



Nota

Cyberlindnera fabianii: primer aislamiento clínico en Chile

Eduardo Álvarez Duarte^{a,*} y Nicolás Cepeda^b

^a Unidad Micología, Programa Microbiología y Micología, ICBM, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile

^b Área Química Clínica, Hematología y Uroanálisis, Laboratorio Computarizado, Hospital del Salvador, Santiago de Chile, Chile

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 10 de febrero de 2021

Aceptado el 21 de abril de 2021

On-line el 21 de julio de 2021

Palabras clave:

Cyberlindnera fabianii

Levaduras

Antifúngicos

Análisis filogenético

R E S U M E N

Antecedentes: Aun cuando es considerado un agente etiológico poco usual, *Cyberlindnera (Candida) fabianii* ha sido descrita como causante de septicemia en diversos reportes en los últimos años. Su identificación dudosa o incierta al utilizar métodos como CHROMagar Candida, API® Candida, API® ID32C o VITEK® MS, resulta en una subestimación de los casos producidos por esta levadura.

Objetivos: Informar por primera vez en Chile de un aislamiento de *C. fabianii* y su identificación.

Métodos: Se utilizó la secuenciación de la región de los espaciadores internos transcritos para la identificación final de la levadura. Se evaluó su perfil de sensibilidad a los antifúngicos mediante la técnica de microdilución en caldo.

Resultados: La identificación final solo fue posible mediante la secuenciación de las regiones ITS, lo que demuestra la limitada utilidad de las técnicas convencionales en la identificación de determinadas especies. La relación filogenética de la cepa aislada con otras especies de levadura queda reflejada en un dendrograma.

Conclusiones: Las técnicas de secuenciación en la identificación de microorganismos fastidiosos o cuya identificación es dudosa con las metodologías clásicas, u otras más avanzadas como la espectrometría de masas, son imprescindibles.

© 2021 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cyberlindnera fabianii: first clinical isolate in Chile

A B S T R A C T

Keywords:

Cyberlindnera fabianii

Yeasts

Antifungal agents

Phylogenetic analysis

Background: Although considered an unusual etiological agent, *Cyberlindnera (Candida) fabianii* has been related to septicemia in several reports in recent years. Its doubtful or uncertain identification when using tests such as CHROMagar Candida, API® Candida, API® ID32C or VITEK® MS, leads to an underestimation of the cases produced by this yeast.

Aims: To report the first isolation of *C. fabianii* in Chile and its identification.

Methods: The sequencing of the internal transcribed spacer region (ITS) was performed. Antifungal susceptibility profiles were obtained by means of the broth microdilution technique.

Results: The identification was only reached by sequencing the ITS regions, which shows the limited usefulness of the conventional techniques in the identification of some yeast species. A dendrogram shows the phylogenetic relationship of the isolated strain with some other yeast species.

Conclusion: In the identification of fastidious microorganisms or microorganisms whose identification is not completely reliable when using classical or even advanced methodologies, such as mass spectrometry, sequencing techniques are essential.

© 2021 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

La enfermedad fúngica invasiva representa una amenaza constante para los pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos. El aumento en el número de casos asociados a las infecciones fúngi-

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ealvarezd@med.uchile.cl (E. Álvarez Duarte).

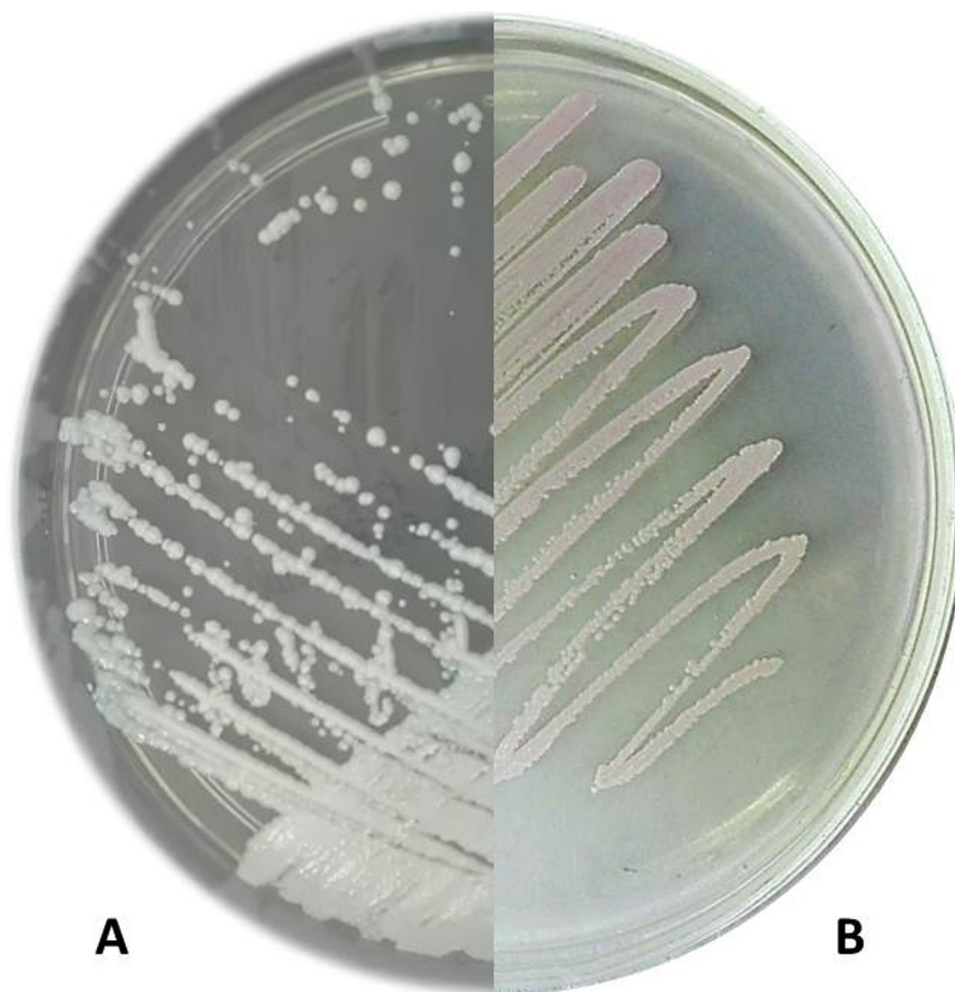


Figura 1. Crecimiento del aislamiento de *Cyberlindnera fabianii* a las 24 h a 37 °C en SDA (A) y CHROMagar Candida (B).

cas no solo contempla los hongos ya conocidos y más prevalentes, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*^{6,9}, sino que incluye a agentes etiológicos emergentes. Una de las problemáticas asociadas a estos microorganismos es la difícil identificación en el laboratorio, aun cuando se utilicen equipos de última generación basados en espectrometría de masas. Asimismo, los clásicos esquemas de identificación, basados en las características fenotípicas, evidencian su limitada resolución, básicamente por no contemplar en sus bases de datos a estos raros agentes fúngicos. El hecho de no identificar, o hacerlo erróneamente, conlleva la subestimación de estos hongos poco usuales, lo que puede tener repercusión en el aspecto epidemiológico y, sobre todo, en el aspecto terapéutico. Entre estos raros agentes se encuentra *Cyberlindnera fabianii*, una levadura perteneciente al phylum *Ascomycota*, que ha sido aislada de suelo, cañas de azúcar, aceitunas y desde el ser humano^{4,14,17}. El presente trabajo tiene como objetivo comunicar el hallazgo de *C. fabianii* en un hemocultivo por primera vez en Chile, así como su sensibilidad a los fármacos antifúngicos. Del mismo modo, demostramos una vez más la utilidad de las técnicas de biología molecular en estos casos en los que las metodologías clásicas, así como las avanzadas (no moleculares), presentan una resolución limitada.

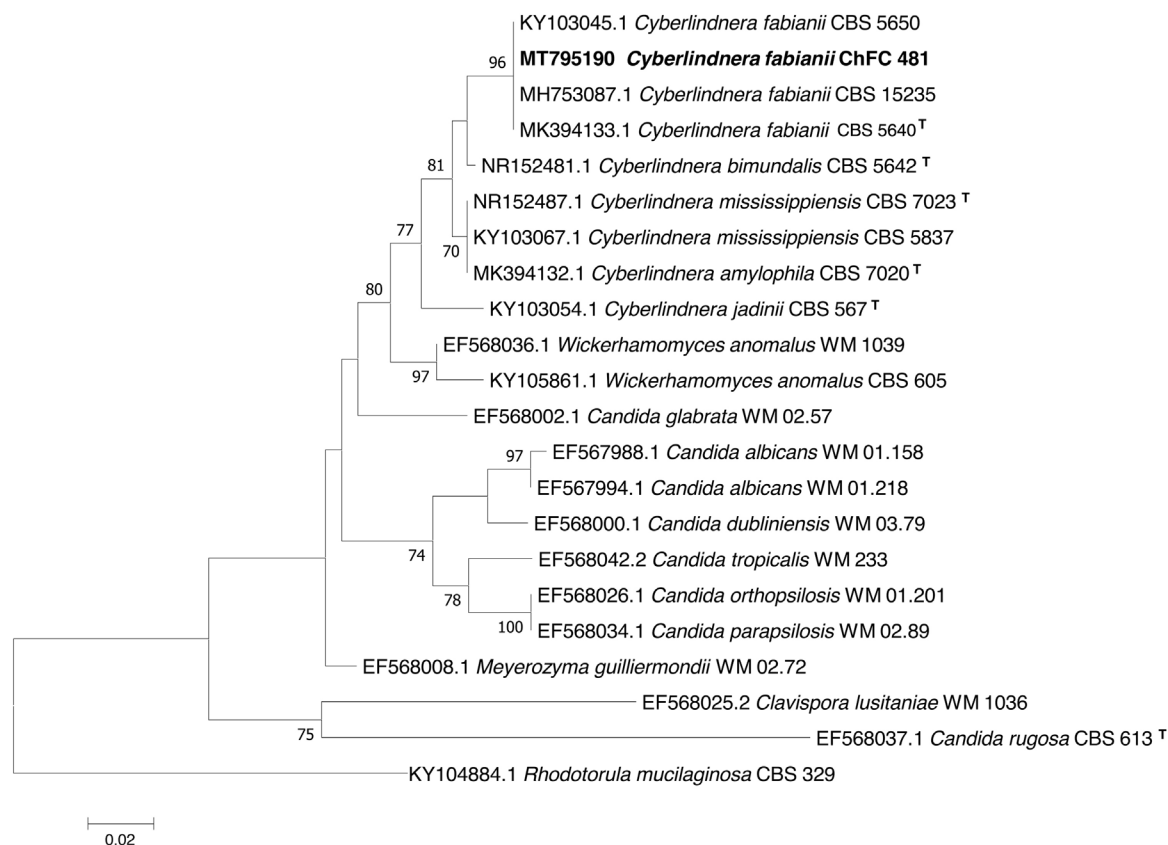
Metodología

Desde un laboratorio externo, y debido a la especialización de nuestro centro micológico, nos fue remitida la cepa de una levadura para su identificación. Las características morfológicas del

aislamiento fueron determinadas mediante el uso de BBL™ agar dextrosa Sabouraud (Becton-Dickinson, EE. UU.) y BBL™ CHROMagar Candida (Becton Dickinson); los medios fueron incubados a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, y una vez obtenidos y confirmados los cultivos puros, estos se sometieron a identificación mediante los métodos API® Candida (bioMérieux), API® ID32C (bioMérieux, Francia) y el sistema VITEK® MS (bioMérieux). Asimismo, y dadas las discrepancias, se evaluó el aislamiento mediante la técnica de producción de tubo germinal y la observación de la micromorfología según la técnica de Dalmau. En este último caso la cepa fue sembrada en BBL™ agar harina de maíz (Becton Dickinson) suplementado con Tween 80, e incubada a 30 °C durante 24–48 h.

Para la identificación molecular, el ADN fúngico se extrajo con el Mini-kit E.Z.N.A.® Fungal DNA (Omega Biotek Store, EE. UU.). La PCR para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 se realizó en un volumen de 25 µl siguiendo protocolos publicados anteriormente¹. La secuencia de la cepa fue depositada en la base de datos GenBank bajo el número MT795190. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el método de máxima verosimilitud en el software RAXML 8.0. La secuencia de *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 329 fue utilizada como grupo externo.

La prueba de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos se realizó mediante el método de microdilución en caldo de acuerdo a los documentos CLSI M27 4 ed. y M60^{7,8}. Los valores de concentración mínima inhibitoria fueron obtenidos a las 24 y 48 h. Polvos activos puros, de potencia conocida, de anfotericina B (Sigma-Aldrich),



^T: cepa tipo

Figura 2. Árbol filogenético obtenido con el análisis de las secuencias de la región ITS de la cepa ChFC 481 y de especies relacionadas mediante el método de máxima verosimilitud. En los nodos se indican los valores *bootstrap* $\geq 70\%$ en base al análisis de 1000 réplicas. En negrita se presenta la cepa de nuestro país.

voriconazol (Sigma-Aldrich), itraconazol (Sigma-Aldrich), posaconazol (Sigma-Aldrich), fluconazol (Sigma-Aldrich), caspofungina (Sigma-Aldrich), micafungina (Astellas Pharma), y anidulafungina (Pfizer) fueron utilizados para la valoración. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. El aislamiento de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 fue incluido como control de calidad.

La cepa del estudio se encuentra depositada en la colección chilena de hongos (ChFC: *Chilean Fungal Collection*), Unidad de Micología, Universidad de Chile, bajo el código ChFC 481.

Resultados

Tanto en el medio SDA como en CHROMagar *Candida* la cepa ChFC 481 creció, dando lugar a colonias levaduriformes en 24 h. Las colonias exhibieron un color blanco, eran convexas y de bordes lisos en SDA, y de color rosado pálido, convexas y lisas en el agar cromogénico (fig. 1). La prueba de producción de tubo germinal resultó negativa. En el microcultivo solo fue posible observar células levaduriformes y blastoconidias.

Con las pruebas bioquímicas API[®] *Candida* y API[®] ID32C, y con el sistema Vitek[®] MS, las identificaciones fueron inconsistentes. El método API[®] *Candida* no arrojó porcentajes de identificación, y estos fueron del 57% para la especie *Candida pelliculosa* y 42,6% para *Candida utilis* con API[®] ID32C. En el caso de Vitek[®] MS el valor de identificación arrojado fue inferior a 1,7.

La identificación molecular permitió identificar con certeza la cepa ChFC 481 como *C. fabianii*. El análisis de secuencias mostró un grado de identidad del 100% con la secuencia de la cepa tipo de *C.*

fabianii (CBS 5640). Las relaciones filogenéticas entre nuestra cepa y otros microorganismos relacionados se muestran en la figura 2.

A pesar de que tanto los puntos de corte clínicos como los puntos de corte epidemiológicos para esta especie no han sido establecidos, los perfiles de sensibilidad obtenidos mostraron que los antifúngicos más activos eran el voriconazol y la micafungina. Los valores de concentración mínima inhibitoria fueron los siguientes: anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/ml}$, itraconazol 0,25 $\mu\text{g/ml}$, voriconazol $\leq 0,03 \mu\text{g/ml}$, posaconazol 0,25 $\mu\text{g/ml}$, fluconazol 1 $\mu\text{g/ml}$, caspofungina 0,06 $\mu\text{g/ml}$, micafungina $\leq 0,03 \mu\text{g/ml}$ y anidulafungina 0,06 $\mu\text{g/ml}$.

Discusión

En el presente trabajo describimos el primer aislamiento de *C. fabianii* procedente del hemocultivo de un paciente pediátrico en nuestro país. A pesar de que este microorganismo es raramente aislado de muestras clínicas, su presencia ha ido cobrando relevancia en los últimos años, especialmente en hemocultivos provenientes de unidades de pediatría y neonatología^{12,19,20}. Lo anterior representa un problema y un desafío para el diagnóstico de laboratorio dadas las cuestionables identificaciones que arrojan los sistemas basados en pruebas bioquímicas o espectrometría de masas¹¹. En nuestro caso, tanto los perfiles de asimilación de hidratos de carbono como los perfiles proteicos obtenidos mediante los sistemas API[®] *Candida*, API[®] ID32C y VITEK[®] MS no nos permitieron identificar la levadura correctamente, obteniéndose identificaciones erróneas compatibles con *C. utilis* o *C. pelliculosa*. Lo anterior concuerda con gran parte de lo publicado, donde se habla de la errónea

identificación inicial y de la necesidad de técnicas moleculares y de secuenciación^{3,5,12} para determinar correctamente la especie. En términos generales, la identificación fenotípica y la obtenida mediante VITEK® MS presentan un rendimiento cercano al 96,1%, si bien *C. fabianii* es una de las levaduras que se encuentran en el 3,9% de las especies no identificables o de las que se obtiene una identificación errónea¹⁸. La limitación a este respecto de los métodos utilizados se debe principalmente a la ausencia de los perfiles de *C. fabianii* en las bases de datos. Lo anterior es sumamente importante, y demuestra la necesidad de los laboratorios de contar con los sistemas, programas y bases de datos siempre actualizados. Asimismo, independientemente de la metodología empleada para la identificación, las características particulares de algunas cepas (mucosidad), los errores en la metodología de procesamiento y algunos factores inherentes a los equipos pueden ser determinantes en los valores/porcentajes bajos de identificación^{2,16}.

Los valores de concentración mínima inhibitoria obtenidos con todos los antifúngicos fueron $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, y el fluconazol fue el menos activo. Estos resultados concuerdan con lo publicado previamente^{13,15}. Sin embargo, un estudio de Hamal et al. mostró la capacidad de *C. fabianii* de formar biopelículas y, además, la capacidad de desarrollar resistencia secundaria a diferentes antifúngicos¹⁰. Asimismo, el uso profiláctico de fluconazol se ha asociado con fracaso en el tratamiento en un 50% de los casos¹⁵.

A pesar de las innumerables ventajas y del innegable avance que ha representado la espectrometría de masas en los diagnósticos, debe siempre tenerse en cuenta que, como toda técnica, tiene ciertas limitaciones. La correcta identificación de *C. fabianii* requiere de técnicas moleculares. Ante casos de identificación dudosa o errónea compatibles con *C. utilis* o *C. pelliculosa* recomendamos se utilicen las técnicas moleculares disponibles. Asimismo, se debe prestar atención a los perfiles de sensibilidad, dado que terapias de larga duración podrían asociarse al desarrollo de resistencias.

Financiación

Estudio financiado con fondos propios.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen conflictos de interés que declarar.

Bibliografía

1. Alvarez E, Sanhueza C. New record of *Scedosporium dehoogii* from Chile: Phylogeny and susceptibility profiles to classic and novel putative antifungal agents. *Rev Iberoam Micol.* 2016;33:224–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.007>.
2. Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnancinski S, Ledebner NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1008–13, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05209-11>.
3. Baghdadli J, Hemarajata P, Humphries R, Kelesidis T. First report of ventriculo-peritoneal shunt infection due to *Cyberlindnera fabianii*. *Case Rep Infect Dis.* 2015;4:2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/630816>.
4. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3. vyd. 3th ed Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 215.
5. Bhally HS, Jain S, Shields C, Halsey N, Cristofalo E, Merz WG. Infection in a neonate caused by *Pichia fabianii*: importance of molecular identification. *Med Mycol.* 2006;44:185–7, <http://dx.doi.org/10.1080/13693780500160793>.
6. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *J Fungi.* 2017;3:57, <http://dx.doi.org/10.3390/jof3040057>.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. 2017.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 1st ed. CLSI document M60. 2017.
9. Duarte EA, Denning DW. Serious fungal infections in Chile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:983–6, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-017-2925-8>.
10. Hamal P, Ostransky J, Dendis M, Horváth R, Ruzicka F, Buchta V, et al. A case of endocarditis caused by the yeast *Pichia fabianii* with biofilm production and developed in vitro resistance to azoles in the course of antifungal treatment. *Sabouraudia.* 2008;46:601–5, <http://dx.doi.org/10.1080/13693780802078180>.
11. Huang YS, Wang FD, Chen YC, Huang YT, Hsieh MH, Hii M, et al. High rates of misidentification of uncommon *Candida* species causing bloodstream infections using conventional phenotypic methods. *J Formos Med Assoc.* 2021;120:1179–87, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2020.11.002>.
12. Jindal N, Arora S, Dhuria N, Arora D. *Cyberlindnera (Pichia) fabianii* infection in a neutropenic child: importance of molecular identification. *JMM case reports.* 2015;2:e000033, <http://dx.doi.org/10.1099/jmmcr.0.000033>.
13. Lee JI, Yu S, Park JS, Joo EJ, Shin JH, Kwon MJ. Successful treatment of fungemia caused by *Cyberlindnera fabianii* with anidulafungin: A case report. *Ann Clin Microbiol.* 2015;18:94–7, <http://dx.doi.org/10.5145/ACM.2015.18.3.94>.
14. Limtong S, Kaewwichian R, Yongmanitchai W, Kawasaki H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30:1785–96, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1602-7>.
15. Mlinarić-Missoni E, Hatvani L, Kocsutó S, Vágvolgyi C, Škarić I, Lukić-Grlić A. *Cyberlindnera fabianii* in the neonatal and paediatric intensive care unit. *JMM Case Reports.* 2015;2:e000032, <http://dx.doi.org/10.1099/jmmcr.0.000032>.
16. Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC microbiology.* 2017;17:25, <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-017-0937-2>.
17. Valenza G, Valenza R, Brederlau J, Frosch M, Kurzai O. Identification of *Candida fabianii* as a cause of lethal septicemia. *Mycoses.* 2006;49:331–4, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01240.x>.
18. Won EJ, Shin JH, Lee K, Kim MN, Lee HS, Park YJ, et al. Accuracy of species-level identification of yeast isolates from blood cultures from 10 university hospitals in South Korea by use of the matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based Vitek MS system. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3063–5, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00945-13>.
19. Wu Y, Wang J, Li W, Jia H, Che J, Lu J, et al. *Pichia fabianii* blood infection in a premature infant in China: Case report. *BMC research notes.* 2013;6:77, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-6-77>.
20. Yun JW, Park KS, Ki CS, Lee NY. Catheter-related bloodstream infection by *Lindnera fabianii* in a neutropenic patient. *J Med Microbiol.* 2013;62:922–5, <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.048306-0>.