

Identificación de aislamientos de *Candida auris* recuperados a través de la vigilancia por laboratorio en Colombia: un reto para el diagnóstico

Silvia K. Carvajal-Valencia^{1,2}, Diana Lizarazo^{1,3}, Carolina Duarte^{1,4}, Patricia Escandon^{1,5,*}

Resumen

Objetivo: Comparar los resultados obtenidos de diferentes sistemas de identificación de *C. auris*.

Métodos: Análisis descriptivo con datos recopilados durante 2016-19 mediante la vigilancia nacional. Se evaluaron los resultados generados por los sistemas MicroScan, Phoenix BD, VITEK 2 y MALDI-TOF MS de instituciones hospitalarias de 843 aislamientos clínicos sospechosos de *C. auris* remitidos al INS y se compararon con los resultados generados de confirmación a través de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) o PCR.

Resultados: De los 843 aislamientos clínicos remitidos al INS, el 81,7% fueron confirmados como *C. auris* mediante MALDI-TOF MS o PCR en el INS y el resto, 18,3%, fueron identificados como otras especies de *Candida* spp. Las identificaciones correctas enviadas por los laboratorios representaron el 42,4%. MicroScan identificó *C. auris* principalmente como *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* y *C. famata*; Phoenix BD, VITEK 2 y MALDI-TOF MS identificó *C. auris* como *C. haemulonii*.

Discusión: Estudios señalan que *C. auris* exhibe una estrecha relación filogenética con *C. haemulonii*. Las identificaciones discrepantes pueden darse debido a que las bases de datos de los sistemas de diagnóstico son limitadas para este patógeno. Las deficiencias de los sistemas comerciales para la identificación de *C. auris* deben ser complementados con otros sistemas como MALDI-TOF MS o pruebas moleculares.

Palabras clave: *Candida auris*, vigilancia, diagnóstico, infección fúngica invasiva.

Identification of *Candida auris* isolates recovered through laboratory surveillance in Colombia: a challenge for diagnostic

Abstract

Objective: To compare the identification results obtained by different identification systems of *C. auris* isolates.

Methods: A descriptive study with data collected during the years 2016-19 through surveillance. The results generated by the MicroScan, Phoenix BD, VITEK 2 and MALDI-TOF MS systems of 843 clinical isolates of *C. auris* submitted to the INS were evaluated and compared with the results generated from confirmation through MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) or PCR.

Results: Out of 843 clinical isolates submitted to the INS, 81.7% were confirmed as *C. auris* by MALDI-TOF MS or PCR in the INS and the rest, 18.3%, were identified as other species of *Candida* spp. The correct identifications sent by the laboratories was 42.4%. MicroScan identified *C. auris* as *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* and *C. famata*; Phoenix BD, VITEK 2 and MALDI-TOF MS identified *C. auris* as *C. haemulonii*.

Discussion: Studies indicate that *C. auris* exhibits a close phylogenetic relationship with *C. haemulonii*. In addition, discrepant identifications may occur because the databases of diagnostic systems are limited with reference to this pathogen. The deficiencies of commercial systems for the identification of *C. auris* must be complemented with other systems such as MALDI-TOF MS or molecular tests.

Keywords: *Candida auris*, surveillance, diagnosis, invasive fungal infection.

Introducción

Las especies de *Candida* spp. se consideran los hongos más encontrados en entornos hospitalarios y son uno de los agentes etiológicos más frecuentes de infecciones fúngicas invasivas¹. *Candida auris* es uno de los patógenos emergentes más destacados y se ha convertido en un importante

hongo oportunista relacionado con infecciones asociadas a la atención en salud². Generalmente, esta levadura se caracteriza por su perfil de resistencia a múltiples fármacos, fácil transmisibilidad, persistencia en diferentes superficies y sobre todo discrepancias en la identificación de este hongo con varias plataformas diagnósticas empleadas en los laboratorios^{3,4}.

1 Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud. Bogotá D.C., Colombia.

2 <https://orcid.org/0000-0002-8772-9261>

3 <https://orcid.org/0000-0002-4956-4697>

4 <https://orcid.org/0000-0001-7596-8292>

5 <https://orcid.org/0000-0003-3029-118X>

* Autor para correspondencia.

Calle 26 # 51-20; Cel: +573167483256. Código postal: 111321

Correo electrónico: pescandon@ins.gov.co

Recibido: 14/01/2020; Aceptado: 07/04/2020

Cómo citar este artículo: S.K. Carvajal-Valencia, et al. Identificación de aislamientos de *Candida auris* recuperados a través de la vigilancia por laboratorio en Colombia: un reto para el diagnóstico. Infectio 2020; 24(4): 224-228

La identificación adecuada y rápida de *C. auris* es crítica en el tratamiento del paciente y en la implementación oportuna de medidas de salud pública para controlar la propagación de la infección⁵. Existen sistemas de identificación para levaduras, tanto estándares como automatizados que incluyen paneles de asimilación de carbohidratos y otros compuestos, pero algunas bases de datos de estos sistemas aún no incluyen el perfil de *C. auris*, de manera que varias plataformas son incapaces de diferenciarla de otras especies de levadura, resultando en una confusa identificación.

Los análisis genéticos han mostrado una estrecha relación entre *C. auris* y el complejo *C. haemulonii*, principalmente⁶. Por lo anterior, esta levadura puede ser identificada erróneamente como *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* y otras especies de *Candida* spp. como *C. catenulata*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. parapsilosis*, entre otras⁷.

Algunos métodos de identificación, comúnmente encontrados en los laboratorios de diagnóstico, incluyen VITEK 2, Phoenix BD y MicroScan. Por ejemplo, VITEK 2, recientemente incluyó a *C. auris* en su base de datos, junto con otros tres taxones: *C. haemulonii* var. *vulnera*, *C. duobushaemulonii* y *Cryptococcus gattii* (versión 8.01)⁸.

En la actualidad, las técnicas más eficientes son las basadas en espectrometría de masas MALDI-TOF MS y métodos moleculares como PCR (amplificación de la región ITS1, ITS2) o secuenciación de la región D1/D2 o ITS⁹.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han recibido reportes de la levadura emergente en más de cuatro continentes desde el año 2009. Dada la ocurrencia de infección por *C. auris* en una gran variedad de países, el CDC ha emitido alertas para la vigilancia de casos¹⁰.

Teniendo en cuenta la importancia a nivel de salud pública sobre la circulación de *C. auris* en Colombia, se generó la alerta nacional mediante la Circular Externa 0025 de 2017 donde se emitieron los criterios de envío de aislamientos presuntivos de *C. auris* al Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS), recuperados en los laboratorios clínicos de los establecimientos hospitalarios y en los laboratorios de los centros de investigación que procesan muestras procedentes de Unidades de Cuidados Intensivos, con el fin de confirmar la identificación¹¹.

En Colombia, la disponibilidad de tecnologías robustas que permitan una correcta identificación de *C. auris* aún no es muy amplia. Se tienen implementados algunos sistemas de diagnóstico, sin embargo, éstos no identifican correctamente todos los aislamientos de *C. auris*, de manera que se restringe el diagnóstico preciso y rápido del patógeno, el tratamiento oportuno del paciente y la instauración de medidas de control adecuadas.

Por tanto, en este estudio se compararon los resultados de identificación obtenidos por diferentes sistemas de identificación de aislamientos de *C. auris* provenientes de 22 depar-

tamentos de Colombia desde el año 2016, fecha en la cual se inició la vigilancia de este patógeno en el país.

Materiales y métodos

Se evaluaron los resultados emitidos por los sistemas de identificación MicroScan, Phoenix BD, VITEK 2 y MALDI-TOF de acuerdo con las identificaciones de 843 aislamientos clínicos sospechosos de *C. auris* remitidos al Grupo de Microbiología del INS a través de la vigilancia nacional por laboratorio. Los aislamientos provenían de 114 laboratorios clínicos y establecimientos hospitalarios, distribuidos en 22 departamentos de Colombia recolectados desde el 2016 al 2019. Se tuvo en cuenta que la casa comercial realizó la actualización del sistema VITEK 2 a la versión 8.01 desde septiembre de 2018 en los laboratorios.

Cada aislamiento se confirmó mediante MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker Daltonics) MBT versión 4.1.80 y/o PCR en el INS, métodos considerados como el "gold standard" para la identificación de *C. auris*.

Procesamiento de los aislamientos para la confirmación mediante MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker Daltonics)

El procedimiento de extracción de proteínas con ácido fórmico en tubo de 1.5 ml (Eppendorf) se siguió de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la identificación de levaduras. Se transfirió 1 µl del sobrenadante a una placa de acero y se cubrió con 1 µl de matriz. Una vez que se secó al aire, la placa se colocó en el instrumento y se analizó. La identificación de la levadura se logró mediante el análisis de los espectros con los de la base de datos MALDI-TOF MS. Los picos de estos espectros se compararon con el patrón característico de la especie o género de levadura, lo que condujo a la identificación¹².

Procesamiento de los aislamientos para la confirmación mediante PCR convencional

La extracción de ADN de los aislamientos fúngicos se realizó mediante el protocolo de extracción de ADN para cultivos fúngicos por choque térmico¹³.

Se emplearon los iniciadores específicos para *C. auris*: CauF 5'-CGCACATTGCGCCTTGGGTA-3' y CauR 5'-GTAGTCC-TACCTGATTGAGGCGAC-3'. Para la realización de esta PCR, se siguió el protocolo propuesto por Kordalewska M y colaboradores en 2017¹⁴.

Resultados

De los 843 aislamientos clínicos remitidos al INS, 689 (81,7%) fueron confirmados como *C. auris* mediante MALDI-TOF MS o PCR; solamente el 0,6% (4/689) fueron confirmados por los dos métodos y la identificación fue 100% concordante entre éstos. Por otra parte, los aislamientos restantes (154/843 aislamientos 18,3%) fueron identificados como otras especies de *Candida* spp u otras levaduras.

En general, las identificaciones discrepantes enviadas por los laboratorios principalmente fueron *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* y otras levaduras como *Rhodotorula* spp y especies de *Candida* spp. sin identificación de especie (Figura 1); éstas representaron el 57,6% (397/689) de las cepas confirmadas como *C. auris* en el INS.

MicroScan identificó *C. auris* principalmente como *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* y *C. famata*; Phoenix BD, VITEK 2 y MALDI-TOF MS identificó *C. auris* como *C. haemulonii* (Figura 2). Resultados discrepantes como *C. haemulonii* se obtuvieron en su mayoría con el sistema Phoenix BD 89,6% (26/29).

Por otro lado, las identificaciones correctas con el sistema VITEK 2 representaron el 29,3% (77/263 aislamientos identificados con VITEK 7.01) y 77,4% (195/252 aislamientos identificados con VITEK 8.01) (Figura 3).

El 48,2% de los laboratorios (55/114 laboratorios) obtuvieron identificaciones correctas de *C. auris* en la mayoría con VITEK 2 y MALDI-TOF. En este estudio las identificaciones correctas enviadas por los laboratorios en general representaron el 42,4% (292/689).

Por otro lado, se observaron 7 aislamientos falsos positivos procesados con VITEK 2 en los laboratorios de los establecimientos hospitalarios, enviados como *C. auris* y al confirmar por MALDI-TOF y/o PCR en el INS dieron otros tipos de *Candida* como *C. haemulonii* var. *vulnera*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

En general, la identificación correcta según el departamento remitente osciló entre 33-100%, dependiente del sistema de identificación disponible en cada región. (Tabla 1).

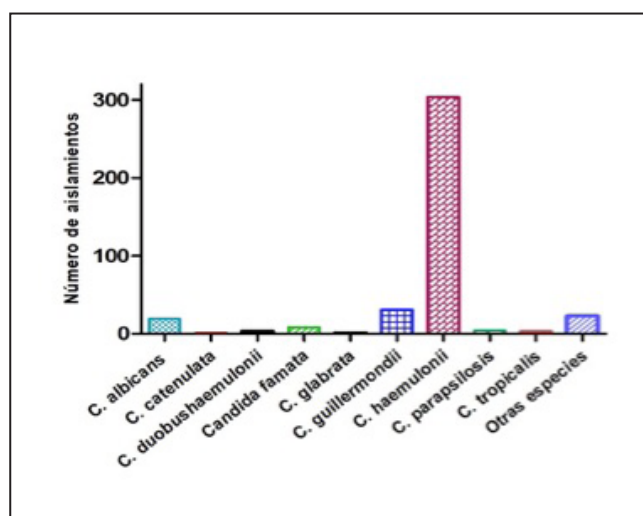


Figura 1. Distribución de la frecuencia de especies enviadas para análisis al laboratorio del INS (Bogotá).

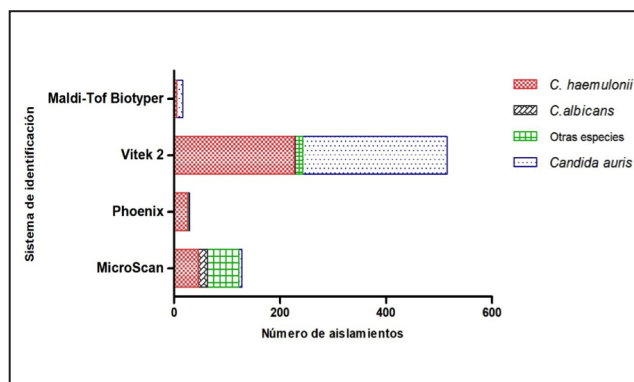


Figura 2. Comparación de los sistemas utilizados por los laboratorios de los establecimientos hospitalarios con respecto a la identificación de la levadura *Candida auris* (todos los aislamientos mostrados en la figura fueron confirmados como *C. auris* en el INS). El sistema MALDI-TOF MS de BioMérieux se excluyó de la gráfica debido a que presentó solo un dato y este no fue representativo para incluirlo en la gráfica.

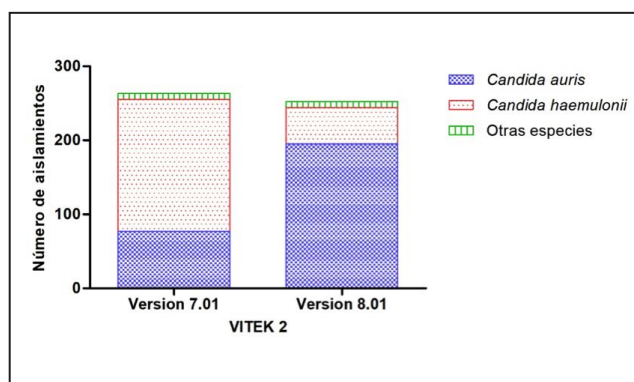


Figura 3. Comparación de las dos versiones de VITEK 2 en relación con el número de aislamientos identificados correctamente como *Candida auris* y la identificación discrepante *Candida haemulonii* y otras especies de levaduras (todos los aislamientos mostrados en la figura fueron confirmados como *C. auris* en el INS).

Discusión

En las últimas décadas, la infección por hongos se ha convertido en un problema de salud pública, especialmente para los pacientes inmunocomprometidos y aquellos hospitalizados con enfermedades graves de base. *Candida auris* es uno de los patógenos más importantes, responsables de las infecciones fúngicas invasivas y de brotes intrahospitalarios⁷.

Nuestros resultados muestran que las identificaciones discrepantes representan un 57,6%, esto indica que aún sigue siendo un desafío el diagnóstico adecuado de este patógeno emergente no solo en Colombia sino en el mundo, influyendo directamente en brindar al paciente un tratamiento adecuado y oportuno.

El estudio de Ambaraghassi G y colaboradores publicado en el 2019 reportó que el VITEK 2 versión 8.01 identificó correctamente el 52% (18/35 del total de los aislamientos del estudio), el 27% fueron aislamientos indistinguibles entre *C. auris*, *C. duobushaemulonii* y *C. famata* y las identificaciones erradas

Tabla 1. Departamentos, identificaciones correctas y la relación con los sistemas de identificación de aislamientos de *Candida auris* en Colombia 2016-2019.

	Departamento	Antioquia	Atlántico	Bogotá	Cauca	Cesar	Córdoba	Huila	Magdalena	Norte de Santander	Santander	Sucre	Valle
	Id correcta general	49/59 (83%)	59/80 (66%)	89/231 (38%)	31/33 (94%)	7/13 (54%)	3/3 (100%)	5/15 (33%)	3/7 (43%)	2/5 (40%)	20/53 (38%)	1/1 (100%)	23/44 (52%)
% id correcta en relación con el sistema	MicroScan	-	1 (1,7%)	1 (1,1%)	-	1 (14,3%)	-	-	-	-	1 (5%)	-	2 (8,7%)
	Phoenix BD	-	2 (3,4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VITEK 2	47 (96%)	53 (89,8%)	85 (95,5%)	31 (100%)	6 (85,7%)	3 (100%)	5 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	19 (95%)	1 (100%)	21 (91,3%)
	MALDI-TOF Biotyper	2 (4%)	3 (5,1%)	2 (2,3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MALDI-TOF BioMérieux	-	-	1 (1,1%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

representaron el 21%⁸. En nuestro trabajo, las identificaciones correctas correspondieron al 42,4% del total de aislamientos confirmados como *C. auris* por MALDI-TOF MS y/o PCR.

Los primeros tres casos de infección fúngica invasiva en un hospital por *C. auris* reportados en 2009 en Corea del Sur mencionan que esta levadura es generalmente identificada como *C. haemulonii* y *R. glutinis* por los sistemas de identificación comercial VITEK 2¹⁵. Estos casos se asemejan a los resultados de este estudio, donde VITEK 2 presentó la mayoría de las identificaciones como *C. haemulonii*.

Nuestros análisis muestran que el sistema VITEK 2 versión 8.01 tiene más capacidad de identificación correcta de *C. auris* en comparación a la versión 7.01 que tiene menos identificaciones acertadas; pese a la actualización desde el 2018, el diagnóstico sigue siendo un reto debido a que esta base de datos aún no tiene la completa capacidad de discriminar entre *C. auris* y otras especies de *Candida* spp. estrechamente relacionadas.

Los sistemas comerciales de identificación como MicroScan, Phoenix BD, VITEK 2, entre otros, usan un panel que se basa en pruebas de asimilación y crecimiento, utilizando compuestos de carbono y nitrógeno y se emplean de rutina en los laboratorios para la identificación de levaduras¹⁶. Un estudio realizado en el 2016 valida y compara varias plataformas y encontraron que los aislamientos de *C. auris* fueron identificados por Phoenix BD y VITEK 2 como *C. haemulonii* y por MicroScan como *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* o *C. parapsilosis*¹⁷. Así como se observa en el estudio mencionado, la plataforma MicroScan identifica erróneamente a *C. auris* como una variedad de especies de *Candida* spp; por el contrario, Phoenix y VITEK 2 generalmente identifican *C. auris* como *C. haemulonii*.

Varias investigaciones se han concentrado en comprender la razón de la asociación entre *C. auris* y *C. haemulonii*. Estudios señalan que *C. auris* exhibe una estrecha relación filogenética con *C. haemulonii* y se diferencia con base al análisis de secuencia del dominio D1/D2 de la subunidad 26S ARNr y las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS)¹⁸.

Sin duda, MALDI-TOF MS se considera una técnica de diagnóstico rápida y confiable para la identificación de *C. auris*. Actualmente, el enfoque MALDI-TOF MS es comercializado por 2 fabricantes: Bruker-Daltonics y BioMérieux. Estudios mencionan que el sistema de Bruker Biotyper tiene una biblioteca más amplia que la de BioMérieux¹⁹. En Colombia son pocas las instituciones que tienen MALDI-TOF MS debido a la restricción de costos; en este estudio, los resultados extrañamente arrojaron que el MALDI-TOF MS Biotyper solo tuvo el 69% de identificaciones correctas enviadas por los laboratorios de los establecimientos hospitalarios. Probablemente, esto se debió a que este equipo en su momento tenía una base de datos limitada. En general MALDI-TOF MS proporciona resultados comparando los espectros de la biblioteca con la cepa de estudio, de manera que puede generar resultados de especies filogenéticamente relacionadas.

Debido al hecho de que esta levadura puede ser multi-resistente a antifúngicos, productos de limpieza y a diferentes ambientes y además es de fácil transmisibilidad, es importante identificarla correctamente para proporcionar una atención efectiva y pronta al paciente. Así que, las deficiencias de los sistemas comerciales para la identificación de *C. auris* deben ser complementados con otros sistemas como MALDI-TOF MS o pruebas moleculares; debido a los costos y disponibilidad de estas herramientas, el envío al laboratorio de referencia es esencial para hacer una identificación adecuada del microorganismo, determinar la circulación de este patógeno a nivel local y nacional con el fin de prevenir la transmisibilidad y realizar control de propagación.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este artículo no se hicieron experimentos con humanos o animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés

Financiación. Los autores declaran no haber recibido ningún tipo de financiación

Agradecimientos. Los autores agradecen a los establecimientos hospitalarios y a los laboratorios de Salud Pública Departamental y Distrital por contribuir a la vigilancia.

Bibliografía

1. Cortegiani A, Misseri G, Chowdhary A. What ' s new on emerging resistant Candida species. *Intensive Care Med.* 2019;45:512-15.
2. Meis JF, Chowdhary A. Candida auris : a global fungal public health threat. *Lancet Infect Dis.* 2019;18:1298-99.
3. Iguchi S, Itakura Y, Yoshida A, Kamada K, Mizushima R, Arai Y, et al. Candida auris : A pathogen difficult to identify, treat and eradicate and its characteristics in Japanese strains. *J Infect Chemother.* 2019; 25:743-49.
4. Kordalewska M, Perlin DS. Identification of drug resistant Candida auris. *Front Microbiol.* 2019;10:1-13.
5. Centers for Disease control and Prevention (CDC). Identification of Candida auris. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/recommendations.html>. Consultado el 12 de diciembre de 2019.
6. Jeffery-smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A, et al. Candida auris : a Review of the Literature. *Clin Microbiol Rev.* 2017;31:1-18.
7. Ahmad A, Spencer JE, Lockhart SR, Singleton S, Petway DJ, Bagarozzi DA jr, et al. A high- throughput and rapid method for accurate identification of emerging multidrug- resistant Candida auris. *Mycoses.* 2019;62:513-8.
8. Ambaraghassi G, Dufresne PJ, Dufresne SF, Vallières E, Muñoz JF, Cuomo CA, et al. Identification of Candida auris by use of the updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study. *J Clin Microbiol.* 2019; 57:1-8.
9. Mahmoudi S, Kuchak SA, Gharehbolagh SA, Mirhendi H, Makimura K. Methods for identification of Candida auris , the yeast of global public health concern : A review. *J Mycol Med.* 2019;29:174-9.
10. Centers for Disease control and Prevention (CDC). Global Emergence of Invasive Infections Caused by the Multidrug-Resistant Yeast Candida auris. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/candida-auris-alert.html>. Consultado el 12 de diciembre de 2019.
11. Instituto Nacional de Salud. Circular Externa. [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Circular-0025-2017-Fortalecimiento-Acciones-Vigilancia-Candida-auris.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Circular-0025-2017-Fortalecimiento-Acciones-Vigilancia-Candida-auris.pdf). Consultado el 12 de diciembre de 2019.
12. Bruker Daltonics. Extraction procedure with formic acid. MALDI Biotyper CA system user manual. 2015.
13. Ferrer C, Colom F, Frase S, Mulet E, Abad JL, Alio JL. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2873-9.
14. Kordalewska M, Zhao Y, Lockhart S CA, Berrio I PD. Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2445-52.
15. Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KJ, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by Candida auris. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3139-42.
16. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Candida auris : A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog.* 2017;13:1-10.
17. Mizusawa M, Miller H, Green R, Lee R, Durante M, Perkins R, et al. Can multidrug-resistant Candida auris be reliably identified in clinical microbiology laboratories? *J Clin Microbiol.* 2017; 55:638-40.
18. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. Candida auris sp . nov ., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009;53:41-44.
19. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A. Multidrug-resistant Candida auris misidentified as Candida haemulonii : characterization by matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1823-30.