired, and horizontal transmission of *Candida* spp. can lead to the presence of outbreaks of candidemia. Genotyping of isolates of *Candida* causing candidemia can help us to understand the source of the infection, detect the hospital wards with active *Candida* spp. transmission and, consequently, improve the prevention of the infection. Several genotyping tools have been used for the molecular characterization of *Candida* isolates involved in outbreaks of candidemia. Genotyping procedures based on microsatellites are reproducible and show a high discriminatory power. Microsatellites are recommended for the study of outbreaks of candidemia. In most hospital outbreaks of candidemia, patients admitted to intensive care units are involved, mostly neonatal patients. The role of genotyping *Candida* isolates causing candidemia for the study of nosocomial outbreaks of candidemia is reviewed, as well as the patients more commonly affected by epidemic strains.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Candidemia

Candida

Molecular characterization

Molecular typing

Genotyping

Microsatellites

Hospital outbreaks

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jguineaortega@yahoo.es (J. Guinea).

Candida agrupa a varias especies de levaduras capaces de causar un amplio espectro de infecciones, entre las que destaca la candidiasis invasiva que afecta a pacientes hospitalizados. La candidemia es la forma de candidiasis invasiva más común. *Candida* ocupa el cuarto lugar en la incidencia de infecciones del

torrente circulatorio y las cifras de candidemia oscilan entre 1,7 y 10 episodios por cada 100.000 habitantes⁶⁶. Aunque se han descrito casos de candidemia causados hasta por 17 especies de *Candida*, más del 90% de los casos se atribuyen a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*⁶⁵.

C. albicans, microorganismo habitual de la piel y mucosas del ser humano, es la principal causa de candidemia y responsable del 50% de los casos. Gracias a su capacidad para formar biopelículas puede adherirse a catéteres y otros dispositivos médicos implantables; también se ha encontrado en soluciones de nutrición parenteral y en el medio hospitalario⁶⁶. Sin embargo, se ha constatado un aumento en el número de casos de candidemia causados por otras especies de *Candida*, aunque con marcadas diferencias geográficas. *C. parapsilosis*, la segunda especie más frecuente en España y Latinoamérica^{2,6,43,61,63}, puede encontrarse en piel y mucosas. Su alta capacidad de formar biopelículas hace que sea posible encontrarla en catéteres y otros dispositivos implantables, así como persistir en el medio hospitalario; esto la convierte en un patógeno de transmisión hospitalaria por parte del personal sanitario. Su menor capacidad patogénica explica la menor tasa de mortalidad de los pacientes infectados⁸³. Por el contrario, en Estados Unidos y norte de Europa, *C. glabrata* es la segunda especie en términos de frecuencia, siendo la tercera especie encontrada en España; su incidencia parece estar aumentando⁸³.

C. tropicalis es la segunda especie más frecuentemente aislada en algunas regiones como Brasil o la región Asia-Pacífico. Es causa conocida de infecciones sistémicas en pacientes con cáncer, especialmente aquellos con leucemia, y presenta una mortalidad que oscila entre el 33 y el 90%⁸³. Por último, *C. krusei* es una especie menos frecuente, que se asocia a pacientes con neutropenia con tumores hematológicos o sólidos. Raramente se asocia la infección con el catéter. Su resistencia intrínseca al fluconazol y el uso amplio de este antifúngico como profilaxis puede explicar el aumento en las infecciones por *C. krusei*⁶⁶.

La mayor parte de los casos de candidemia aparecen durante la estancia hospitalaria del paciente⁶⁷. El carácter nosocomial de esta infección se manifiesta de forma más evidente cuando aparecen brotes hospitalarios, en los que se supone que la transmisión horizontal de *Candida* spp. juega un papel importante. En este contexto, la caracterización de los aislamientos de *Candida* responsables de candidemia puede ser útil para el estudio de brotes hospitalarios.

Rutas de adquisición de la candidemia

Infección por cepas endógenas

La presencia de *Candida* en el tubo gastrointestinal es un factor de riesgo importante para el desarrollo de candidemia en algunos pacientes⁵⁶. El sobrecrecimiento de *Candida* en el tubo digestivo tras la exposición prolongada a antibióticos de amplio espectro que reducen la microbiota bacteriana se ha asociado al desarrollo de candidemia^{23,56}. Otro factor de riesgo importante es la traslocación de cepas de *Candida* desde el intestino al torrente circulatorio, hecho que ocurre en pacientes tras cirugía abdominal o trasplante de hígado, en aquellos con pancreatitis, o en inmunodeprimidos con mucositis⁵⁸. En todas estas situaciones, la candidemia se desarrolla cuando las cepas endógenas propias del paciente acceden al torrente circulatorio por diversas razones. Por tanto, en este escenario, aunque la candidemia se diagnostique durante el ingreso hospitalario, el papel de la transmisión horizontal tiene un bajo impacto.

Infección por cepas exógenas

Gracias a la capacidad de *Candida* para formar biopelículas, esta levadura puede encontrarse en diferentes localizaciones del medio hospitalario como superficies, dispositivos médicos, soluciones de nutrición parenteral, o sustancias de naturaleza plástica como los catéteres intravasculares⁶⁶. La presencia ubicua de este microorganismo en el hospital lo predispone a acceder al torrente circulatorio de pacientes con roturas de la barrera cutánea, fundamentalmente en portadores de catéteres intravasculares. El catéter es, por tanto, un origen frecuente de candidemia^{15,58}. Hay estudios que demuestran que las manos del personal sanitario se colonizan por *Candida*; así, la manipulación del catéter por parte de estos trabajadores facilita su colonización y el posterior desarrollo de candidemia^{42,89,92}.

Es conocida la alta incidencia de candidemia por *C. parapsilosis* en neonatos, sobre todo en recién nacidos prematuros con bajo peso⁵³. Estudios en los que se ha estudiado el papel de la transmisión vertical durante el parto evidencian que tanto la colonización previa del canal vaginal de la madre como la transmisión horizontal de cepas por parte del personal sanitario juegan un papel relevante en estos pacientes^{3,12,53,84}. Por otra parte, la estancia prolongada de pacientes en unidades de cuidados intensivos es un factor de riesgo para el desarrollo de candidemia, ya que la mayoría de estos pacientes presentan factores de riesgo adicionales (tales como ser portadores de catéteres intravasculares) y además son susceptibles de infectarse por cepas exógenas, fundamentalmente de *C. parapsilosis*⁸⁸.

Resulta lógico que los brotes hospitalarios de candidemia los causen cepas exógenas adquiridas por los pacientes durante el ingreso hospitalario. La identificación de las fuentes de infección y las posibles rutas de transmisión es importante para el desarrollo de estrategias de prevención y control de esta infección⁵⁸.

Los brotes de candidemia como problema hospitalario

Aunque la candidemia es una enfermedad con elevada mortalidad, su incidencia es baja cuando se compara con otras infecciones como la neumonía o la bacteriemia^{18,30}. Por ello, un incremento en el número de casos de candidemia en relación con los habitualmente observados en una misma unidad, en un determinado periodo de tiempo, no debería pasar desapercibido.

La presencia de brotes nosocomiales de candidemia ha sido ilustrada en diversos estudios^{7,34,48}. Los pacientes involucrados en estos brotes generalmente se encuentran ingresados en unidades de cuidados intensivos, unidades postoperatorias, o unidades de neonatología, documentándose una mayor incidencia en pacientes con edades extremas (> 65 años o < 1 año)⁶⁶. Las unidades de cuidados intensivos neonatales son áreas de máximo riesgo para la aparición de brotes de candidemia, causados fundamentalmente por *C. albicans* o *C. parapsilosis*.

También se han descrito brotes en las unidades de oncohematología, donde se encuentran pacientes con alto riesgo que son frecuentemente portadores de catéteres intravasculares^{9,27,70}.

En situaciones en las que aparece un brote, sería deseable estudiar tanto los aislamientos infectantes como aquellos aislamientos ambientales recogidos en el entorno de los pacientes, incluso los provenientes de las manos del personal sanitario. Si aquellos aislamientos estudiados perteneciesen a la misma especie de *Candida*, las técnicas genotípicas serían útiles a la hora de esclarecer la fuente del brote y su posterior erradicación. La tipificación molecular es una herramienta que permite detectar cepas epidémicas, determinar los orígenes de la infección, determinar las rutas de adquisición y transmisión de dichas cepas, monitorizar la emergencia de cepas

Tabla 1Características genéticas de las principales especies de *Candida* y técnicas de tipificación descritas

Especie	Ploidia	Especies relacionadas	Técnicas de tipificación molecular específicas para cada especie
<i>C. albicans</i>	Diploide	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i> : multilocus sequence typing ¹⁴ , Southern blot con sondas CA27 y Ca3 ⁴ , short tandem repeats ^{13,16,79} y MALDI-TOF ⁷² . <i>C. dubliniensis</i> : multilocus sequence typing ⁵⁴
<i>C. tropicalis</i>	Diploide	<i>C. bracarensis</i> , <i>C. nivariensis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i>	Short tandem repeats ³² y multilocus sequence typing ⁸⁶
<i>C. glabrata</i>	Haploide		Multilocus sequence typing ²⁵ , random amplified polymorphic DNA ¹⁰ , short tandem repeats ^{1,37,40} y Southern blot con sondas Cg6 y Cg12 ⁵²
<i>C. parapsilosis</i>	Diploide		<i>C. parapsilosis</i> : short tandem repeats ^{50,78,90} , Southern blot con sonda Cp-13 ³⁶ , Rep-PCR ³³ y MALDI-TOF ⁷¹
<i>C. krusei</i>	Diploide		Short tandem repeats ⁸² , multilocus sequence typing ⁴⁵ , pulse field gel electrophoresis ⁴¹ y Southern blot con sonda CkF1, 2 ²⁰

resistentes de origen clonal, así como conocer la diversidad clonal de la población de cepas estudiada²⁹.

Sin un estudio genotípico de los aislamientos de *Candida* causantes de candidemia no es posible cuantificar la proporción de casos causada por genotipos epidémicos. En estas circunstancias, la definición de «brote de candidemia» descansa exclusivamente en la constatación de un aumento en el número de casos en una unidad hospitalaria concreta en un momento dado. Por tanto, las rutas de la infección no pueden ser trazadas.

Técnicas de caracterización genotípica de aislamientos de *Candida* spp.

Las técnicas de tipificación molecular permiten estudiar la relación genética existente entre 2 o más aislamientos de la misma especie de *Candida*. Por tanto, el paso previo al estudio genotípico es obtener una identificación precisa de la especie.

Se ha demostrado que las técnicas de identificación bioquímicas como el API ID 32C son insuficientes para discriminar entre especies relacionadas como es el caso de *C. parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* o *Candida metapsilosis*. Es deseable que se realice previamente una identificación a nivel molecular de las cepas en cuestión. Las regiones *internal transcribed spacers* (ITS) son utilizadas universalmente para la identificación de hongos. Son regiones no codificantes que separan a las regiones que codifican las subunidades 18S, 5.8S y 26S del ARN ribosómico. Se trata de un conjunto de genes multicopia dispuestos en tándem, lo que facilita su amplificación por medio de parejas de cebadores universales (ITS1 e ITS4) que resulta en un fragmento de 400 a 800 pares de bases. La secuenciación de este fragmento y su posterior comparación con secuencias depositadas en bases como GenBank permiten identificar la especie aislada⁹⁵.

La elección de la técnica genotípica a aplicar dependerá del objetivo del estudio, de la infraestructura del laboratorio y de la experiencia del personal, así como de la especie de *Candida* a estudiar. Se han desarrollado métodos de caracterización molecular para las diferentes especies de *Candida* más frecuentemente causantes de candidemia. Las características genéticas de dichas especies se resumen en la [tabla 1](#).

Idealmente, la técnica genotípica debe mostrar un alto porcentaje de tipificabilidad (definido como la capacidad para analizar todas las cepas estudiadas), debe ser estable y reproducible, en la medida de lo posible debe ser económica y poco laboriosa, debe permitir un análisis objetivo y sencillo de los resultados, y, por último, debe mostrar un alto poder discriminatorio^{29,50}.

Las técnicas de tipificación molecular pueden agruparse en base a los elementos que evalúan en 2 grandes grupos. Uno de ellos engloba las técnicas basadas en procedimientos de análisis del ADN, y el otro evalúa indirectamente la expresión genética mediante el análisis de enzimas o patrones proteicos. Las principales técnicas genotípicas descritas para la caracterización de cepas de *Candida* spp. se recogen en las [tablas 1 y 2](#).

Técnicas no basadas en el análisis de ácido desoxirribonucleico

Multilocus enzyme electrophoresis

Se ha empleado para caracterizar cepas de las principales especies de *Candida*^{21,76}. Se evalúa la variación de la movilidad electroforética de un conjunto de enzimas tras variaciones en su composición de aminoácidos, que implica cambios en la secuencia de ADN. Permite evaluar variaciones en diferentes loci, así como diferenciar entre homocigotos y heterocigotos en organismos diploides, ya que evalúan marcadores codominantes, y es altamente reproducible.

Espectrofotometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF)

En esta técnica, las células (levaduras) se mezclan con una matriz orgánica compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxinámico que se ioniza; posteriormente los iones son acelerados en un campo eléctrico y dirigidos a un detector, obteniéndose un patrón característico y específico para cada especie. La espectrofotometría de masas de desorción/ionización láser también puede tener aplicabilidad en la caracterización a nivel de subespecie tras un análisis de proyección principal de espectros, consistente en la comparación de «la huella peptídica» de cada aislamiento analizado y la evaluación de su relación construyendo un árbol filogenético⁸. Los resultados obtenidos hasta la fecha con *C. albicans*⁷² y *C. parapsilosis* son comparables a la tipificación molecular por microsatélites⁷¹.

Técnicas basadas en el análisis de ácido desoxirribonucleico mediante electroforesis

Electrophoretic karyotyping

Permite analizar los cromosomas mediante el análisis de bandas tras una electroforesis de campo pulsado. Las variaciones en los tamaños y patrones de migración se relacionan con variaciones polimórficas de los cromosomas y permiten distinguir entre cepas relacionadas. Es una técnica laboriosa, con poco poder de discriminación, por lo que se recomienda asociarla a otras técnicas de tipificación molecular²⁴.

Restriction fragment length polymorphism

En esta técnica el ADN genómico se digiere con ciertas enzimas de restricción obteniéndose fragmentos cortos. Tras la electroforesis, se comparan los patrones de bandas obtenidos. Es una técnica rápida y poco laboriosa, aunque el análisis de los patrones de bandas puede ser subjetivo y, además, no permite la evaluación de eventos microevolutivos. El análisis por *restriction fragment length polymorphism* o *electrophoretic karyotyping* puede aplicarse a cualquier especie de *Candida*⁶⁹.

Southern blot con sondas de hibridización específicas

Se trata de un análisis de enzimas de restricción donde los fragmentos obtenidos se hibridan con sondas específicas para cada

Tabla 2Fundamento, ventajas e inconvenientes de las principales técnicas empleadas para el estudio genotípico de cepas de *Candida* spp

Técnica de tipificación	Fundamento	Ventajas	Inconvenientes
Electrophoretic karyotyping	Evalúa polimorfismo intraespecie mediante comparación de patrones de migración de los cromosomas	Alto grado de discriminación	Carece de capacidad de determinar con precisión la presencia de eventos microevolutivos. Baja reproducibilidad e interpretación de resultados compleja
Random amplified polymorphic DNA	Amplificación de regiones aleatorias de ADN	Poco laboriosa y aplicable como método de rutina	Falta de estandarización de la técnica. Falta de reproducibilidad. Al utilizar cebadores poco específicos en condiciones poco exigentes se observan amplificaciones inespecíficas
Multilocus sequence typing	Se basa en la amplificación y posterior secuenciación de 6-8 genes «house-keeping» e identificación de variaciones en un único nucleótido	Alta estandarización para <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> . Comparación de secuencias entre laboratorios a través de una base de datos central (http://pubmlst.org/databases.shtml). Buena reproducibilidad	No es aplicable a especies con poca diversidad nucleotídica como <i>C. parapsilosis</i> . Dificultad para discriminar entre cepas pertenecientes a especies diploides
Southern blot con sondas específicas	Análisis de enzimas de restricción donde los fragmentos obtenidos se hibridan con sondas específicas para cada especie (Ca3 para <i>C. albicans</i> , Cp-13 para <i>C. parapsilosis</i> , Cg6 y Cg12 para <i>C. glabrata</i> y CkF1, 2 para <i>C. krusei</i>)	Reproducible. Discriminativa. Permite observar cambios microevolutivos	Requiere grandes cantidades de ADN genómico purificado. Incapacidad para distinguir heterocigotos. Subjetividad durante el análisis, ya que pueden existir bandas de hibridación débiles
Rep-PCR	Utiliza cebadores dirigidos a elementos de ADN repetitivos intercalados en ciertas regiones del genoma	Reproducible. Poco laboriosa y económica	Bajo poder discriminatorio
Microsatélites o short tandem repeats	Son marcadores constituidos por secuencias cortas de mononucleótidos a hexanucleótidos que se repiten en tándem varias veces en el genoma	Son codominantes (permiten diferenciar alelos heterocigotos) y altamente polimórficos. Permite distinguir entre microorganismos con poca variación en su secuencia. Permite evaluar eventos microevolutivos. Son reproducibles. Tienen alto poder de discriminación	Presentan homoplasia. La homología de los alelos puede no ser resultado de la herencia, sino de mutaciones, ya que las secuencias estudiadas son altamente mutantes, resultando en homoplasia

especie. Las sondas contienen secuencias repetitivas y se forman bandas de hibridación con las secuencias homólogas. Las sondas que se emplean para el análisis de *C. albicans* son CA27 y Ca3²⁵, Cp3-13 para *C. parapsilosis*³⁶, Cg6 y Cg12 para *C. glabrata*⁵², y CkF1,2 y para *C. krusei*²⁰.

Técnicas basadas en el análisis de ácido desoxirribonucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa

Random amplified polymorphic deoxyribonucleid acid

Esta técnica se ha desarrollado para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Consiste en la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN con cebadores arbitrarios, lo que genera productos de amplificación de diferente tamaño que se corresponden con un patrón específico para cada cepa. Está limitada por su baja reproducibilidad y la interpretación subjetiva de los resultados¹⁰.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragenómicos repetitivos

Se trata de una amplificación de secuencias repetitivas de regiones no codificantes del genoma, que tras electroforesis arroja un patrón de bandas usado para comparar las cepas analizadas. Tiene un poder discriminatorio moderado, es reproducible y barato, y permite caracterizar cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*^{24,33}.

Multilocus sequence typing

Consiste en la secuenciación de un conjunto de genes constitutivos o «house-keeping»⁶². Permite estudiar cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *Candida dubliniensis*. No se

puede aplicar a cepas de *C. parapsilosis* por su baja variabilidad nucleotídica, además de ser una especie aneuploide, lo que dificulta la estandarización de esta técnica⁶². Las secuencias obtenidas se pueden comparar con bases de datos que contienen secuencias disponibles on-line, lo que permite establecer comparaciones con cepas estudiadas con anterioridad^{14,62}.

Se trata de una técnica laboriosa (6 a 8 reacciones de PCR por cepa, dependiendo de cada especie). Además, la detección de heterocigotos puede ser errónea, ya que requiere un análisis exhaustivo del cromatograma en busca de dobles picos que diferencien mutaciones puntuales del ruido de fondo.

Microsatélites o short tandem repeats

Se trata de regiones cuya secuencia está formada por motivos de uno o más nucleótidos que se repiten en tándem a lo largo del genoma y cuyas regiones flanqueantes están conservadas, lo que permite el diseño de cebadores⁸¹. Los microsatélites más informativos aparecerán, preferiblemente, en regiones no codificantes por su mayor polimorfismo. Los cebadores usados para amplificar estas regiones se marcan con diferentes fluorocromos y pueden combinarse en la misma PCR, lo que permite detectar la combinación de los productos de amplificación tras una electroforesis capilar. Cada fragmento tendrá una motilidad dependiente de su peso molecular, que a su vez se corresponde con el número de repeticiones del marcador.

Los microsatélites presentan muchas ventajas, entre las cuales están su elevado polimorfismo, codominancia, reproducibilidad, facilidad de automatización y análisis objetivo de los resultados mediante el empleo de programas informáticos. Al ser marcadores

codominantes permiten la distinción entre microorganismos con poca variación en su secuencia⁸¹. Sin embargo, aunque se ha descrito que los microsátélites pueden intercambiarse entre laboratorios, el uso de diferentes equipos y condiciones de electroforesis puede alterar de manera mínima la longitud de los fragmentos de PCR. Para solventar este inconveniente, se puede realizar una calibración mediante escaleras alélicas asegurando así la reproducibilidad de resultados entre laboratorios^{31,38}.

Dos cepas se definen como idénticas cuando se observa la misma composición alélica para todos los marcadores estudiados, diferentes cuando se presentan diferencias en varios loci, o como clonalmente relacionadas cuando se constatan eventos microevolutivos. Sin embargo, actualmente no existe un consenso para la definición de cepas clonalmente relacionadas. Algunos autores definen como complejos clonales aquellos genotipos que presentan cambios en un único locus³³.

Se han desarrollado diversos microsátélites para las principales especies de *Candida*, entre las que destacan *C. albicans*^{13,16,79}, *C. parapsilosis*^{50,78,90}, *C. glabrata*^{1,37,40}, *C. tropicalis*³² y *C. krusei*⁸².

Aplicación de la tipificación molecular como herramienta para la caracterización de brotes nosocomiales causados por *Candida* spp.

Hay diversos estudios que demuestran la aplicación de las técnicas de tipificación molecular para esclarecer el origen de los brotes hospitalarios de candidemia. Los brotes descritos hasta la fecha afectan a pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos^{34,46,68,85}, unidades quirúrgicas incluyendo aquellas en las que se desarrolla cirugía cardíaca^{33,64,93} o neurocirugía⁴⁹, unidades de hematología^{17,51,60}, o unidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos⁹¹. También se han descrito brotes de candidemia en servicios pediátricos como oncología^{9,59,70}, o en las unidades de cuidados intensivos neonatales^{5,11,26,28,44,47,55,73-75,87,89,90}.

Las especies que más comúnmente causan brotes nosocomiales de candidemia son *C. albicans*^{11,44,49,64,73,85,87,93}, *C. parapsilosis*^{9,17,28,33,34,51,55,68,70,75,89,90}, *C. glabrata*^{59,91}, *C. tropicalis*^{26,46,74} y *C. krusei*⁶⁰. Recientemente se han descrito brotes por especies menos frecuentes, como *Candida pelliculosa*⁵ y otras especies de *Candida*⁴⁷.

La transmisión horizontal entre pacientes ha demostrado ser la principal vía de transmisión de *Candida* en el medio hospitalario, jugando el personal sanitario un papel relevante en la transmisión de clones. Aunque se desconoce el reservorio de cepas de *Candida* dentro del hospital, estas pueden colonizar piel, manos y uñas del personal sanitario, que a su vez actúan como vehículo de transmisión de las cepas a los pacientes^{9,11,22,44,49,73,89,90}. Sin embargo, se han propuesto otros reservorios de cepas, como las bolsas de desechos de orina en pacientes sondados⁴⁶, o las soluciones de nutrición parenteral de naturaleza lipídica que se contaminan durante su preparación o manipulación antes de ser administradas a los pacientes^{57,68,74}.

Los recién nacidos con bajo peso, al estar hospitalizados en unidades de cuidados intensivos neonatales y requerir nutrición parenteral, son un grupo de especial riesgo para el desarrollo de candidemia. Además, su manipulación frecuente por parte del personal sanitario les predispone a infectarse por cepas propias del personal de la unidad de ingreso^{73,80,89}. Las cepas de *Candida* que colonizan la piel de estos pacientes también colonizan los catéteres intravasculares y las preparaciones de nutrición parenteral que reciben, lo que les convierte en la puerta de acceso al torrente sanguíneo^{28,55}. Sin embargo, también se han descrito brotes en pacientes sin catéteres intravasculares, o en los que la infección

se originó tras el uso de productos contaminados, como ungüentos tópicos¹⁹, preparaciones de medicamentos⁹⁴ o botellas de leche⁵⁹.

El catéter es, con frecuencia, el foco de la infección en muchos pacientes con candidemia^{34,39,51,55,70,77}. En los casos en los que se ha podido estudiar el aislamiento obtenido de la sangre del paciente, junto con los aislamientos aislados del catéter y del personal sanitario, se ha demostrado que el genotipo encontrado tanto en la sangre como en el catéter se encuentra también en las manos del personal sanitario, lo que sugiere una contaminación del catéter tras su manipulación^{51,70}. No obstante, el catéter no es el único origen de la candidemia causada por cepas exógenas, puesto que se han descrito casos en los que la puerta de acceso al torrente circulatorio son las mucosas o las heridas⁶⁴.

Papel del laboratorio de microbiología en la caracterización de brotes hospitalarios de candidemia

La detección de un brote hospitalario y el esclarecimiento de su origen es esencial para evitar que aparezcan nuevos casos, y el laboratorio de microbiología tiene un papel fundamental en este sentido. La sospecha de un brote suele ser consecuencia de la observación de un número de casos de candidemia anormalmente altos en una unidad concreta. La caracterización genotípica de los aislamientos será de gran utilidad para determinar si las cepas de los pacientes involucrados pertenecen al mismo clon y, por tanto, sugieren un origen común. Detectar el origen del brote es el comienzo del final del mismo, tras la implantación de medidas correctoras. La recogida minuciosa y apropiada de los aislamientos es, quizás, el paso más importante para la caracterización genotípica. Se debe contar con los aislamientos invasivos provenientes de cada paciente involucrado. Para trazar el origen es necesario muestrear el ambiente de los pacientes (manos del personal sanitario, superficies de las habitaciones y del mobiliario, medicación sospechosa de estar infectada, etc.). Cualquier elemento susceptible de estar contaminado con los aislamientos causantes del brote debe ser examinado y muestreado. Adicionalmente, se deben incluir aislamientos de pacientes localizados en diferentes unidades para ser usados como controles. La elección de la técnica genotípica dependerá de las posibilidades del laboratorio, así como de las especies involucradas en el brote, tal y como se comentó anteriormente.

Conclusiones

Los brotes de candidemia pueden ser un problema en las unidades de ingreso de pacientes críticos, particularmente en aquellas con neonatos. A la hora de investigar un brote, es primordial conocer la relación genética entre los aislamientos involucrados. Las técnicas moleculares son útiles para estudiar el origen de los brotes; entre estas destacan los microsátélites, que permiten conocer de forma rápida, reproducible y discriminativa la relación entre cepas. En base a los estudios de tipificación realizados, se ha podido demostrar que existe transmisión cruzada de *Candida* en diversas áreas del hospital y que la vía de infección más común es la contaminación del catéter intravascular por parte del personal sanitario.

Financiación

Este estudio ha sido parcialmente financiado por el proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) con número de referencia PI11/00167.

Laura Judith Marcos-Zambrano disfruta de una beca predoctoral del FIS (FI12/00265). Pilar Escribano disfruta de un contrato posdoctoral Sara Borell del FIS (CD09/00230). Jesús Guinea disfruta de un contrato para investigadores del Sistema Nacional de Salud, programa Miguel Servet (MS09/00055).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Abbes S, Sellami H, Sellami A, Hadrich I, Amouri I, Mahfoudh N, et al. *Candida glabrata* strain relatedness by new microsatellite markers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:83–91.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2005;43:1829–35.
- Altuncu E, Bilgen H, Cerikcioglu N, Ilki A, Ulger N, Bakir M, et al. Neonatal *Candida* infections and the antifungal susceptibilities of the related *Candida* species. Mikrobiyol Bul. 2010;44:593–603.
- Anderson J, Srikantha T, Morrow B, Miyasaka SH, White TC, Agabian N, et al. Characterization and partial nucleotide sequence of the DNA fingerprinting probe Ca3 of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1993;31:1472–80.
- Aragao PA, Oshiro IC, Manrique EI, Gomes CC, Matsuo LL, Leone C, et al. *Pichia anomala* outbreak in a nursery: Exogenous source? Pediatr Infect Dis J. 2001;20:843–8.
- Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). J Clin Microbiol. 2011;49:325–34.
- Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. Molecular epidemiology of candidemia: Evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. Clin Infect Dis. 2008;47:e17–24.
- Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. Proteomics. 2013;13:788–99.
- Barchiesi F, Caggiano G, Falconi di Francesco L, Montagna MT, Barbuti S, Scalise G. Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49:269–71.
- Becker K, Badehorn D, Deiwick S, Peters G, Fegeler W. Molecular genotyping of *Candida* species with special respect to *Candida (Torulopsis) glabrata* strains by arbitrarily primed PCR. J Med Microbiol. 2000;49:575–81.
- Ben Abdeljelil J, Sagrouni F, Khammari I, Gheith S, Fathallah A, Ben Said M, et al. Investigation of a cluster of *Candida albicans* invasive candidiasis in a neonatal intensive care unit by pulsed-field gel electrophoresis. ScientificWorldJournal. 2012;2012:138989.
- Bliss JM, Basavegowda KP, Watson WJ, Sheikh AU, Ryan RM. Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. Pediatr Infect Dis J. 2008;27:231–5.
- Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. J Clin Microbiol. 2011;39:4076–81.
- Bougnoux ME, Aanensen DM, Morand S, Theraud M, Spratt BG, d'Enfert C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: Strategies, data exchange and applications. Infect Genet Evol. 2004;4:243–52.
- Bouza E, Alcalá L, Muñoz P, Martín-Rabadán P, Guembe M, Rodríguez-Créixems M, GEID and the COMIC study groups. Can microbiologists help to assess catheter involvement in candidaemic patients before removal? Clin Microbiol Infect. 2013;19:E129–35.
- Bretagne S, Costa JM, Besmond C, Carsique R, Calderone R. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. J Clin Microbiol. 1997;35:1777–80.
- Brillowska-Dabrowska A, Schon T, Pannanusorn S, Lonnbro N, Bernhoff L, Bonnedal J, et al. A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping. Scand J Infect Dis. 2009;41:135–42.
- Brown JS. Community-acquired pneumonia. Clin Med. 2012;12:538–43.
- Campbell JR, Zaccaria E, Baker CJ. Systemic candidiasis in extremely low birth weight infants receiving topical petrolatum ointment for skin care: A case-control study. Pediatrics. 2000;105:1041–5.
- Carlotti A, Grillot R, Couble A, Villard J. Typing of *Candida krusei* clinical isolates by restriction endonuclease analysis and hybridization with CkF1,2 DNA probe. J Clin Microbiol. 1994;32:1691–9.
- Caugant DA, Sandven P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. J Clin Microbiol. 1993;31:215–20.
- Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J Clin Microbiol. 2004;42:4468–72.
- Charles PE, Dalle F, Aube H, Doise JM, Quenot JP, Aho LS, et al. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: A prospective study. Intensive Care Med. 2005;31:393–400.
- Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol. 2005;54:249–58.
- Cheung LL, Hudson JB. Development of DNA probes for *Candida albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;10:171–9.
- Chowdhary A, Becker K, Fegeler W, Guignani HC, Kapoor L, Randhawa VS, et al. An outbreak of candidemia due to *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit. Mycoses. 2003;46:287–92.
- Cugno C, Cesaro S. Epidemiology, risk factors and therapy of candidemia in pediatric hematological patients. Pediatr Rep. 2012;4:e9.
- Da Silva Ruiz L, Montelli AC, Sugizaki MD, da Silva EG, de Batista GC, Moreira D, et al. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: Molecular investigation through microsatellite analysis. Rev Iberoam Micol. 2013;30:112–5.
- Dalle F, Franco N, Lopez J, Vagner O, Caillot D, Chavanet P, et al. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J Clin Microbiol. 2000;38:4554–9.
- De Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: Trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Clin Microbiol Infect. 2013;19:860–8.
- De Valk HA, Meis JF, Bretagne S, Costa JM, Lasker BA, Balajee SA, et al. Inter-laboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: Proof of concept. Clin Microbiol Infect. 2009;15:180–7.
- Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Bernede C, Robert V, Raoux D, Chachaty E, et al. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. Emerg Infect Dis. 2008;14:557–65.
- Diab-Elschahawi M, Forstner C, Hagen F, Meis JF, Lassnig AM, Presterl E, et al. Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. J Clin Microbiol. 2012;50:3422–6.
- Dizbay M, Kalkanci A, Sezer BE, Aktas F, Aydogan S, Fidan I, et al. Molecular investigation of a fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. Braz J Infect Dis. 2008;12:395–9.
- Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J Clin Microbiol. 2003;41:5709–17.
- Enger L, Joly S, Pujol C, Simonson P, Pfaller M, Soll DR. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 2001;39:658–69.
- Foulet F, Nicolas N, Eloy O, Botterel F, Gantier JC, Costa JM, et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2005;43:4574–9.
- García-Hermoso D, MacCallum DM, Lott TJ, Sampaio P, Serna MJ, Grenouillet F, et al. Multicenter collaborative study for standardization of *Candida albicans* genotyping using a polymorphic microsatellite marker. J Clin Microbiol. 2010;48:2578–81.
- Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, García-Cabrera E, Ruiz Pérez de Pipaón M, Hernández-Caballero C, Lepe-Jiménez JA. Impact on hospital mortality of catheter removal and adequate antifungal therapy in *Candida* spp. bloodstream infections. J Antimicrob Chemother. 2013;68:206–13.
- Grenouillet F, Millon L, Bart JM, Roussel S, Biot I, Didier E, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2007;45:3781–4.
- Hautala T, Ikaheimo I, Husu H, Saily M, Siitonen T, Koistinen P, et al. A cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. BMC Infect Dis. 2007;7:97.
- Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Álvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: A health care workers source. Eur J Pediatr. 2010;169:783–7.
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: Data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis. 2009;48:1695–703.
- Huang YC, Lin TY, Peng HL, Wu JH, Chang HY, Leu HS. Outbreak of *Candida albicans* fungemia in a neonatal intensive care unit. Scand J Infect Dis. 1998;30:137–42.
- Jacobsen MD, Gow NA, Maiden MC, Shaw DJ, Odds FC. Strain typing and determination of population structure of *Candida krusei* by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2007;45:317–23.
- Jang SJ, Han HL, Lee SH, Ryu SY, Chaulagain BP, Moon YL, et al. PFGE-based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: The importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. Jpn J Infect Dis. 2005;58:263–7.
- Khan ZU, Al-Sweih NA, Ahmad S, Al-Kazemi N, Khan S, Joseph L, et al. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. J Clin Microbiol. 2007;45:2025–7.
- Kuhn DM, Mikherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. Emerg Infect Dis. 2004;10:1074–81.
- Lasheras A, Rogues AM, Peyrere S, Boulard G, Bebear CM, Gachie JP, et al. *Candida albicans* outbreak in a neurosurgical intensive care unit. J Hosp Infect. 2007;65:181–2.
- Lasker B, Butler AG, Lott TJ. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group 1 clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. J Clin Microbiol. 2006;44:750–9.
- Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;30:243–9.
- Lockhart SR, Joly S, Pujol C, Sobel JD, Pfaller MA, Soll DR. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. Microbiology. 1997;143:3733–46.
- Manzoni P, Mostert M, Jacqz-Aigrain E, Stronati M, Farina D. *Candida* colonization in the nursery. J Pediatr (Rio J). 2012;88:187–90.
- McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjón E, Diogo D, Bougnoux ME, et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida*

- dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2008;46:652–64.
55. Miranda L, Rodrigues EC, Costa SF, van der Heijden IM, Dantas KC, Lobo RD, et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: A case series study. BMJ Open. 2012;2:e000992.
 56. Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienra RA, Gobara S, et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. J Hosp Infect. 2009;72:9–16.
 57. Moro ML, Maffei C, Manso E, Morace G, Polonelli L, Biavasco F. Nosocomial outbreak of systemic candidosis associated with parenteral nutrition. Infect Control Hosp Epidemiol. 1990;11:27–35.
 58. Muskett H, Shahin J, Eyres G, Harvey S, Rowan K, Harrison D. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: A systematic review. Crit Care. 2011;15:R287.
 59. Nedret Koc A, Kocagoz S, Erdem F, Gunduz Z. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. Mycoses. 2002;45:470–5.
 60. Noskin GA, Lee J, Hacek DM, Postelnick M, Reisberg BE, Stosor V, et al. Molecular typing for investigating an outbreak of *Candida krusei*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1996;26:117–23.
 61. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clin Infect Dis. 2010;51:561–70.
 62. Odds FC, Jacobsen MD. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. Eukaryot Cell. 2008;7:1075–84.
 63. Pemán J, Cantón E, Linares-Sicilia MJ, Roselló EM, Borrell N, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: A Spanish multicenter prospective survey. J Clin Microbiol. 2011;49:4158–63.
 64. Pertowski CA, Baron RC, Lasker BA, Werner SB, Jarvis WR. Nosocomial outbreak of *Candida albicans* sternal wound infections following cardiac surgery traced to a scrub nurse. J Infect Dis. 1995;172:817–22.
 65. Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. J Hosp Infect. 1995;30 Suppl:329–38.
 66. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20:133–63.
 67. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: Comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008–2009. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:561–6.
 68. Plouffe JF, Brown DG, Silva J, Eck T, Stricofv RL, Fekety FR. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia related to intravenous infusions. Arch Intern Med. 1977;137:1686–9.
 69. Poikonen E, Vuopio-Varkila J, Kaukoranta-Tolvanen SS, Sivonen A, Siren E, Ruutu P. Epidemiological typing of *Candida albicans* from bloodstream infections by restriction enzyme analysis. Scand J Infect Dis. 2001;33:140–4.
 70. Posteraro B, Bruno S, Boccia S, Ruggiero A, Sanguinetti M, Romano Spica V, et al. *Candida parapsilosis* bloodstream infection in pediatric oncology patients: Results of an epidemiologic investigation. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004;25:641–5.
 71. Pulcrano G, Roscetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:2919–28.
 72. Qian J, Cutler JE, Cole RB, Cai Y. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. Anal Bioanal Chem. 2008;392:439–49.
 73. Rodero L, Hohenfellner F, Demkura H, Pereda R, Córdoba S, Canteros C, et al. [Nosocomial transmission of *Candida albicans* in newborn infants]. Rev Argent Microbiol. 2000;32:179–84.
 74. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filioti J, et al. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: Epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. J Clin Microbiol. 2003;41:735–41.
 75. Romeo O, Delfino D, Costanzo B, Cascio A, Criseo G. Molecular characterization of Italian *Candida parapsilosis* isolates reveals the cryptic presence of the newly described species *Candida orthopsilosis* in blood cultures from newborns. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72:234–8.
 76. Rosa EA, Pereira CV, Rosa RT, Hofling JF. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50 Pt 3:1343–9.
 77. Ruiz-Díez B, Martínez V, Álvarez M, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV. Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: Long-term colonizations versus catheter-related infections. J Clin Microbiol. 1997;35:3032–6.
 78. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons KV, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. J Clin Microbiol. 2010;48:1677–82.
 79. Sampaio P, Gusmao L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, et al. New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. J Clin Microbiol. 2005;43:3869–76.
 80. Saxen H, Virtanen M, Carlson P, Hoppu K, Pohjavuori M, Vaara M, et al. Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with a high case fatality rate. Pediatr Infect Dis J. 1995;14:776–81.
 81. Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol Lett. 2006;9:615–29.
 82. Shemer R, Weissman Z, Hashman N, Kornitzer D. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. Microbiology. 2001;147:2021–8.
 83. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36:288–305.
 84. Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou ED, Christofidou M. Neonatal intensive care unit candidemia: Epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. Mycopathologia. 2012;173:219–28.
 85. Stephan F, Bah MS, Desterke C, Rezaiguia-Delclaux S, Foulet F, Duvaldestin P, et al. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. Clin Infect Dis. 2002;35:1477–83.
 86. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA, et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol. 2005;43:5593–600.
 87. Tiraboschi IN, Carnovale S, Benetucci A, Fernandez N, Kurlat I, Foccoli M, et al. *Candida albicans* outbreak in a neonatal intensive care unit. Rev Iberoam Micol. 2007;24:263–7.
 88. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21:606–25.
 89. Van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: Genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. Mycopathologia. 2007;164:287–93.
 90. Vaz C, Sampaio P, Clemons KV, Huang YC, Stevens DA, Pais C. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:159–62.
 91. Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, Vazquez MA, Sobel JD, Dmuchowski C, et al. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: An epidemiologic study. J Clin Microbiol. 1998;36:421–6.
 92. Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A. Nosocomial fungal infections: Candidemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34:213–20.
 93. Viviani MA, Cogliati M, Esposto MC, Prigitano A, Tortorano AM. Four-year persistence of a single *Candida albicans* genotype causing bloodstream infections in a surgical ward proven by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2006;44:218–21.
 94. Welbel SF, McNeil MM, Kuykendall RJ, Lott TJ, Pramanik A, Silberman R, et al. *Candida parapsilosis* bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: Epidemiologic and laboratory confirmation of a common source outbreak. Pediatr Infect Dis J. 1996;15:998–1002.
 95. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322, PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990.