

Utilidad del análisis filogenético de la región espaciadora interna transcrita (ITS) para la diferenciación de especies del complejo *Candida parapsilosis*

Utility of phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for the differentiation of species of the *Candida parapsilosis* complex

Jeannete Zurita¹, Gabriela Sevillano², Samantha Sáenz Hinojosa³, Ariane Paz y Miño⁴, Camilo Zurita-Salinas⁵

Resumen

El complejo *Candida parapsilosis* está compuesto por *Candida parapsilosis* sensu estricto, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, que son fenotípicamente indistinguibles entre sí. Presentan diferencias en virulencia, susceptibilidad a antifúngicos y epidemiología. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el análisis filogenético utilizando secuencias del gen ITS de aislados clínicos, recolectados entre 2018 al 2023, como una nueva herramienta diagnóstica para la identificación de estas especies. Un total de 84 levaduras fueron descongeladas de pacientes entre 0 a 96 años. Los pacientes de sexo masculino fueron los más afectados. Se aislaron con mayor frecuencia de sangre, secreciones óticas, piel anexos y tejidos blandos y secreciones óticas. La candidemia fue una entidad clínica importante en menores de 1 año y en el grupo de adultos de 20 a 65 años. Mediante el análisis filogenético se llegó a la identificación *C. parapsilosis* sensu estricto en 74 aislamientos, *C. orthopsilosis* en 7 aislamientos y 3 *C. metapsilosis* en 3 aislamientos. El uso de árboles filogenéticos como herramienta diagnóstica nos permitió distinguir los miembros del complejo *Candida parapsilosis*, mediante el análisis de similitudes entre las secuencias de la región ITS. Se plantea la necesidad de la identificación de estas tres especies para el manejo clínico y epidemiológico.

Palabras clave: Complejo *Candida parapsilosis*, filogenia, región ITS, identificación.

Abstract

Candida parapsilosis complex includes *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, which are phenotypically indistinguishable from each other. They show differences in virulence, susceptibility to antifungals and epidemiology. This study aimed to evaluate the phylogenetic analysis using ITS gene sequences from clinical isolates, collected between 2018 to 2023, as a new diagnostic tool for the identification of these species. A total of 84 yeasts were studied from patients between 0 and 96 years old. Male patients were the most affected. They were isolated most frequently from blood, ear secretions, skin, and soft tissues. Candidemia was an important clinical entity in children under 1 year of age and in the group of adults from 20 to 65 years of age. Through phylogenetic analysis, *C. parapsilosis* sensu stricto was identified in 74 isolates, *C. orthopsilosis* in 7 isolates and 3 *C. metapsilosis* in 3 isolates. The use of phylogenetic trees as a diagnostic tool allowed to distinguish the members of the *Candida parapsilosis* complex, by analyzing similarities between the sequences of the ITS region. For the management of the infection caused by these species the appropriate identification is required.

Keywords: *Candida parapsilosis* complex, phylogeny, ITS region, yeast identification.

1. Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita & Zurita Laboratorios, Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica del Ecuador; Quito, Ecuador;  <https://orcid.org/0000-0002-9935-2588>
2. Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita & Zurita Laboratorios; Quito, Ecuador;  <https://orcid.org/0000-0002-1133-5960>
3. Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita & Zurita Laboratorios; Quito, Ecuador;  <https://orcid.org/0000-0003-1290-5248>
4. Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita & Zurita Laboratorios; Quito, Ecuador;  <https://orcid.org/0000-0002-2579-7488>
5. Unidad de Investigaciones en Biomedicina. Zurita & Zurita Laboratorios; 3Cátedra de Inmunología. Universidad Central del Ecuador; Quito, Ecuador;  <https://orcid.org/0000-0002-2656-773X>



Usted es libre de:
Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato.

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material para cualquier propósito, incluso comercialmente.

Recibido: 08-10-2023

Aceptado: 10-12-2023

Publicado: 15-01-2024

DOI: 10.47464/MetroCiencia/vol32/1/2024/37-45

*Correspondencia autor: alemejia2464@gmail.com

Introducción

Las infecciones causadas por las especies de *Candida* han aumentado en las últimas décadas, especialmente las infecciones fúngicas del torrente sanguíneo y otras sistémicas¹. Este incremento es debido al mayor número de paciente hospitalizados que presentan alguna deficiencia en el sistema inmunitario como en neonatos prematuros, al uso generalizado de antibiotioterapia de amplio espectro, al incremento de procedimientos invasivos y dispositivos, al creciente número de pacientes con neoplasias y trasplantes entre otros². Las especies del género *Candida* constituyen en orden de frecuencia el cuarto grupo más común de agentes causantes de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo³. Se calcula que en Estados Unidos y Europa la frecuencia de candidemia está entre 5 al 8%⁴. En un estudio realizado en América Latina en siete países la candidemia se encontró en el 26,5%; hubo una gran variabilidad en la distribución de especies en los diferentes países. Ecuador tuvo la mayor proporción de episodios por *C. albicans* (52,2%) y Honduras y Venezuela la más baja (27,4% y 26,8%, respectivamente)⁵. Ecuador en el mismo estudio arrojó una incidencia general de 0,9 casos por 1.000 admisiones⁵. Sin embargo es difícil estimar la real incidencia de la candidemia debido a que los estudios arrojan datos distintos dependiendo de la población estudiada y difiere muchos en diversas zonas geográficas de un mismo país⁶.

C. albicans es la especie más frecuente, sin embargo, las especies *no albicans* representan una preocupación creciente en la epidemiología⁷. Varios informes definen a la especie de *C. parapsilosis* como el segundo aislamiento más frecuente de infecciones del torrente sanguíneo, especialmente en Ecuador y el resto de América Latina⁵.

Candida parapsilosis es miembro de la flora cutánea comensal. El complejo *Candida parapsilosis*, se conoce también como Can-

didia sensu lato. En este estudio utilizaremos en término complejo *Candida parapsilosis*. Su papel como patógeno oportunista humano no difiere notablemente de las otras infecciones por *Candida* sin embargo, hay que señalar que es un patógeno importante en recién nacidos con bajo peso al nacer, pacientes bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa, individuos oncohematológicos y pacientes ingresados en cuidados intensivos y unidades de quemados¹. Los dispositivos médicos invasivos, como vías centrales u otras prótesis, representan el principal sustrato de colonización y siembra profunda para esta especie, debido a su capacidad innata para formar biopelículas en superficies orgánicas o inorgánicas como en el caso de otitis que requieren cirugía de colocación de tubos en el oído (timpanostomía)⁸. *C. parapsilosis* es capaz de colonizar materiales inertes y sobrevivir en el medio ambiente por mucho tiempo, lo que permite la propagación intrahospitalaria y la transmisión de paciente a paciente a través de las manos de los trabajadores de la salud, por lo que es una causa importante de brotes⁵.

A estas particularidades, se suma el aumento en las tasas de resistencia a antifúngicos en la mayoría de las infecciones por hongos y en *C. parapsilosis* en particular, situación por la que se reducen las opciones terapéuticas⁹ y más aún en el Ecuador donde la disponibilidad de antifúngicos para infecciones invasivas es muy limitada¹⁰.

El complejo *C. parapsilosis* se divide en tres grupos, denominados I, II y III, debido a diferencias genéticas pues fenotípicamente son prácticamente indistinguibles, pero en año 2005, Tavanti et al.¹¹ demostraron que la *Candida parapsilosis* estaba compuesta por tres especies crípticas y propuso la nomenclatura actual: *C. parapsilosis* sensu estricto, *Candida ortopsilosis* y *Candida metapsilosis*¹¹. Cuando las especies son muy parecidas entre sí y con los métodos convencionales no se pueden establecer diferencias pasan a ser agrupadas en un

complejo. Así por ejemplo complejo *Enterobacter cloacae*, o el complejo *Burkholderia cepacia*. Varios estudios previos llegaron a sugerir que podrían tratarse de especies distintas. Hasta llegar a definir estas diferencias se realizaron varios estudios con base en las diferencias observadas mediante el análisis de la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD), el análisis de la región ITS y de las secuencias de los dominios D1/D2 del ARNr (ácido ribonucleico ribosomal)¹² hasta que mediante la tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus sequence typing*; MSLT) Tavanti et al., concluyeron que las secuencias de los 3 grupos diferían al mismo nivel que lo hacían distintas especies, razón por la que finalmente se designaron como tres especies distintas¹³.

Para la identificación correcta de las especies de este complejo, se han utilizado varios ensayos fenotípicos para identificar el complejo *C. parapsilosis*, pero no distinguen con precisión sus tres especies crípticas, por lo que requieren el uso de métodos moleculares para la diferenciación como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), PCR en tiempo real, PCR con cebadores específicos, espectrometría de masas por ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDITOF), y análisis de secuenciación. Todas estas metodologías presentan sus limitaciones debido a que no logran diferenciar entre especies *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*¹¹.

Por lo que la construcción de árboles filogenéticos a partir de secuencias de ADN ha facilitado la identificación de especies de hongos, siendo la región ITS la más utilizada siendo considerada como el código de barras universal para los hongos debido a la facilidad de amplificación y su amplia utilidad en todo el reino. La filogenética se basa en información extraída de material genético como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN) o secuencias de proteínas para la construcción de árboles filogenéticos y evaluar similitudes entre especies¹⁴, permitiéndonos de

esta manera categorizar una levadura dentro de un grupo o clados específicos. Por lo tanto, la construcción de árboles filogenéticos es una herramienta útil al momento de distinguir entre especies de interés clínico estrechamente relacionadas fenotípicamente, además de la evaluación de porcentaje de divergencia entre las secuencias de nucleótidos¹⁵. Se utiliza un porcentaje de divergencia entre las secuencias de nucleótidos para evaluar la similitud de las secuencias que pueda indicar con precisión que son taxones específicos. Este valor es $\leq 3\%$ para indicar con especificidad entre hongos, es decir, hasta 3% de divergencia de secuencia para asignar un nuevo nombre a una especie¹⁶.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia del análisis filogenético utilizando secuencias del gen ITS de aislados clínicos, recolectados entre 2018 al 2023, como una nueva herramienta diagnóstica para la categorización taxonómica e identificación especies que forman parte del complejo *Candida parapsilosis*.

Materiales y métodos

Las levaduras fueron descongeladas del cepario de la Unidad de Investigaciones en Biomedicina de Zurita & Zurita Laboratorios. Se disponían de levaduras congeladas desde el año 2018 al 2023. No se dispone de aislamientos del año 2020. Se sembraron en medio cromogénico (medio CHROMagar™ *Candida*, BD™, Francia) y análisis microscópico en agar harina de maíz-Tween 80. El análisis colorimétrico automatizado mediante el sistema Vitek 2™ (bioMérieux, USA), mostró un perfil bioquímico típico de *C. parapsilosis*.

La identificación de las distantes especies de *C. parapsilosis* se realizó mediante ensayo de PCR utilizando el espaciador transcrito interno (ITS). Los productos de PCR fueron secuenciados por el método Sanger utilizando los mismos cebadores de amplificación (ITS1 e ITS4). Se construyó una matriz de alineamiento usando las secuen-

cias de los aislados obtenidos y secuencias de referencia obtenidas de NCBI GenBank y Mycobank. Se utilizaron las respectivas matrices alineadas para la construcción de un árbol filogenético de Parsimonia Máxima (MP).

Para la prueba de sensibilidad se utilizó el método de microdilución en caldo con el sistema comercial Sensititre (Thermo Fisher Scientific, USA). Los antimicóticos ensayados fueron equinocandinas como anidulofungina, caspofungina y micafungina, los azoles como itraconazol, voriconazol, posaconazol y fluconazol. Se ensayaron además anfotericina y 5-flucitosina.

Resultados

Candida parapsilosis suele ser parte del microbioma del ser humano, los aislamientos que se congelaron desde el año 2018 corresponden netamente a las levaduras

que estuvieron consideradas como agentes etiológicos de un proceso infeccioso. Se excluye el año 2020 en el cual no se congeló *C. parapsilosis* debido a la pandemia. Estos aislamientos corresponden a 84 individuos con una edad comprendida entre 0 meses a 96 años con una media de 36.8 años. Los pacientes de sexo masculino 47 (56%) fueron los más afectados. Las muestras cultivadas en las que crecieron estas levaduras fueron 20 (24%) de sangre, 18 (21%) de piel, anexos y tejidos blandos y 17 (20%) de oído. Los 29 orígenes restantes pueden observar en la Figura 1.

En la Figura 2 se encuentran las principales fuentes de aislamiento del complejo *Candida parapsilosis* según grupo de edad. La candidemia fue una entidad clínica importante en el grupo de edad de menores de 1 año y en el grupo de adultos 20 a 65 años. La otitis fue importante también en este último grupo.

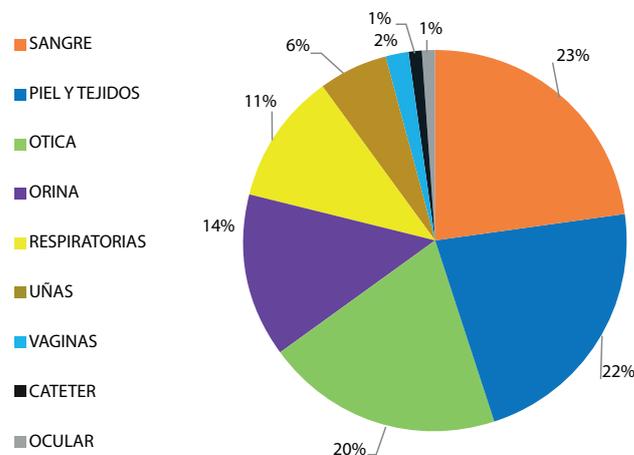


Figura 1. Tipos de muestra de las especies del complejo de *Candida parapsilosis*.

Análisis filogenético

El árbol filogenético resultante se muestra en la Figura 3. Se pudo observar la agrupación de las especies en dos clados monofiléticos principales. Un clado formado por las especies *C. parapsilosis* sensu estricto, que abarca la mayoría de las especies, mientras que el segundo clado, está formado por dos subclados pertenecientes a las especies *Candida orthopsilosis* y *Can-*

didá metapsilosis. La divergencia entre las especies *C. parapsilosis* sensu estricto y *C. metapsilosis* fue de 4.58%, entre *C. parapsilosis* sensu estricto y *C. orthopsilosis* fue 3.04%, y entre *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fue de 2.9%. El porcentaje de divergencia de las secuencias dentro de cada subclado fue bajo, con un valor inferior a 1%. De las 84 muestras analizadas usando el gen ITS, se llegó a la identificación a nivel de especie de todas las muestras, obte-

niéndose 74 (88.1%) aislamientos como *C. parapsilosis* sensu estricto 7 (8.3%) como *C. orthopsilosis* y 3 (3.6%) *C. metapsilosis*.

Tres aislamientos (3,54%) presentaron algún tipo de resistencia. Un aislamiento presentó resistencia a fluconazol, una fue resistente a fluconazol y 5-flucitosina y una mostró resistencia a voriconazol, fluconazol, anfoterina e intermedia a micafungina.

Discusión

Durante la última década, la incidencia de *Candida parapsilosis* ha aumentado dramáticamente. De hecho, los informes indican que *C. parapsilosis* es a menudo la segunda especie de *Candida* más comúnmente aislada en hemocultivos y *C. parapsilosis* incluso supera a *Candida albicans* en algunos países europeos asiáticos y hospitales de América del Sur⁵.

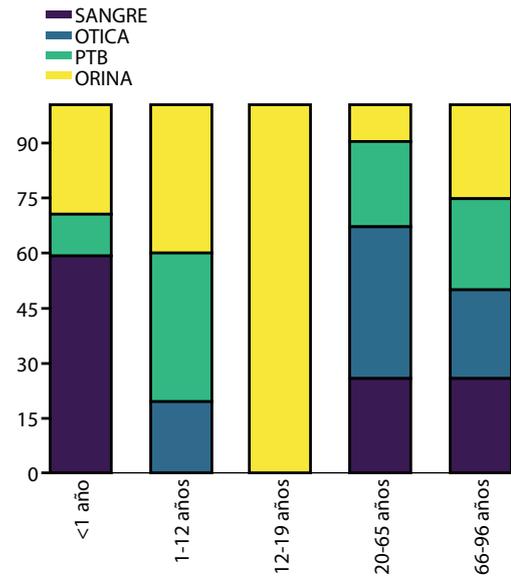


Figura 2. Principales fuentes de aislamiento del complejo *Candida parapsilosis* según grupo de edad. PTB = Piel, anexos y tejidos blandos.

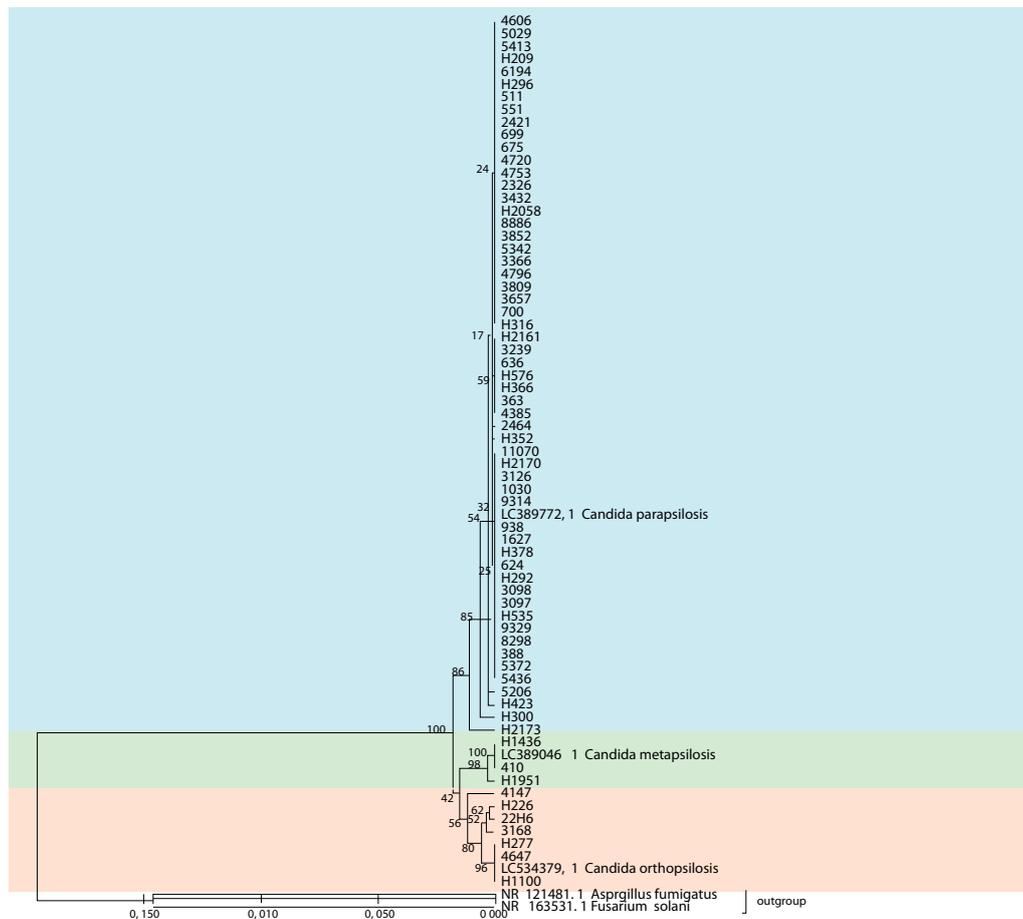


Figura 3. Análisis filogenético del gen ITS de especies del complejo *C. parapsilosis*.

Existen diferencias en la patogenia entre las especies del complejo de *C. parapsilosis*. *C. parapsilosis* sensu stricto, es considerada la especie más virulenta y con mayor capacidad para la formación de biopelículas. *C. orthopsilosis* es la segunda especie más virulenta dentro del complejo de *C. parapsilosis*⁸. Esta especie es capaz de formar biopelículas y de producir niveles más elevados de fosfolipasas y hemolisinas en comparación con *C. metapsilosis* y en algunos casos, incluso más que *C. parapsilosis* sensu stricto. Finalmente, *C. metapsilosis* es considerada la especie de menor virulencia, por lo tanto, de menor relevancia clínica. A pesar de que estudios que han demostrado su habilidad para formar biopelículas, la capacidad de adhesión y el daño tisular es muy baja¹⁷.

La susceptibilidad antifúngica dentro del complejo de *C. parapsilosis* difiere entre especies. De manera general, las especies del complejo son susceptibles a la mayor parte de los agentes antifúngicos y es característico de este complejo presentar concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) más elevadas a todas las equinocandinas, en comparación con otras especies de *Candida*¹⁸. Datos de susceptibilidad in vitro indican que *C. parapsilosis* sensu stricto es más resistente a fluconazol y equinocandinas que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, siendo ésta última la especie más sensible¹⁹. Aunque las infecciones por *C. parapsilosis* generalmente producen tasas de morbilidad y mortalidad más bajas que las infecciones por *C. albicans*, se ha informado que varios aislados clínicos de esta especie son menos susceptibles a las equinocandinas y, en algunas regiones, también se ha observado resistencia al tratamiento con azoles, lo que complica la elección del tratamiento empírico con fármacos antimicóticos¹⁴. En nuestro estudio tres aislamientos de *Candida parapsilosis sensu stricto* presentaron resistencia. Un aislamiento fue resistente a fluconazol. Uno resistente a fluconazol, voriconazol, micafungina y anfotericina y un

aislamiento mostró resistencia a fluconazol y 5-fluocitosina

Dentro del complejo, las especies muestran diferencias significativas en tasa de prevalencia. *C. parapsilosis* sensu stricto predomina en las unidades pediátricas y neonatológicas, situándose en ciertos casos por delante de *C. albicans*¹¹. En general, la incidencia de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* es baja en comparación con la de *C. parapsilosis* sensu stricto. Sin embargo, en varios trabajos se ha encontrado que *C. orthopsilosis* ha sido aislada en mayor medida en áreas quirúrgicas. Entre ellos, Garcia-Effron et al., 2016, observaron que, en pacientes adultos, el cáncer estaba más asociado a *C. orthopsilosis* que a *C. parapsilosis* sensu stricto. Respecto a *C. metapsilosis*, su presencia en hemocultivos es muy baja, en concordancia con su menor virulencia, siendo más frecuente su aislamiento en mucosa vaginal u oído¹⁷. Datos similares fueron observados en a nuestro estudio.

Como ya se mencionó, la identificación de la especie de *Candida* por métodos bioquímicos y fenotípicos no pueden discriminar las especies del complejo de *C. parapsilosis* dado que las tres especies presentan las mismas características morfológicas y de crecimiento y los mismos perfiles de asimilación y fermentación de azúcares²⁰. La pirosecuenciación usando la región ITS2 y MALDI-TOF, han sido utilizadas para la correcta identificación de las especies del complejo. Esta última técnica permite, puede ser aplicada directamente en hemocultivos y disponen de sistemas que consisten en bases de datos de diagnóstico in vitro para un centenar de especies. Se ha comprobado que la técnica de MALDI-TOF permite identificar las especies crípticas del complejo de *C. parapsilosis*²¹. Sin embargo, en el año 2016, en un trabajo realizado en Francia, se comparó la exactitud de dos sistemas MALDI-TOF, el Vitek MS y el Microflex LT Biotiper, demostrando que este último sistema era capaz de identificar correctamente el 98% de los aislamientos de

las tres especies mientras que el sistema Vitek MS identificaba correctamente todos los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto, pero identificaba erróneamente o no era capaz de identificar las especies *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Por lo tanto, concluyeron que los resultados de los aislamientos identificados con el sistema Vitek MS deben ser nombrados como *C. parapsilosis* sensu lato²¹. Por lo tanto, las técnicas de secuenciación se han convertido en las gold estándar para la identificación de las especies del complejo *C. parapsilosis*, sin embargo, únicamente la secuenciación y el análisis mediante la comparación con bases de datos de NCBI GenBank para evaluar la identidad de una especie, no son suficientes para la discriminación correcta²². Es necesario realizar un análisis filogenético y análisis de divergencia, para poder categorizar e identificar estas especies estrechamente relacionadas. La divergencia intraespecífica encontrada en este estudio se corresponde bien con los datos disponibles en la literatura sobre la variabilidad intraespecífica de ITS del 0 al 3% en el reino fúngico²³, mientras que la divergencia interespecífica fue entre 2.9%-4.5%. Siendo *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, las especies más estrechamente relacionadas con 2.9%. El análisis filogenético nos permitió la identificación correcta de las tres especies crípticas del complejo *Candida parapsilosis* (*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. parapsilosis* sensu lato). La filogenética nos permite tener una mejor comprensión de cómo han evolucionado las especies y al mismo tiempo explica las similitudes y diferencias entre ellas, considerándose una de las mejores herramientas para comprender el origen y posterior evolución de especies. En este estudio presentamos una nueva herramienta diagnóstica, el análisis filogenético, para discriminar entre los miembros del complejo *C. parapsilosis*.

Los árboles filogenéticos construidos mostraron que todos los aislados de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. parapsilosis* sensu

lato se agruparon, indicando un buen análisis de respaldo. Esta información puede ser útil para mejorar nuestra comprensión epidemiológica y diagnóstica.

Los resultados podrían proporcionar una referencia importante para futuros estudios sobre el complejo *C. parapsilosis*, incluidos estudios de identificación de especies y evaluaciones de prevalencia entre ubicaciones geográficas distintas. Lo más importante es que nuestra investigación será valiosa para una mejor clasificación e identificación del complejo *C. parapsilosis* con el fin de desarrollar estrategias adecuadas de prevención y control de propagación.

Conclusiones

La construcción de árboles filogenéticos mediante el análisis de similitudes entre las secuencias de la región ITS de los aislados en este estudio, es una nueva alternativa para la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas fenotípicamente que no se las puede identificar usando métodos colorimétricos como en el Vitek 2™ ni métodos proteómicos como el MALDI-TOF. La construcción de árboles filogenéticos mejora el diagnóstico y la epidemiología de las especies del complejo *Candida parapsilosis*. Los patrones de sensibilidad no mostraron mayores diferencias entre las especies crípticas. Un enfoque futuro de investigación en las especies de este complejo debe ser encaminada a investigar las condiciones predisponentes y los factores de riesgo, así como los factores de virulencia para una mejor comprensión de la identificación de estas especies. La utilización del ensayo de PCR utilizando ITS, es una metodología que podría ser integrada a la rutina de diagnóstico microbiológico cuando el laboratorio cuente con un secuenciador.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. **de J. Treviño-Rangel R, González-González JG, Garza-González E, González GM.** *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. Med Univ [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2024 Mar 26];14(56):157–65. Available from: <https://www.elsevier.es/en-revista-medicina-universitaria-304-articulo-candida-parapsilosis-una-amena-za-desafiante-X1665579612676659>
2. **da Silva EM, Sciuniti Benites Mansano E, de Souza Bonfim-Mendonça P, Olegário R, Tobal-dini-Valério F, Fiorini A, et al.** High colonization by *Candida parapsilosis sensu stricto* on hands and surfaces in an adult intensive care unit. J Med Mycol. 2021;31(2).
3. **Spampinato C, Leonardi D.** Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. Biomed Res Int [Internet]. 2013 [cited 2022 Aug 15];2013:13. Available from: </pmc/articles/PMC3708393/>
4. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2024 Mar 26];39(3):309–17. Available from: <https://dx.doi.org/10.1086/421946>
5. **Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al.** Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. PLoS One [Internet]. 2013 Mar 19 [cited 2023 Jun 30];8(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527176/>
6. **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2007 Jan [cited 2022 Aug 15];20(1):133. Available from: </pmc/articles/PMC1797637/>
7. **Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E.** *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Mar 26];55(2):189–98. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-candida-albicans-main-opportunistic-pathogenic-S0325754122000840>
8. **Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghanoum MA.** Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. Infect Immun [Internet]. 2002 [cited 2024 Mar 27];70(2):878. Available from: </pmc/articles/PMC127692/>
9. **Daneshnia F, de Almeida Júnior JN, Ilkit M, Lombardi L, Perry AM, Gao M, et al.** Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. The Lancet Microbe [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2024 Mar 26];4(6):e470–80. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2666524723000678/fulltext>
10. **Zurita J, Denning DW, Paz-y-Miño A, Solís MB, Arias LM.** Serious fungal infections in Ecuador. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Oct 30];36(6):975–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28161740/>
11. **Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC.** *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol [Internet]. 2005 Jan [cited 2023 Dec 12];43(1):284–92. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.43.1.284-292.2005>
12. **Paauw A, Caspers MPM, Schuren FHJ, Levers-tein-van Hall MA, Delétoile A, Montijn RC, et al.** Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. PLoS One [Internet]. 2008 Aug 21 [cited 2023 Jan 4];3(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716657/>
13. **Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T.** *Multilocus Sequence Typing* (MLST) for Characterization of *Enterobacter cloacae*. PLoS One [Internet]. 2013 Jun 11 [cited 2024 Mar 27];8(6):66358. Available from: </pmc/articles/PMC3679064/>
14. **Tóth R, Nosek J, Mora-montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD.** *Candida parapsilosis* : from Genes to the Bedside. 2019;32(2):1–38.
15. **Bhunjun CS, Phillips AJL, Jayawardena RS, Promputtha I, Hyde KD.** Importance of Molecular Data to Identify Fungal Plant Pathogens and Guidelines for Pathogenicity Testing Based on Koch's Postulates. Pathogens [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Mar 27];10(9). Available from: </pmc/articles/PMC8465164/>
16. **Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH.** Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. Vol. 80, Journal of Natural Products. American Chemical Society; 2017. p. 756–70.

17. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):606–25.
18. Czajka KM, Venkataraman K, Brabant-Kirwan D, Santi SA, Verschoor C, Appanna VD, et al. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. Cells 2023, Vol 12, Page 2655 [Internet]. 2023 Nov 19 [cited 2024 Mar 27];12(22):2655. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/22/2655/htm>
19. Yamin D, Akanmu MH, Al Mutair A, Alhumaid S, Rabaan AA, Hajissa K. Global Prevalence of Antifungal-Resistant *Candida parapsilosis*: A Systematic Review and Meta-Analysis. Trop Med Infect Dis. 2022;7(8).
20. Fontecha G, Montes K, Ortiz B, Galindo C, Braham S. Identification of Cryptic Species of Four *Candida* Complexes in a Culture Collection. J Fungi [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 27];5(4). Available from: [/pmc/articles/PMC6958398/](https://pmc/articles/PMC6958398/)
21. 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 [Internet]. 2013 [cited 2024 Mar 27];51(7):2453. Available from: [/pmc/articles/PMC3697679/](https://pmc/articles/PMC3697679/)
22. Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MHG, Muniz M de M, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of four molecular approaches to identify *Candida parapsilosis* complex species. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2024 Mar 27];112(3):214. Available from: [/pmc/articles/PMC5319372/](https://pmc/articles/PMC5319372/)
23. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. Evol Bioinform Online [Internet]. 2008 [cited 2024 Mar 27];4(4):193. Available from: [/pmc/articles/PMC2614188/](https://pmc/articles/PMC2614188/)

Cómo citar: Zurita J, Sevillano G, Sáenz Hinojosa S, Paz y Miño A, Zurita-Salinas C. Utilidad del análisis filogenético de la región espaciadora interna transcrita (ITS) para la diferenciación de especies del complejo *Candida parapsilosis*. MetroCiencia [Internet]. 15 de enero de 2024; 32(1):37-45. Disponible en: <https://doi.org/10.47464/MetroCiencia/vol32/1/2024/37-45>