



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico



Fátima Galán^a, Lidia García-Agudo^b, Inmaculada Guerrero^a, Pilar Marín^a, Ana García-Tapia^a, Pedro García-Martos^{a,*} y Manuel Rodríguez-Iglesias^a

^a Servicio de Microbiología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 11 de marzo de 2014

Aceptado el 1 de octubre de 2014

On-line el 29 de noviembre de 2014

Palabras clave:

Candida

Espectrometría de masas MALDI-TOF

Levaduras

Levaduras de interés clínico

RESUMEN

Introducción: La identificación de levaduras se basa en el estudio de las características morfológicas, bioquímicas y nutricionales, y en la utilización de métodos moleculares. La espectrometría de masas *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) constituye un nuevo método de identificación de microorganismos que ha demostrado gran utilidad. Nuestro objetivo ha sido evaluar este nuevo método en la identificación de levaduras.

Métodos: Ensayamos un total de 600 cepas aisladas de muestras clínicas pertenecientes a 9 géneros y 43 especies. La identificación se realizó mediante secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosómico, asimilación de compuestos de carbono (ID 32C) y espectrometría de masas en un espectrómetro Microflex (Bruker Daltonics GmbH, Alemania).

Resultados: Un total de 569 cepas (94,8%) fueron identificadas a nivel de especie por ID 32C, y 580 (96,7%) por MALDI-TOF. La concordancia entre ambos métodos comprendió un total de 553 cepas (92,2%), elevándose al 100% en las especies de interés clínico: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, y casi del 100% en *C. krusei*. MALDI-TOF identificó especies que precisan métodos moleculares: *Candida dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Observamos cierta irregularidad en la identificación de levaduras formadoras de artroconidias y de basidiomicetos.

Conclusión: La espectrometría de masas MALDI-TOF es un método rápido, rentable y económico que permite la identificación de la mayoría de las levaduras aisladas en clínica, así como la diferenciación de especies estrechamente relacionadas. Sería conveniente la inclusión de más especies en su base de datos para ampliar su rentabilidad.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Evaluation of mass spectrometry for the identification of clinically interesting yeasts

ABSTRACT

Introduction: Identification of yeasts is based on morphological, biochemical and nutritional characteristics, and using molecular methods. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, a new method for the identification of microorganisms, has demonstrated to be very useful. The aim of this study is to evaluate this new method in the identification of yeasts.

Methods: A total of 600 strains of yeasts isolated from clinical specimens belonging to 9 genera and 43 species were tested. Identification was made by sequencing of the ITS regions of ribosomal DNA, assimilation of carbon compounds (ID 32C), and mass spectrometry on a Microflex spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Germany).

Keywords:

Candida

MALDI-TOF mass spectrometry

Medically-important yeasts

Yeasts

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pedromartos@hotmail.com (P. García-Martos).

Results: A total of 569 strains (94.8%) were identified to species level by ID 32C, and 580 (96.7%) by MALDI-TOF. Concordance between both methods was observed for 553 strains (92.2%), with 100% in clinically relevant species: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and almost 100% in *C. krusei*. MALDI-TOF identified species requiring molecular methods: *Candida dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Some irregularities were observed in the identification of arthroconidia yeast and basidiomycetes.

Conclusion: MALDI-TOF is a rapid, effective and economic method, which enables the identification of most clinically important yeasts and the differentiation of closely related species. It would be desirable to include more species in its database to expand its performance.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Las levaduras se asocian a cuadros clínicos en los que usualmente el huésped presenta algún factor de riesgo para adquirir la infección, entre los que se incluye la alteración de la inmunidad por inhibición de los mecanismos de defensa celular o tisular, el tratamiento con fármacos inmunosupresores, antibióticos de amplio espectro, antineoplásicos y corticoides, la diabetes mellitus, las deficiencias nutricionales, la implantación de catéteres y el empleo de procedimientos quirúrgicos o terapéuticos agresivos.

Las levaduras de interés clínico pertenecen a los géneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kodamaea*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete* y *Trichosporon*. Está claramente demostrado que *Candida albicans* es la especie que se halla presente en la mayoría de las infecciones, pero el incremento de las infecciones causadas por especies no *albicans* y otros géneros considerados patógenos emergentes, con sensibilidad disminuida a los antifúngicos de uso habitual, especialmente a azoles, ha supuesto un impacto significativo en la clínica y exige una identificación correcta de los aislamientos, especialmente de los procedentes de infecciones invasoras, y realizar estudios de sensibilidad para orientar un tratamiento antimicrobiano adecuado¹⁻⁹.

La identificación de levaduras se basa en el estudio de las características morfológicas (morfotipo en medios cromogénicos, blastesis), bioquímicas (reducción de nitrato, producción de ureasa, perfil enzimático) y nutricionales (fermentación y asimilación de compuestos de carbono), que son lentos, exigen de 2 a 4 días o más en el caso de especies habituales, proporcionan a veces identificaciones erróneas por la inexperiencia en la interpretación y suelen tener limitaciones para la identificación de nuevas especies. La utilización de métodos moleculares es imprescindible para ciertas especies descritas recientemente, como *Candida dubliniensis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*¹⁰⁻¹⁴. Los métodos moleculares se basan en el análisis de los genes de las regiones genómicas del ADN ribosómico D1/D2 de la subunidad 26S, ITS1, ITS2 y 5,8S, y son muy rentables para la identificación y la diferenciación de especies pero caros y complejos para su implantación en el laboratorio clínico¹⁵⁻¹⁸.

La espectrometría de masas constituye un nuevo método para la identificación de microorganismos disponible desde hace más de 30 años, pero solo a partir de 2008 se ha aplicado para este fin en el laboratorio clínico por su rapidez, precisión y bajo costo. Actualmente se utiliza el método *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) en 2 plataformas: Bruker Daltonics GmbH (Leipzig, Alemania) y Axima-SARAMIS AnagnosTec GmbH (Potsdam, Alemania)¹⁹. Los resultados obtenidos por varios autores en la identificación de levaduras parecen excelentes²⁰⁻⁴³. El objetivo de este estudio ha sido evaluar la espectrometría de masas, en comparación con los métodos convencionales, en la identificación de una amplia variedad de especies de levaduras del género *Candida* y otros géneros, aisladas de muestras clínicas.

Material y métodos

Ensayamos un total de 600 cepas de levaduras aisladas de muestras de pacientes ambulatorios e ingresados en diversas unidades clínicas hospitalarias: 216 muestras de exudado vaginal, 184 de orina, 118 de secreciones respiratorias, 42 de sangre y 40 de otras localizaciones, incluyendo exudado cutáneo, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, catéteres y uñas. Las levaduras pertenecían a 9 géneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kodamaea*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*, *Trichosporon*) y 43 especies (tabla 1). Todas las cepas fueron identificadas por métodos convencionales, y las no pertenecientes a especies de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, un total de 363, fueron identificadas por métodos moleculares.

Identificación convencional

La identificación inicial de las cepas se llevó a cabo por pruebas convencionales: formación de tubos germinativos o blastesis, morfotipo de las colonias crecidas en el medio CHROMagar *Candida*, reducción de nitratos, en el caso de *Candida pelliculosa* y especies de *Rhodotorula*, producción de ureasa en *Candida lipolytica* y especies de *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Saprochaete* y *Trichosporon*, y perfil de asimilación de compuestos de carbono utilizando el sistema comercial ID 32C (bioMérieux, Francia).

Identificación genotípica

Se realizó, tras extracción del ADN y amplificación por PCR, mediante secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico, utilizando los *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3')^{26,44}. La secuenciación se practicó en un laboratorio externo (Secugen, Madrid), a partir de 15 µl del producto amplificado purificado y 1,5 µl del *primer* ITS1 a una concentración de 5 µM. Las secuencias se analizaron en el programa BLAST de GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)⁴⁵. Para la identificación de especies se utilizó como criterio un porcentaje de similitud $\geq 98\%$ entre la secuencia desconocida y la secuencia de la base de datos.

Identificación por espectrometría de masas

Para la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizaron cultivos puros de cada cepa en agar de Sabouraud con cloranfenicol, tras 48 h de incubación a 30-37 °C. La extracción de proteínas se realizó mediante 2 protocolos: uno con ácido fórmico y otro con etanol/ácido fórmico. Este último se utilizó únicamente en aquellas cepas en las que no se obtuvieron resultados fiables con la extracción mediante ácido fórmico. En cada grupo de análisis se utilizaron como controles cepas de *Candida albicans*.

Tabla 1
Identificación de 600 cepas de levaduras mediante asimilación de compuestos de carbono (ID 32C) y espectrometría de masas (MALDI-TOF). Porcentaje de identificación correcta entre paréntesis

Género y especie	Número de cepas	ID 32C	MALDI-TOF
Candida			
<i>C. albicans</i>	160	160 (100)	160 (100)
<i>C. dubliniensis</i>	5	0 (0)	5 (100)
<i>C. glabrata</i>	96	96 (100)	96 (100)
<i>C. nivariensis</i>	5	0 (0)	5 (100)
<i>C. parapsilosis</i>	92	92 (100)	92 (100)
<i>C. orthopsilosis</i>	4	0 (0)	4 (100)
<i>C. metapsilosis</i>	1	1 (0)	1 (100)
<i>C. tropicalis</i>	77	77 (100)	77 (100)
<i>C. krusei</i> - <i>Issatchenkia orientalis</i>	36	35 (97)	36 (100)
<i>C. lusitaniae</i> - <i>Clavispora lusitaniae</i>	17	17 (100)	17 (100)
<i>C. kefyr</i> - <i>Kluyveromyces marxianus</i>	10	10 (100)	10 (100)
<i>C. famata</i> - <i>Debaromyces hansenii</i>	7	6 (86)	5 (71)
<i>C. guilliermondii</i> - <i>Pichia guilliermondii</i>	7	7 (100)	7 (100)
<i>C. lipolytica</i> - <i>Yarrowia lipolytica</i>	6	6 (100)	6 (100)
<i>C. galli</i> - <i>Yarrowia lipolytica</i>	1	0 (0)	1 (100)
<i>C. zeylanoides</i>	4	4 (100)	3 (75)
<i>C. norvegensis</i> - <i>Pichia norvegensis</i>	2	2 (100)	2 (100)
<i>C. ciferrii</i> - <i>Trichomonascus ciferrii</i>	1	1 (100)	1 (100)
<i>C. inconspicua</i> - <i>Pichia cactophila</i>	1	0 (0)	1 (100)
<i>C. intermedia</i>	1	1 (100)	1 (100)
<i>C. haemulonii</i>	1	0 (0)	1 (100)
<i>C. lambica</i> - <i>Pichia fermentans</i>	1	1 (100)	1 (100)
<i>C. pelliculosa</i> - <i>Pichia anomala</i>	1	1 (100)	1 (100)
<i>C. pintolopesii</i> - <i>Arxiozyma telluris</i>	1	1 (100)	0 (0)
<i>C. utilis</i> - <i>Pichia jadinii</i>	1	1 (100)	1 (100)
Cryptococcus			
<i>C. neoformans</i> - <i>Filobasidiella neoformans</i>	12	12 (100)	8 (67)
<i>C. albidus</i>	3	3 (100)	1 (33)
<i>C. uniguttulatus</i> - <i>Filobasidium uniguttulatum</i>	1	1 (100)	0 (0)
<i>C. difluens</i>	1	0 (0)	1 (100)
Geotrichum			
<i>G. candidum</i> - <i>Galactomyces candidus</i>	2	2 (100)	2 (100)
<i>G. silvicola</i>	2	0 (0)	2 (100)
Kodamaea			
<i>K. ohmerii</i>	1	1 (100)	0 (0)
Pichia			
<i>Pichia farinosa</i>	1	1 (100)	0 (0)
Rhodotorula			
<i>R. mucilaginosa</i>	6	3 (50)	4 (67)
<i>R. glutinis</i>	1	1 (100)	0 (0)
Saccharomyces			
<i>S. cerevisiae</i>	11	11 (100)	11 (100)
Saprochaete			
<i>S. capitatus</i> - <i>Magnusiomyces capitatus</i>	3	3 (100)	3 (100)
Trichosporon			
<i>T. asahii</i>	6	5 (94)	4 (67)
<i>T. cutaneum</i>	4	4 (100)	3 (75)
<i>T. mucoides</i>	4	3 (75)	4 (100)
<i>T. jirovecii</i>	2	0 (0)	2 (100)
<i>T. inkin</i>	1	1 (100)	0 (0)
<i>T. dermatis</i>	1	0 (0)	1 (100)

ATCC 68548, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 90018 y *C. krusei* ATCC 6258. El análisis de los espectros proteicos se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). Los espectros fueron obtenidos en el modo lineal positivo a una frecuencia de 200 Hz sobre una proporción masa/carga de 2-20 kD, y luego fueron comparados de manera automática a partir de algoritmos integrados en el software del sistema con la base de datos Biotyper versión 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). Esta base de datos contiene los espectros de referencia de alrededor de 3.740 especies (la versión 2.0 contenía 3.476 especies) y se actualiza regularmente. Las puntuaciones de confianza en la identificación a nivel de género y especie fueron los recomendados por el fabricante: $\leq 1,7$

identificación no fiable, 1,7-2 identificación de género, > 2 identificación de género y especie.

Resultados

Del total de 600 cepas de levaduras ensayadas y de acuerdo con los resultados de la identificación genotípica, 569 cepas (94,8%) fueron identificadas correctamente a nivel de especie por asimilación de compuestos de carbono (ID 32C) y 580 (96,7%) por espectrometría de masas (MALDI-TOF), según se muestra en la [tabla 1](#). Resultados discordantes con la identificación molecular se observaron en 47 cepas ([tabla 2](#)).

Tabla 2

Identificación discordante con los métodos moleculares de 47 cepas de levaduras identificadas por asimilación de compuestos de carbono (ID 32C) y espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Secuenciación ITS	Número de cepas	ID 32C	MALDI-TOF
Candida		Candida	Candida
<i>C. dubliniensis</i>	5	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. nivariensis</i>	5	<i>C. glabrata</i>	<i>C. nivariensis</i>
<i>C. orthopsilosis</i>	4	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. metapsilosis</i>	1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
<i>C. krusei</i>	1	<i>C. valida</i>	<i>P. kudriavzevii</i>
<i>C. famata</i>	2	<i>C. guilliermondii</i>	Identificación no fiable
		<i>C. famata</i>	Identificación no fiable
<i>C. galli</i>	1	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. galli</i>
<i>C. zeylanoides</i>	1	<i>C. zeylanoides</i>	Identificación no fiable
<i>C. inconspicua</i>	1	<i>C. norvegensis</i>	<i>C. inconspicua</i>
<i>C. haemulonii</i>	1	<i>Candida</i> spp.	<i>C. haemulonii</i>
<i>C. pintolepesii</i>	1	<i>C. pintolepesii</i>	Identificación no fiable
Cryptococcus		Cryptococcus	Cryptococcus
<i>C. neoformans</i>	4	<i>C. neoformans</i>	Identificación no fiable
<i>C. albidus</i>	2	<i>C. albidus</i>	Identificación no fiable
<i>C. uniguttulatus</i>	1	<i>C. uniguttulatus</i>	Identificación no fiable
<i>C. difluens</i>	1	<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>C. difluens</i>
Geotrichum		Geotrichum	Geotrichum
<i>G. silvicola</i>	2	<i>G. candidum</i>	<i>G. silvicola</i>
Kodamaea		Kodamaea	Kodamaea
<i>K. ohmerii</i>	1	<i>K. ohmerii</i>	Identificación no fiable
Pichia		Pichia	Pichia
<i>Pichia farinosa</i>	1	<i>Pichia farinosa</i>	Identificación no fiable
Rhodotorula		Rhodotorula	Rhodotorula
<i>R. mucilaginosa</i>	3	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
		<i>R. glutinis</i>	Identificación no fiable
		<i>R. glutinis</i>	Identificación no fiable
		<i>R. glutinis</i>	Identificación no fiable
<i>R. glutinis</i>	1	Trichosporon	Trichosporon
Trichosporon	2	<i>T. asahii</i>	Identificación no fiable
<i>T. asahii</i>		<i>T. ovoides</i>	Identificación no fiable
		<i>T. cutaneum</i>	Identificación no fiable
<i>T. cutaneum</i>	1	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. mucoides</i>
<i>T. mucoides</i>	2	<i>T. mucoides</i>	<i>T. jirovecii</i>
<i>T. jirovecii</i>	1	<i>T. inkin</i>	Identificación no fiable
<i>T. inkin</i>	1	<i>T. mucoides</i>	<i>T. dermatis</i>
<i>T. dermatis</i>			
Total	47	31	20

Con el método de asimilación de compuestos de carbono fue imposible identificar aquellas especies que precisan métodos moleculares, como *Candida dubliniensis* (5 cepas incorrectamente identificadas como *C. albicans*), *C. nivariensis* (5 cepas incorrectamente identificadas como *C. glabrata*) y las especies crípticas de *C. parapsilosis* (4 cepas de *C. orthopsilosis* y una cepa de *C. metapsilosis*). Tampoco fue posible identificar una cepa de *C. galli*, identificada como *C. lipolytica*, aunque ambas especies pertenecen al mismo clado *Yarrowia lipolytica*. Este método identificó mal otras especies de *Candida* no-*albicans*, como una cepa de *C. krusei* (mal identificada como *C. valida* por asimilar el lactato), una cepa de *C. famata* (mal identificada como *C. guilliermondii* por asimilar la melibiosa), una cepa de *C. inconspicua* (identificada erróneamente como *C. norvegensis*) y una cepa de *C. haemulonii* (no identificada a nivel de especie). Tampoco se pudo identificar a nivel de especie una cepa de *Cryptococcus difluens*, 2 cepas de *Geotrichum silvicola* (identificadas como *G. candidum*), una cepa de *Trichosporon jirovecii* y una cepa de *T. dermatitis* (identificada como *T. mucoides*). Con este método se cometieron errores en la identificación de 3 cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* (identificadas como *R. glutinis*), una cepa de *Trichosporon asahii* y una cepa de *T. mucoides* (identificadas como *T. ovoides* y *T. cutaneum*, respectivamente).

Sin embargo, mediante espectrometría de masas fue posible identificar las cepas que precisan métodos moleculares: *Candida dubliniensis*, *C. nivariensis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, así como una cepa de *C. krusei* mal identificada como *C. valida* por ID 32C, que fue identificada como *Pichia kudriavzevii*, denominación antigua de su teleomorfo *Issatchenkia orientalis*. Este método no logró identificar un total de 20 cepas (3,3%): 2 de *Candida famata*, una de

C. zeylanoides, una de *C. pintolepesii*, 4 de *Cryptococcus neoformans*, 2 de *C. albidus*, una de *C. uniguttulatus*, una de *Kodamaea ohmeri*, una de *Pichia farinosa*, 2 de *Rhodotorula mucilaginosa*, una de *R. glutinis*, 2 de *Trichosporon asahii*, una de *T. cutaneum* y una de *T. inkin*, que mostraron puntuaciones inferiores a 1,7 en la extracción con ácido fórmico, y la extracción con etanol/ácido fórmico no mejoró la puntuación, a pesar de que los espectros de masas obtenidos fueron de buena calidad.

La concordancia entre ambos métodos comprendió un total de 553 cepas (92,2%), elevándose esta concordancia a un 100% en las especies de interés clínico más frecuentes: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, y casi del 100% en *C. krusei*.

Discusión

La identificación correcta y rápida de levaduras patógenas es uno de los objetivos a alcanzar para el manejo adecuado del paciente, y especialmente para el control de la infección fúngica invasora. Conociendo la variabilidad en la susceptibilidad a antifúngicos de las diferentes especies de levaduras, como la resistencia a fluconazol en *Candida glabrata*, *C. krusei*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*, la resistencia intrínseca a voriconazol en *Rhodotorula* y la resistencia intrínseca a equinocandinas en *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*⁴⁶⁻⁴⁸, la correcta identificación a nivel de especie es a menudo decisiva para tomar decisiones terapéuticas. Por todo ello, es fundamental disponer de un método rápido y preciso para la identificación de levaduras en el laboratorio clínico.

Un análisis de los resultados de nuestro estudio, que compara los métodos convencionales con la espectrometría de masas, demuestra que la asimilación de compuestos de carbono es excelente para la identificación de las especies de levaduras de importancia médica más habituales (94,8% de identificaciones correctas y 100% de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*). Sin embargo, este método no es válido para algunas especies de *Candida* no-*albicans* consideradas patógenas emergentes, como *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, para las que se precisan métodos moleculares poco asequibles para el laboratorio clínico^{10-14,49-52}. No obstante, *C. dubliniensis* puede diferenciarse de *C. albicans* por su incapacidad de crecer a 45 °C y de asimilar xilosa, pruebas no siempre concluyentes. Por otra parte, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* pueden diferenciarse de *C. glabrata* por presentar colonias de color blanco en el medio CROMagar candida y fermentar la trehalosa^{12,50}. El interés de la identificación correcta de *C. dubliniensis* en lugar de *C. albicans* radica en que el desarrollo de resistencia a fluconazol es más probable en *C. dubliniensis*⁵³. La identificación de las especies crípticas de *C. parapsilosis* es importante no solo desde el punto de vista epidemiológico, sino también por las posibles diferencias de sensibilidad a anfotericina B y equinocandinas en estas nuevas especies⁵⁴⁻⁵⁶ y la menor patogenicidad de *C. metapsilosis*^{13,57}. Igualmente, de las 2 especies crípticas de *C. glabrata*, se ha referido que *C. nivariensis* es más resistente a antifúngicos y posee la capacidad de formar biopelículas⁵².

La espectrometría de masas se ha propuesto como una alternativa a los métodos convencionales de identificación. Diversos estudios han demostrado que permite una rápida y precisa identificación de levaduras procedentes de cultivos²⁰⁻⁴³, e incluso directamente desde frascos de hemocultivos positivos⁵⁸, además de resultar económico²⁸. En comparación con los métodos convencionales, su precisión en la identificación de levaduras se ha estimado entre el 83 y el 100%, dependiendo del número y del tipo de levaduras y de la metodología, considerando siempre que un segundo ciclo de extracción y análisis aumenta el porcentaje de identificaciones correctas²⁰⁻⁴³. Así, cuando se analizan mayoritariamente cepas del género *Candida* y un número escaso de especies poco frecuentes, los resultados son mejores que cuando se analiza un número elevado de especies raras y otros géneros diferentes. La plataforma Axima-SARAMIS muestra porcentajes de identificaciones correctas ligeramente inferiores a MALDI-TOF^{25,27,30}. La versión Biotyper 3.0 utilizada en nuestro estudio para comparar los espectros dispone de una amplia base de datos que permite identificar un mayor número de especies que la versión 2.0.

Para las especies de interés clínico, la concordancia entre ambos métodos fue excelente. La identificación mediante ID 32C se apoyó a veces en las características morfológicas y bioquímicas para corroborar algunas especies, como *Candida lipolytica*, *C. pelliculosa*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*. La identificación por MALDI-TOF dependió, en parte, de la calidad de la extracción, de los espectros presentes en la base de datos y del número de espectros de la misma. A diferencia de la asimilación de compuestos de carbono, que requirió un tiempo de incubación de 24-72 h para la identificación, la espectrometría de masas pudo obtener un resultado positivo en menos de 2 h y fue capaz de identificar o diferenciar especies difíciles, como *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. inconspicua*, *C. haemulonii*, *Cryptococcus difluens*, *Geotrichum silvicola*, *Trichosporon jirovecii* y *T. dermatis*⁵⁹⁻⁶². En nuestra serie, sin embargo, no pudimos identificar *Pichia farinosa*⁶³.

Globalmente, nuestro estudio muestra resultados similares a los descritos por otros autores, aunque con algunas diferencias. Nosotros, al igual que se refleja en otras publicaciones, hemos observado cierta irregularidad en la identificación de las levaduras formadoras de artroconidias, *Geotrichum* y *Trichosporon*, y de los basidiomicetos *Cryptococcus neoformans*, *C. albidus*, *C. uniguttulatus*, *Rhodotorula*

mucilaginosa, *R. glutinis* y *Trichosporon asahii*, *T. cutaneum* y *T. inkin*. Estas levaduras están poco representadas en la literatura referente a espectrometría de masas y presentan con frecuencia fallos en la identificación, posiblemente por la particular composición de su pared celular, muy rica en azúcares, la producción de cápsula y de artroconidias, características que podrían dificultar la extracción de proteínas^{21,23,27-30,35-37,60,61}. Sin embargo, la identificación de estas especies es importante porque, a pesar de ser poco habituales en pacientes con fungemia, se describen cada vez más en clínica^{1,64-78} y han demostrado *in vitro* altas CMI a los antifúngicos usuales, incluyendo fluconazol y caspofungina^{4,9}, sin estar establecidos aún los puntos de corte para ellas.

Como técnica alternativa, MALDI-TOF nos ha permitido identificar y diferenciar correctamente algunas especies poco usuales en clínica pero de gran interés, como *Candida nivariensis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, sin necesidad de recurrir a la biología molecular, y otras especies raras aisladas ocasionalmente en infecciones fúngicas: *C. ciferrii*⁷⁹⁻⁸¹, *C. galli* (no implicada en clínica hasta el momento), *C. haemulonii*⁸²⁻⁸⁶, *C. inconspicua* (en nuestro caso y generalmente identificada como *Pichia cactophila* por MALDI-TOF^{87,88}, *C. lambica*⁸⁹, *Cryptococcus difluens* (no implicado en clínica), *Geotrichum candidum*⁹⁰⁻⁹², *G. silvicola* (no implicado en clínica y filogenéticamente relacionado con *G. candidum* y *G. bryndzae*), *Kodamaea ohmeri*⁹³, *Saprochaete capitata*⁹⁴⁻⁹⁶, *Trichosporon jirovecii* (no implicado en clínica) y *T. dermatis*^{70,71}, ambos relacionados filogenéticamente con *T. mucoides*⁷³⁻⁷⁵.

En conclusión, la espectrometría de masas MALDI-TOF es un método rápido y rentable, además de económico, que permite la identificación rutinaria de la mayoría de las levaduras aisladas en clínica, incluidas especies poco frecuentes, así como la diferenciación de especies estrechamente relacionadas y solamente diferenciables por métodos genómicos, mucho más complejos. MALDI-TOF podría ser utilizado como una alternativa a la identificación convencional de levaduras, ya que mejoraría el diagnóstico y permitiría el reconocimiento de nuevas especies implicadas en procesos clínicos. Sería conveniente la inclusión de más especies en su base de datos, especialmente de especies raras y basidiomicetos, para ampliar su rentabilidad, aunque esta base se actualiza periódicamente y la próxima versión incluirá 8 nuevos géneros y 63 nuevas especies de levaduras.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Bibliografía

- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20:133–63.
- Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. Clin Infect Dis. 2005;41:521–6.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol. 2010;36:1–53.
- Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis. 2011;11:142–51.
- Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, Guinea J, Regueiro B, García-Rodríguez J, et al. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. J Clin Microbiol. 2010;48:4200–6.
- Labbé A-C, Pépin J, Patiño C, Castonguay S, Restieri C, Laverdière M. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2009;20:45–50.
- 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.
- García-Martos P, Domínguez I, Marín P, García-Agudo R, Aoufi S, Mira J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2001;19:249–56.
- Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. J Infect. 2012;64:68–75.

10. Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:313–7.
11. Alcoba-Flórez J, Méndez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, Arévalo MP. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. J Clin Microbiol. 2005;43:4107–11.
12. Gorton RL, Jones GL, Kibbler CC, Collier S. *Candida nivariensis* isolated from a renal transplant patient with persistent candiduria. Molecular identification using ITS PCR and MALDI-TOF. Med Mycol Case Rep. 2013;2:156–8.
13. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* sp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43:284–92.
14. Pincus DH, Orega S, Chatellier S. Yeast identification — past, present, and future methods. Med Mycol. 2007;45:97–121.
15. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulion-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol. 2000;38:2302–10.
16. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2006;44:693–9.
17. Garner CD, Starr JK, McDonough PL, Altier C. Molecular identification of veterinary yeast isolates by use of sequence-based analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit. J Clin Microbiol. 2010;48:2140–6.
18. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. J Mol Diagn. 2011;13:12–22.
19. Jordana-Bluch E, Matró Català E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30:635–44.
20. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 2009;47:2912–7.
21. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. J Clin Microbiol. 2010;48:3482–6.
22. 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;17:359–65.
23. Dhiman N, Hall L, Wohlfli El SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J Clin Microbiol. 2011;49:1614–6.
24. Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73:65–7.
25. Martínez-Lamas L, Pérez del Molino ML, Pardo F, Varela E, Regueiro BJ. Espectrometría de masas *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* vs. metodología convencional en la identificación de *Candida non-albicans*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:568–72.
26. Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:304–8.
27. Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P, Hippler UC. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. Mycoses. 2012;55:276–80.
28. Sendid B, Ducoroy P, François N, Lucchi G, Spinali S, Vagner O, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. Med Mycol. 2013;51:25–32.
29. Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. J Clin Microbiol. 2013;51:2267–72.
30. Lohmann C, Sabou M, Moussaoui W, Prévost G, Delarbre JM, Candolfi E, et al. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013;51:1231–6.
31. Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, Tucci A, Cerullo M, Esposito M, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. J Microbiol Methods. 2013;94:262–6.
32. Chen JH, Yam WC, Ngan AH, Fung AM, Woo WL, Yan MK, et al. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. J Clin Microbiol. 2013;51:3981–7.
33. Usbeck JC, Kern CC, Vogel RF, Behr J. Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions. Food Microbiol. 2013;36:379–87.
34. 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.
35. 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.
36. Mancini N, de Carolis E, Infurnari L, Vella A, Clementi N, Vaccaro L, et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. J Clin Microbiol. 2013;51:2453–7.
37. Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48:900–7.
38. Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013;51:1359–66.
39. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. J Clin Microbiol. 2013;51:805–9.
40. Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Løvig 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.
41. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. Clin Microbiol Infect. 2014;20:153–8.
42. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50:3093–5.
43. Iriart X, Laverne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. J Clin Microbiol. 2012;50:2107–10.
44. White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editores. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, Inc; 1990. p. 315–22.
45. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25:3389–402.
46. Girmenia C, Pagano L, Martino B, d'Antonio D, Fanci R, Specchia G, et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: A retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. J Clin Microbiol. 2005;43:1818–28.
47. Barker KS, Rogers PD. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. Curr Infect Dis Rep. 2006;8:449–56.
48. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, et al. Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol. 2009;47:117–23.
49. Fujita S, Senda Y, Okusi T, Takada H, Yamada K, Kawano M. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. J Clin Microbiol. 2007;45:3459–61.
50. López-Soria LM, Bereciartua E, Santamaría M, Soria LM, Hernández-Almaraz JL, Mularoni A, et al. Primer caso de fungemia asociada a catéter por *Candida nivariensis* en la Península Ibérica. Rev Iberoam Micol. 2013;30:69–71.
51. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Isla G, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, et al. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: Comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. Med Mycol. 2011;49:525–9.
52. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. J Clin Microbiol. 2008;46:933–8.
53. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:617–23.
54. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1506–9.
55. Van Asbeck E, Clemons RV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62:106–9.
56. Garcia-Effron G, Canton E, Peman J, Dilger A, Roma E, Perlin DS. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. J Antimicrob Chemother. 2012;67: 2739–48.

57. Bertini A, de Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S, Tavanti A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol*. 2013;303:98–103.
58. Ferroni A, Suárez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1542–8.
59. Kubesova A, Salplachta J, Horka M, Ruzicka F, Slais K. *Candida "psilosis"* Electromigration techniques and MALDI-TOF mass spectrometry for phenotypical discrimination. *Analyst*. 2012;137:1937–43.
60. McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3050–3.
61. Posteraro B, Vella A, Cogliati M, de Carolis E, Florio AR, Posteraro P, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2472–6.
62. Quiles-Melero I, Garcia-Rodriguez J, Gomez-Lopez A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:67–71.
63. Adler A, Hidalgo-Grass C, Boekhout T, Theelen B, Sionov E, Polacheck I. *Pichia farinosa* bloodstream infection in a lymphoma patient. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3456–8.
64. Chen S, Marriott D, Playford G, Nguyen Q, Ellis D, Meyer W, et al. Candidaemia with uncommon *Candida* species: Predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:662–9.
65. Ruan SY, Chien JY, Hsueh PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical centre in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 2009;49:11–7.
66. McCurdy LH, Morrow JD. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. *South Med J*. 2001;94:65–6.
67. Monterrubio Villar J, González Velasco C, Jiménez Delgado JD. Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent, critically ill patient. *Kansenshogaku Zasshi*. 2013;87 Suppl 8:10–2.
68. Simon MS, Somersan S, Singh HK, Hartman B, Wickes BL, Jenkins SG, et al. Endocarditis caused by *Rhodotorula* infection. *J Clin Microbiol*. 2014;52:374–8.
69. Kim HA, Hyun M, Ryu SY. Catheter-Associated *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia in an immunocompetent host. *Infect Chemother*. 2013;45:339–42.
70. Diktas H, Gulec B, Baylan O, Oncul O, Turhan V, Acar A, et al. Intraabdominal abscess related fungemia caused by *Rhodotorula glutinis* in a non-neutropenic cancer patient. *Acta Clin Belg*. 2013;68:62–4.
71. Hashino S, Takahashi S, Morita R, Kanamori H, Onozawa M, Kawamura T, et al. Fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a patient with refractory Burkitt's leukemia. *Blood Res*. 2013;48:154–6.
72. Fan YM, Huang WM, Yang YP, Li W, Li SF. Primary cutaneous trichosporonosis caused by *Trichosporon dermatis* in an immunocompetent man. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65:434–6.
73. Sun W, Su J, Xu S, Yan D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *J Med Microbiol*. 2012;61:1750–7.
74. Padhi S, Dash M, Pattanaik S, Sahu S. Fungemia due to *Trichosporon mucoides* in a diabetes mellitus patient: A rare case report. *Indian J Med Microbiol*. 2014;32:72–4.
75. Chen YT, Yang WC, Chen TW, Lin CC. *Trichosporon mucoides* peritonitis in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient. *Perit Dial Int*. 2013;33:341–2.
76. Sageerabano, Malini A, Oudeacoumar P, Udayashankar C. Onychomycosis due to *Trichosporon mucoides*. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011;77:76–7.
77. De Carvalho AM, de Melo LR, Moraes VL, Neves RP. Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with Wilms' tumor. *Braz J Microbiol*. 2008;39:59–60.
78. Chang SE, Kim KJ, Lee WS, Choi JH, Sung KJ, Moon KC, et al. A case of *Trichosporon cutaneum* folliculitis and septicemia. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28:37–8.
79. Saha K, Sit NK, Maji A, Jash D. Recovery of fluconazole sensitive *Candida ciferrii* in a diabetic chronic obstructive pulmonary disease patient presenting with pneumonia. *Lung India*. 2013;30:338–40.
80. Agin H, Ayhan Y, Devrim I, Gülfidan G, Tulumoglu S, Kayserili E. Fluconazole, amphotericin-B, caspofungin, and anidulafungin resistant *Candida ciferrii*: An unknown cause of systemic mycosis in a child. *Mycopathologia*. 2011;172:237–9.
81. García-Martos P, Ruiz-Aragón J, García-Agudo L, Saldarreja A, Lozano MC, Marín P. Aislamiento de *Candida ciferrii* en un paciente inmunodeficiente. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:85–6.
82. Almeida JN Jr, Motta AL, Rossi F, Abdala E, Pierrotti LC, Kono AS, et al. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67:1229–31.
83. Crouzet J, Sotto A, Picard E, Lachaud L, Bourgeois N. A case of *Candida haemulonii* osteitis: Clinical features, biochemical characteristics, and antifungal resistance profile. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1068–70.
84. Kim S, Ko KS, Moon SY, Lee MS, Lee MY, Son JS. Catheter-related candidemia caused by *Candida haemulonii* in a patient in long-term hospital care. *J Korean Med Sci*. 2011;26:297–300.
85. Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis*. 2009;48:57–61.
86. Ruan SY, Kuo YW, Huang CT, Hsue HC, Hsueh PR. Infections due to *Candida haemulonii*: Species identification, antifungal susceptibility and outcomes. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:85–8.
87. Guitard J, Angoulvant A, Letscher-Bru V, L'ollivier C, Cornet M, Dalle F, et al. Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: Report of 12 cases and review of the literature. *Med Mycol*. 2013;51:795–9.
88. Parmeland L, Gazon M, Guerin C, Argaud L, Lehot JJ, Bastien O, et al. *Candida albicans* and non-*Candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. *Med Mycol*. 2013;51:33–7.
89. Vervaeke S, Vandamme K, Boone E, de Laere E, Swinne D, Surmont I. A case of *Candida lambica* fungemia misidentified as *Candida krusei* in an intravenous drug abuser. *Med Mycol*. 2008;46:853–6.
90. Henrich TJ, Marty FM, Milner DA Jr, Thorner AR. Disseminated *Geotrichum candidum* infection in a patient with relapsed acute myelogenous leukemia following allogeneic stem cell transplantation and review of the literature. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:458–62.
91. Bonifaz A, Vázquez-González D, Macías B, Paredes-Farrera F, Hernández MA, Araiza J, et al. Oral geotrichosis: Report of 12 cases. *J Oral Sci*. 2010;52:477–83.
92. André N, Coze C, Gentet JC, Perez R, Bernard JL. *Geotrichum candidum* septicemia in a child with hepatoblastoma. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:86.
93. García-Tapia A, García-Agudo R, Marín P, Conejo JL, García-Martos P. Fungemia por *Kodamaea (Pichia) ohmeri* asociada a cirugía. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:155–6.
94. Nedel WL, Moraes VD, Falci DR, Pasqualotto AC. *Geotrichum capitatum* fungemia: An unusual pathogen in critically-ill-related infections. *Anaesth Intensive Care*. 2013;41:685–7.
95. García-Ruiz JC, López-Soria L, Olazábal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, et al. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with hematological malignancies: Report of five cases and review of the antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30:248–55.
96. Saghrouni F, Abdeljelil JB, Youssef YB, Abdeljelil NB, Gheith S, Fathallah A, et al. *Geotrichum capitatum* septicemia in patients with acute myeloid leukemia. Report of three cases. *Med Mycol Case Rep*. 2012;1:88–90.