



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIFERENCIAS INTRAESPECÍFICAS DE *Candida albicans* DE PACIENTES Y PERSONAL
PARAMÉDICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BETZABE SANTAMARÍA CORTÉS



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

1. Datos del alumno

Santamaría
Cortés
Betzabe
21 61 47 33
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
303098568

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

2. Datos del tutor

Dra.
Laura Rosio
Castañón
Olivares

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Joaquín
Cifuentes
Blanco

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Fabiola
Ramírez
Corona

5. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 4

Q. F. B
Erika
Córdoba
Martínez

6. Datos del trabajo escrito

Título
Número de páginas
Año

6. Datos del trabajo escrito

Diferencias Intraespecíficas de *Candida albicans* de pacientes y personal paramédico.
54
2013

Agradecimientos

A mis padres

Gracias por todo su apoyo y amor que me ha permitido poder culminar este proyecto

A la Dra. Rosio Castañón Olivares

Por confiar en mí para la realización de este proyecto el cual me permitió crecer académicamente y me enseñó cuán lejos puede llegar mi potencial.

Gracias por todo el aprendizaje

A los profesores del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, UNAM por la ayuda brindada para la realización del proyecto.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona

Por sus enseñanzas y apoyo que fueron de suma importancia para la realización de este proyecto, por ser no solo un gran ejemplo como profesional sino como persona por su gran calidad humana

A la Mtra. Pilar Ramos Cervantes

Del Laboratorio de Biología molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo en la elección de los primers utilizados en este trabajo

A la DGAPA

Con el apoyo de la cual se financió este trabajo a través del PAPIIT con el proyecto IN-202908-3

A la UNAM

Por la formación no solo académica sino humana, porque en su recinto aprendí el valor e importancia de estudiar la vida, por hacerme una persona consciente de mí entorno. Gracias por lo que soy, una universitaria orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios

Índice

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	13
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
VII. RESULTADOS	26
VII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIONES	46
X. REFERENCIAS	48
XI. ANEXOS	52

DIFERENCIAS INTRAESPECÍFICAS DE *Candida albicans* DE PACIENTES Y PERSONAL PARAMÉDICO

Resumen

Las infecciones hospitalarias provocadas por hongos del género *Candida* han tenido un incremento en las últimas décadas y el principal responsable de dichas infecciones es *Candida albicans*.

En este trabajo se pretendió conocer a través de las muestras obtenidas en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, si existen semejanzas o diferencias significativas en el genoma de *C. albicans* de los organismos causantes de infección y los comensales, por medio del análisis de las regiones de los espaciadores internos ITS1 e ITS2.

Se llevó a cabo un análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de la región blanco, mediante la construcción de los árboles filogenéticos realizados con los métodos de distancia Neighbor Joining y UPGMA y el criterio de optimización de Máxima Verosimilitud.

El estudio mostró árboles con topologías similares para todos los aislados de *C. albicans* incluidos.

Se concluyó que éste tipo de análisis, no discrimina entre aquellas levaduras comensales de las patógenas para el humano.

I. INTRODUCCIÓN

La candidosis es una micosis oportunista considerada como una infección aguda o crónica, que puede causar daño en piel, uñas, y mucosas, o tejidos profundos del humano y otros mamíferos. En los humanos, es una enfermedad que afecta en general a todos los grupos de edad, sexo, raza y ocupación, aunque hay algunos cuadros clínicos que se presentan con mayor frecuencia en personas con factores de oportunismo bien identificados (López-Martínez *et. al*, 2004).

Candida spp es un importante y exitoso comensal y patógeno humano, que debido a su versatilidad puede sobrevivir en muchos sitios anatómicos distintos, cada uno con su propio conjunto de presiones ambientales, lo que refleja una alta capacidad adaptativa mostrando que el espectro de enfermedades causadas por ella, excede mucho más que el de otros microorganismos comensales. *Candida* spp, están entre los primeros cuatro lugares como causantes de infecciones nosocomiales en el mundo y en aquellos pacientes que desarrollan candidemia se les atribuye una tasa de mortalidad del 35% (Calderone y Fonzi, 2001).

La candidosis es frecuentemente una infección endógena, provocada por el sobrecrecimiento de los hongos que habitan como biota normal en algunos tejidos humanos; sin embargo, puede ser ocasionalmente adquirida de fuentes exógenas (como catéteres o sondas) (Band y Maki, 1979) o de persona a persona (Behrens-Bauman, 1991).

Debido a la alta incidencia de *Candida* spp como causante de infección profunda y a la importancia que tiene la identificación del organismo para instaurar terapias efectivas, se han desarrollado métodos de análisis de DNA, que contribuyen de manera eficaz a la identificación del organismo y consecuentemente, al tratamiento específico del paciente. Se han utilizado diferentes métodos de identificación genética, usando para ello la homología dentro de las secuencias de genes de rDNA (genes 18S, 5.8S y 28S) y las diferencias presentadas dentro de las regiones espaciadoras (ITS1 e ITS2), muchos estudios han mostrado que existe suficiente variabilidad entre las regiones ITS1 o ITS2 como para permitir la identificación de especies e incluso, evidenciar diferencias intra-específicas. Se han llevado a cabo técnicas para la identificación genética como la amplificación con enzimas de restricción (RFLP) y la secuenciación (Lott *et. al*, 1998).

1. Biología de *Candida* spp.

Candida es una levadura comensal del hombre que habita en la piel, las mucosas, el tracto digestivo, el tracto respiratorio alto y el tracto genitourinario. Los hongos del género *Candida* son anamorfos que se presentan como levaduras redondas u ovaladas de 3-7 μM de diámetro (López- Martínez *et. al*, 2004).

Las especies de *Candida* son organismos ubicuos, además de ser patógenos de humanos también pueden encontrarse como saprófitos en el ambiente. Los patógenos, tales como *Candida albicans* son reportados más a menudo de aislados de pacientes o como comensales de huéspedes humanos, por lo tanto se cree que el origen de las infecciones causadas por *Candida* spp es endógeno; sin embargo, aunque la adquisición de especies de *Candida* del ambiente no ha sido estudiada de manera detallada es probable que ocurra (Calderone, 2002).

El género *Candida* está compuesto por un grupo extremadamente heterogéneo de organismos levaduriformes. Los miembros de éste género pueden desarrollarse y crecer exclusivamente como levaduras, algunos otros además pueden producir pseudohifas y pseudomicelio, pero *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* también forman hifas “verdaderas” (Calderone, 2002).

Los tubos germinativos son identificados como la primera fase de la formación de las hifas. La formación de tubos germinativos constreñidos en suero completo o diluido, ha sido usada como prueba rápida para identificar *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Otra estructura formada por esas levaduras, son los clamidoconidios; estos son células redondeadas formadas en el extremo de células suspensoras que se desarrollan en medios que contienen carbohidratos complejos (Gow, 2002).

C. albicans exhibe dimorfismo estructural, esto significa que el crecimiento vegetativo del hongo puede ocurrir ya sea en forma de levadura, reproducción por gemación o fisión binaria o de manera alternativa de forma filamentosa, como células elongadas, las cuales fallan al separarse después de la citocinesis, por lo que hay formación de filamentos como

pseudohifas o hifas (Gow, 2002). La pared celular de *Candida albicans* está constituida por β -(1-3)-D-glucano, manano, quitina, proteínas y lípidos; la organización y composición de la pared varía dependiendo de su morfogenética (Arenas, 2008).

Existen alrededor de 150 especies de *Candida*, de ellas aproximadamente 17 son patógenas usuales para el humano. De las 17, sólo las siguientes cinco producen más del 90% de las infecciones invasivas: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis* (Gómez et.al, 2010).

2. Taxonomía

Se ha descrito el estado teleomorfo de varias especies de *Candida*, estos estados sexuales son ascomicetos, como el género *Pichia*, por ejemplo *Pichia guilliermondii* (equivalente teleomorfo de *Candida guilliermondii*). Los estados anamórficos de *Candida*, así como géneros cercanos como *Saccharomyces* han sido colocados por Kurtzman y Fell (1998) dentro del Phylum Ascomycota (Cuadro 1). Además, el análisis de datos de secuencias comparativas, apoyan la idea de que tanto las especies sexuales y no sexuales de *Candida* están más relacionadas con los Ascomycetes que con los Basidiomycetes. Análisis de parsimonia a partir de secuencias de SSU rDNA de 75 Ascomycetes y Basidiomycetes representativos, claramente validaron el alineamiento taxonómico de *Candida* con los Ascomycetes. Además, hay otras características que distinguen a las especies de *Candida* como Ascomycetes, por ejemplo, que son fermentativas, ureasa negativa, no capsuladas y no asimilan inositol, su pared celular está hecha de β -glucanos; y no producen almidón ni pigmentos carotenoides (Calderone, 2002).

Dominio	Eukarya
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Hemiascomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Candidaceae (Anamorfos)
Género	<i>Candida</i>

Cuadro 1. Clasificación de *Candida*

3. Factores de Virulencia

Se han postulado diferentes mecanismos de virulencia para *Candida* entre los cuales se encuentran: producción de adhesinas y enzimas proteolíticas (proteasas, fosfolipasas, etc.), dimorfismo y efectos inmunorreguladores de determinantes fúngicos que contribuyen a disminuir la actividad de las defensas del hospedero (Calderone y Fonzi, 2001).

Las especies de *Candida* poseen todas las características de los patógenos oportunistas; ésta se adquiere a edad temprana por el hospedero, vive silenciosamente en un nicho secuestrado (por ejemplo, el tracto gastrointestinal o genitourinario), elude los mecanismos microbicidas de las defensas del hospedero y produce enfermedad solo cuando el sistema inmune del hospedero está comprometido (San Blas *et. al*, 2000).

La transición de *Candida* de un inofensivo comensal a un organismo patógeno es compleja y está relacionada con sutiles cambios ambientales que llevan a la expresión de un rango de diversos factores de virulencia (Raju y Rajappa, 2011). La virulencia de *Candida* es multifactorial y la invasión dependerá de la suma de los atributos del hongo, de la influencia ambiental del hospedero y la pérdida de las defensas del mismo (Calderone y Gow, 2002).

Los factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de la candidosis son:

- La adherencia, que es la unión de *Candida* a las células del hospedero, por medio de biomoléculas que promueven la adhesión, llamadas adhesinas.
- La morfogénesis, transición de levadura unicelular a una forma de crecimiento filamentosa, ya sea como pseudohifa o hifa. De todas las *Candida* spp sólo *C. albicans* y *C. dubliniensis* forman ambos tipos de filamentos.
- El *switching* fenotípico es la habilidad de *C. albicans* de cambiar fenotípicamente. El *switching* mejor caracterizado es el cambio blanco- opaco de las colonias; también puede involucrar cambios en la expresión de antígenos en la superficie celular, afinidad a los tejidos del organismo, producción de enzimas y sensibilidad a drogas.

- Las biopelículas que *C. albicans* es capaz de formar, las cuales protegen a las levaduras contra la acción de las defensas del hospedero se forman cuando las células se adhieren a una superficie sólida y después experimentan morfogénesis para producir una gruesa capa de células de diversas morfologías embebida en la matriz extracelular.

4. Caracterización Genómica y Molecular

La secuenciación de DNA genómico ha revolucionado muchas áreas de investigación, entre ellas las técnicas de identificación de patógenos como los hongos del género *Candida*, dentro de la microbiología clínica. La amplificación de ácidos nucleicos es una técnica fundamental para tales estudios.

Se han utilizado varios blancos de DNA, entre ellos el DNA mitocondrial que ha sido usado como base para la identificación de *Candida albicans* por PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés). Otros blancos usados han sido los genes ribosomales multi-copia que contienen secuencias conservadas que son comunes en todos los hongos, así como dominios variables y regiones de alta variabilidad. Los ITS (Internal Transcribed Spacers, por sus siglas en inglés) son secuencias conservadas que pueden ser utilizadas inclusive, para la identificación de infecciones por hongos, mientras que las regiones variables pueden ser explotadas para tipificación de especies (Lee y Wong, 2004).

Para el fin de la caracterización de especies varios autores han evaluado el uso de las regiones ITS, combinando la técnica de amplificación por PCR, con otras como la digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción o la secuenciación de dichas regiones.

Williams y colaboradores (1995), realizaron la identificación especies de *Candida* con base en la variación del tamaño y estructura primaria de las regiones espaciadoras intergénicas (ITS) de rDNA. Para ello, amplificaron el DNA de los aislados por PCR, con primers específicos para las regiones ITS y posteriormente todos los productos fueron analizados por RFLP por digestión con las enzimas de restricción *HaeIII*, *Bfal* y *DdeI*, obteniendo

diferentes tamaños de productos, con lo cual identificaron ocho especies de *Candida* médicamente importantes por la diferencia estructural primaria encontrada en las regiones espaciadoras intergénicas y también mostraron que algunas de estas especies pueden ser discriminadas solo con base en el tamaño de los productos de PCR (Williams *et. al.* 1995).

Lott y colaboradores (1998), determinaron la secuencia de nucleótidos de la región ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) para 13 especies del género *Candida*. En ningún caso encontraron que dos especies presentaran un tamaño o secuencia idéntica de ITS2, por lo cual consideraron este método como eficaz para la identificación de especies (Lott *et. al.*, 1998).

5. Candidosis

Como ya fue mencionado, la candidosis es una micosis oportunista producida por miembros del género *Candida*, principalmente *Candida albicans*. A diferencia de otros hongos patógenos *C. albicans* es un miembro de la microbiota normal de la boca, tracto respiratorio, tracto digestivo y tracto genitourinario. En individuos sanos *C. albicans* no es patógena (Prescott, 2004); sin embargo, la alteración de la microbiota bacteriana o un cambio en la inmunidad del huésped ocasiona que haya un sobrecrecimiento fúngico, que puede llegar a causar infección. Además de *C. albicans*, las especies que producen más comúnmente la candidosis son *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* (Figueras *et.al*, 2011). La candidosis es la micosis emergente que tiene el mayor efecto, debido a su frecuencia y la gravedad de sus complicaciones (López- Martínez, 2010).

5.1 Enfermedades causadas por *Candida albicans*

Infecciones de las mucosas.

Candida albicans puede causar infecciones sintomáticas de las membranas mucosas. La más conocida de estas es la candidosis pseudomembranosa. Tales infecciones afectan

comúnmente las mucosas vaginal, bucofaríngea, esofágica y gastrointestinal (Kim y Sudbery, 2011).

Candidemia y candidosis diseminada.

Las infecciones en el torrente sanguíneo causadas por *C. albicans* se conocen como candidemia. En individuos normales sanos, la protección adecuada contra tales infecciones es provista por la acción de los neutrófilos. La candidemia se puede desarrollar en pacientes que tienen un nivel anormalmente bajo de neutrófilos como resultado de determinados tipos de cáncer o ciertas terapias inmunosupresoras. La candidemia puede llevar a la colonización de órganos internos, ésta condición es conocida como candidosis diseminada (Kim y Sudbery, 2011).

5.2. Formas clínicas

Las formas clínicas dependen de la localización de la infección; según López-Martínez y colaboradores (2004) las principales formas clínicas son:

- Cutánea: se presentan de forma típica como lesiones eritematosas, o vesículo-pustulares, exudativas y con placas blancas, con márgenes bien definidos. Se presenta prurito, presencia de grietas y dolor.
- Onicomycosis: afecta más frecuentemente las manos. La infección crónica afecta el crecimiento de la uña, produciendo surcos transversales o longitudinales. La queratina de las uñas se torna de una coloración que va de amarillo a negro pálido; frecuentemente se desprende la parte distal de la uña.
- Membranas mucosas: las zonas que se ven afectadas principalmente son la boca, el surco balano-prepucial, la vagina y la conjuntiva. Se presenta enantema blanco o beige.
- Candidosis sistémica: los signos y síntomas que se presentan son inespecíficos, por lo que se suele confundir con infecciones bacterianas o de otro origen. En la candidosis sistémica por lo regular se presenta fiebre irregular, adinamia, astenia y mal estado general; esta sintomatología se acompaña de la que se ocasiona por el sistema u órgano dañado. Ejemplos de la candidosis sistémica son la candidosis gastroesofágica, en la cual los pacientes presentan hemorragia gástrica, disfagia, vómito, y dolor retroesternal intenso; y la candidosis pulmonar, en la que se presenta síndrome neumónico que se caracteriza por tos, dolor torácico, disnea y esputo blanquecino.

6. Diagnóstico de Laboratorio

Existen distintas pruebas que son utilizadas para el diagnóstico de laboratorio, entre las cuales se encuentran las siguientes:

7. *Examen directo*. Este es un procedimiento que se utiliza para observar levaduras, hifas y/o pseudomicelio en muestras patológicas líquidas o semilíquidas, como exudados, orina, líquido cefalorraquídeo o esputo. Se utiliza para realizar la observación al microscopio óptica de contrataste de fase para de esta manera poder observar el contorno de las estructuras fúngicas.
8. *Frotis*. Se puede realizar en cualquier espécimen patológico excepto en escamas, piel y uñas. El frotis se tiñe con la técnica de Gram o preferentemente con la técnica de PAS. Se pueden observar con estas técnicas levaduras de forma redonda o alargada mezclada con filamentos que son Gram positivos, o en el caso de la técnica de PAS se observan con coloración roja.
9. *Cultivo*. Se siembran los productos patológicos en agar dextrosa Sabouraud. Se incuban a una temperatura de 25 a 30°C por 5 días, en este periodo se desarrollan colonias cremosas blanco-amarillentas, lustrosas, poco elevadas y con bordes bien definidos. También se siembran en agar BIGGY (Nickerson), el cual contiene citrato de bismuto amónico y sulfito de sodio, los cuales son reducidos por algunas especies de *Candida*, por lo que las colonias según la especie, crecen con diferentes tonalidades de marrón.

Existen otras pruebas especiales que se utilizan para diferenciar a las diversas especies de *Candida*, las que se usan con mayor frecuencia son las siguientes:

10. *Producción de clamidoconidios*. Se siembran en estría las colonias de *Candida* en agar harina de maíz, en harina de arroz o en agar clamidospora. Después de 3 a 5 días se observan con facilidad al microscopio los clamidoconidios producidos intercaladamente o en los ápices de hifas, acompañados de pseudomicelio y blastoconidios, característica que identifica a *C. albicans* y a *C. dubliniensis*.
11. *Filamentación en suero humano a 37 °C*. Se siembra una asada de la muestra en 0.5 ml de suero humano o de conejo fresco y se incuba a 37 °C durante cuatro horas después de las cuales, en caso de tratarse de *C. albicans* o *C. dubliniensis*, se observa al microscopio el crecimiento de las levaduras produciendo un tubo germinativo, primordio de lo que será la hifa.

12. *Agares cromogénicos*. Estos son medios comerciales que contienen sustancias cromógenas que dan a las colonias una coloración particular en algunas especies de *Candida*. La coloración de las colonias dependerá de la marca del agar utilizado.
13. *Auxanograma*. Existen dos tipos de auxanogramas, el del nitrógeno y el del carbono. Este último es el más utilizado. Por medio del patrón de asimilación de azúcares se identifican los diferentes géneros de levaduras, así como también las diferentes especies de *Candida*.

En los casos de candidosis sistémicas la serología es de gran utilidad, por lo cual se usan pruebas inmunológicas, entre las cuales se encuentran la doble inmunodifusión de Ouchterlony y la contrainmunolectroforesis, ambas en búsqueda de Inmunoglobulina G vs. *Candida*. Actualmente, las firmas comerciales han desarrollado excelentes reactivos para elaborar la técnica de *ELISA*, que debido a su sensibilidad y especificidad es muy frecuentemente usada para identificar anticuerpos anti-mananas de *Candida* o mananas (antígeno), sobre todo en pacientes inmunocomprometidos.

Otra herramienta útil para el pronóstico del paciente, es la intradermorreacción, prueba de hipersensibilidad retardada que se efectúa inoculando 0.1 ml de candidina vía intradérmica en el paciente. Cuando la prueba es positiva no se considera con valor diagnóstico; sin embargo, junto con la aplicación intradérmica de otros antígenos, es útil para valorar el estado de la inmunidad celular de diversos tipos de pacientes. En casos de pacientes anérgicos que presentan candidosis diseminada, mucocutánea o granulomatosa, cuando la intradermorreacción es negativa, el pronóstico es grave.

7. Epidemiología y Factores de oportunidad

La candidosis invasiva está asociada con una elevada mortalidad y conlleva altos costos económicos. En general, la incidencia de sepsis debido a organismos fúngicos aumentó un 207% en los últimos 20 años, con una tendencia similar en pacientes pediátricos y pacientes adultos. La incidencia de candidemia varía ampliamente entre poblaciones con una incidencia de 1.9 a 10.0 por 10,000 sujetos reportados en diferentes poblaciones

observadas en diversos estudios. La candidemia es frecuentemente asociada con signos y síntomas de sepsis (Del Palacio et.al, 2009; Cugno y Cesaro, 2012).

Aunque el hongo más frecuentemente aislado en sangre es *C. albicans*, la epidemiología está cambiando con un incremento en los episodios causados por especies de *Candida* no *albicans* como *C. glabrata* ó *C. parapsilosis* según las áreas geográficas, *C. tropicalis* y con menor frecuencia *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* (Gómez et.al, 2010).

Los factores de oportunismo son múltiples y muchas veces pueden combinarse, en el caso de las infecciones de las mucosas tenemos ejemplos como el de la boca que está relacionado con la aplicación local de antibióticos o pérdida de espacio interdentario por uso inapropiado de prótesis o las formas intestinales se relacionan con el consumo de dietas abundante en carbohidratos. La gravedad de las infecciones depende principalmente de las alteraciones primarias del huésped más que de las propiedades patógenas del hongo (Arenas, 2008).

En el caso de la candidemia esta se origina como resultado de la interacción de varios factores como la patogenicidad y virulencia de *Candida* spp. , el sistema inmunológico del hospedero y el estado de colonización.

Existen diversos factores de riesgo que predisponen a la candidosis, ya sea favoreciendo la colonización de las mucosas o alterando el sistema inmune del huésped. Entre los principales factores de oportunismo según Figueras y colaboradores (2011), se encuentran:

- Colonización cutáneo-mucosa. En los recién nacidos de bajo peso se puede presentar colonización por *Candida* ligeramente mayor a lo normal.
- Antibioticoterapia de amplio espectro con una duración mayor a 5 días, que es un factor de oportunismo importante ya que destruye el ecosistema de la microbiota bacteriana, lo cual favorece la colonización de *Candida* y posterior invasión de la mucosa.

- Presencia de catéter venoso central. Es un factor de riesgo muy importante especialmente en pacientes críticos e inmunodeprimidos, sometidos a quimioterapias, trasplantes, con nutrición parenteral, entre otras.
- Hiperglucemia. Este también ha sido descrito como un factor de riesgo importante al favorecer el crecimiento fúngico y disminuir la capacidad defensiva del huésped, alterando la regulación de los genes de adhesión a proteínas y la capacidad del complemento para la opsonización.
- Pérdida de las barreras protectoras, como la barrera cutánea (por heridas o quemaduras) y la disminución de la acidez gástrica por empleo de inhibidores de la bomba de protones, que constituye un factor importante al favorecer el crecimiento fúngico en el aparato digestivo.
- Otros importantes factores de riesgo son la ventilación mecánica, la cirugía mayor abdominal, la pancreatitis aguda y la diabetes.
- Factores que afectan directamente la inmunidad del huésped como la corticoterapia, la neutropenia o la disfunción neutrofílica.

II. Antecedentes

1. Generalidades de los ITS

Los genes del DNA ribosomal (rDNA) se encuentran en el genoma de todos los microorganismos, se conocen por acumular mutaciones a una tasa constante y lenta. La heterogeneidad de las secuencias de nucleótidos dentro de esta región puede ser usada para clasificar microorganismos filogenéticamente. Los espaciadores que se encuentran entre las secuencias de genes altamente conservados de rDNA son regiones de secuencias variables llamadas regiones espaciadoras. La función de estas secuencias no se conoce completamente; sin embargo, estas son históricamente referidas como espaciadores que separan las secuencias de DNA funcional de los varios genes de rDNA. La heterogeneidad de estas secuencias ha sido utilizada para separación entre géneros y especies.

La organización del complejo de rDNA fúngico incluye una secuencia que codifica para el gen 18S rDNA, una región espaciadora del transcrito interno (ITS 1), la región codificante del gen 5.8S rDNA y otra región ITS, llamada ITS2 y la secuencia codificante para el gen 28S rDNA. Las regiones codificantes 18S, 5.8S y 28S de los genes de rDNA nucleares evolucionan lentamente y son relativamente conservadas entre hongos, proveyendo una base molecular para el establecimiento de relaciones filogenéticas. Entre estas regiones codificantes de rDNA, los ITS1 e ITS2 evolucionan más rápidamente llevando a una variabilidad entre las secuencias de los géneros y especies de hongos (Iwen *et.al*, 2002).

La homología dentro de las secuencias de los genes de rDNA de hongos (18S, 5.8S y 28S) y las diferencias dentro de las regiones espaciadoras (ITS1 e ITS2) son las bases genéticas para la organización de los hongos dentro de grupos taxonómicos (Iwen *et.al*, 2002).

Las regiones ITS1 e ITS2 las cuales flanquean al gen 5.8S, muestran una extensa diversidad en las secuencias entre los principales grupos de microorganismos eucariontes e incluso dentro de especies del mismo organismo. El tamaño de cada región varía alrededor de 1000pb en células humanas a <300pb en algunas levaduras. Se ha mostrado

también que las regiones espaciadoras son también importantes durante el proceso de transcripción de rRNA (Iwen *et.al*, 2002).

Las secuencias repetidas, como las de los genes 5.8S y sus regiones flanqueantes (ITS1 e ITS2) en *C. albicans*, pueden ser de especial interés como blancos de PCR; esto es especialmente cierto si las variaciones en la secuencia o la longitud de estas regiones ocurre entre miembros de un mismo género o especie.

2. Marco teórico

Chen y colaboradores (2000), evaluaron la detección de polimorfismos en la secuencia ITS2 de los genes de rRNA utilizando PCR como un medio para identificación de hongos. Utilizaron aislados clínicos, cepas de referencia y cepas tipo, las cuales representaron 34 especies de levaduras que fueron examinadas, especialmente del género *Candida*. Únicamente se obtuvieron productos de PCR especie- específicos que iban de 237 a 429 pb del 92% de los aislados clínicos. El 8% restante, se dividió en grupos con regiones ITS diferenciadas por un tamaño medio, menor o igual a 2pb; todas las secuencias especie- específicas de DNA fueron diferenciadas por análisis con enzimas de restricción. Concluyeron que el análisis del tamaño de los amplificadores y el análisis de restricción de la región ITS2 es un método rápido y confiable para identificar levaduras clínicamente significativas, incluyendo especies nuevas o potencialmente patogénicas (Chen *et. al*, 2000).

Leaw y colaboradores (2006), realizaron la identificación de levaduras de importancia médica por medio del análisis de las secuencias de las regiones ITS. Se amplificaron por PCR y se secuenciaron las regiones ITS1 e ITS2 de 373 cepas (86 especies), incluyendo 299 cepas de referencia y 74 cepas clínicas. Las secuencias se compararon con los datos de referencia disponibles en la base de datos GenBank utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para determinar si la identificación de especies fue posible gracias a la secuenciación de las regiones ITS. Los resultados obtenidos mostraron que la identificación de levaduras de importancia médica por medio de la secuenciación,

especialmente de la región ITS2, es confiable y puede ser utilizado como una alternativa molecular a los métodos de identificación convencionales (Leaw *et. al*, 2006).

También se han evaluado otros sistemas de identificación de especies patógenas del género *Candida*, utilizando otros sistemas de secuenciación, como el que utilizaron Wise y colaboradores (2007), que evaluaron el sistema DiversiLab, que usa las secuencias palindrómicas repetitivas como una herramienta de tipificación molecular. Analizaron 41 aislados clínicos de *Candida* spp, que fueron previamente identificados con métodos morfológicos y moleculares a nivel de especie. La identificación de especies fue confirmada por secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2. A partir del rep-PCR, con base en un umbral del 80% de similitud se agruparon de manera consistente como especie este conjunto de cepas junto con cinco cepas de referencia ATCC, las cuales se usaron para crear una biblioteca de DNA fingerprinting con el software DiversiLab.

Subsecuentemente, ese mismo grupo de investigadores, tipificaron un conjunto de 115 aislados de *Candida* usando el sistema DiversiLab, los cuales habían sido identificados bioquímicamente. Ciento seis de estos aislados fueron agrupados con miembros de la biblioteca, ya que presentaron una similitud mayor al 80% y de este modo se les pudo asignar su identificación a nivel de especie. Los cálculos iniciales mostraron que la identificación por medio de rep-PCR fingerprinting fue concordante en un 95% (101/106) con la identificación bioquímica/morfológica. Sin embargo, la secuenciación de la región ITS de las cinco muestras discrepantes, mostraron que estas fueron mal identificadas con los métodos bioquímicos/morfológicos. Para las muestras mal identificadas, la identificación basada en la secuenciación estuvo en concordancia con el agrupamiento obtenido con DiversiLab, obteniendo una correlación mayor a 90%. Con lo cual mostraron en miembros del género *Candida*, que el sistema DiversiLab proporciona una identificación más rápida que los métodos tradicionales y que por tanto el sistema puede ser usado en estudios epidemiológicos (Wise *et. al*, 2007).

Otro método de secuenciación fue usado por Boyanton y colaboradores (2008), que probaron la pirosecuenciación de DNA de la región ITS2 como estrategia para la identificación de especies patógenas de *Candida* asociadas con infecciones en humanos, para lo cual utilizaron 51 aislados clínicos y 9 aislados comerciales de *Candida* que fueron identificadas en un estudio paralelo que consistió en el análisis bioquímico y cultivo fúngico de rutina, el cual fue comparado con la pirosecuenciación de DNA. La

pirosecuenciación de DNA de los 60 aislados de *Candida* proporcionó la identificación a nivel de especie y la interpretación de las secuencias concordó con los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y morfológicas. Los métodos automatizado y manual para la interpretación de las secuencias de DNA, cada uno acoplado con el software de identificación Identifire, demostraron un 100% de concordancia con la identificación de las especies de *Candida*. Veintiún aislados mostraron diferencias intraespecíficas en sus secuencias de DNA (90-98% de identidad de secuencias de nucleótidos) por interpretación automatizada. La diferencia de las secuencias resultó del polimorfismo de un único nucleótido o adiciones/delecciones de una sola base. Con base en estos estudios concluyeron que la pirosecuenciación acoplada con el alineamiento de las secuencias provee un enfoque práctico y oportuno de patógenos del género *Candida* (Boyanton *et.al*, 2008).

Shokohi y colaboradores (2010), identificaron especies de *Candida* de pacientes con cáncer usando PCR- RFLP, para ello utilizaron los *primers* universales ITS1 e ITS4 para amplificar la región de rDNA ITS1-5.8S-ITS2 de 80 aislados clínicos y 3 cepas tipo. Los productos de PCR fueron digeridos con dos enzimas, *MspI* y *BlnI* por separado, con lo cual pudieron identificar exitosamente las especies de todos los aislados; siendo *C. albicans* la especie más común (75%), seguida de *C. glabrata* (15%), *C. tropicalis* (5%), *C. krusei* (2.5%). Aunque los *primers* y las enzimas tenían la capacidad para identificar *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*, estas especies no estuvieron presentes en los aislados. Concluyeron que el PCR- RFLP usando los *primers* ITS1 e ITS4 es rápido, fácil, confiable y aplicable en el laboratorio clínico para identificación de *Candida* spp médicamente importantes (Shokohi *et. al*, 2010).

Otros autores han realizado estudios para diferenciar intraespecíficamente a *Candida albicans*, utilizando otras regiones de su genoma, como lo hicieron Miyakawa y Ozawa (2009), quienes encontraron polimorfismos en la región de DNA especie específica EO3 del DNA mitocondrial; este fragmento puede presentar tres tipos de secuencias: L, M, y S. Este polimorfismo se debe a la presencia o ausencia de dos pequeñas secuencias de nucleótidos de ~ 50pb (designadas **a** y **b**) dentro de la región EO3: el tipo L posee tanto **a** como **b**, el tipo M posee solo **a**, y el tipo S no presenta ni **a** ni **b**; además, ellos encontraron en EO3 otro tipo de M el cual presenta **b** pero no **a**, al cual designaron MII. Por medio de análisis de restricción con *BglII*, revelaron que podían distinguir los cuatro tipos dentro de EO3: L, M-I, M-II, y S; con lo cual ellos sugieren que estos podrían tener utilidad

epidemiológica como una herramienta alternativa para la detección especie- específica de *C. albicans* (Miyakawa y Ozawa, 2009).

Respecto a estudios intraespecíficos a nivel molecular utilizando la región ITS1-5.8S-ITS2 como blanco de análisis, no se ha encontrado ningún trabajo reportado al respecto, por lo cual consideramos importante este trabajo pues en este se enfoca en ello.

III. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones hospitalarias causadas por hongos del género *Candida* han tenido un incremento en las últimas décadas y el principal responsable de dichas infecciones ha sido *Candida albicans*. Una interrogante que permanece dentro del panorama epidemiológico de las infecciones intrahospitalarias, es conocer el riesgo de desarrollar candidosis sistémica en pacientes hospitalizados por causa de las levaduras que forman parte de la biota normal comensal del personal a cargo de los pacientes. Para esclarecer la situación, varios estudios se han publicado acerca de las diferencias a nivel fenotípico y de sensibilidad antifúngica, que muestran aislados de *C. albicans* de diferentes orígenes y los resultados indican que por esos métodos es difícil discernir si el aislamiento representa a una levadura patógena causante de infección exógena o si se trata de una levadura comensal. Ya que pocos estudios se han enfocado a la caracterización molecular de la levadura en cuestión, el presente trabajo se centra en investigar las semejanzas y diferencias intra-específicas significativas, entre aislados de *Candida albicans* obtenidos de las muestras patológicas de pacientes hospitalizados y aquellos obtenidos a partir del personal paramédico a cargo de los pacientes.

IV. HIPÓTESIS

Si los aislados de *Candida albicans* obtenidos de pacientes y personal paramédico presentan variaciones en su genomas que puedan ser identificadas mediante la comparación de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2, entonces podemos utilizar esa cualidad para establecer la relación entre el biotipo virulento y el biotipo comensal y así poder interpretar si existe, en este caso, infección exógena personal- paciente.

V. OBJETIVOS

GENERAL

- Investigar las diferencias y semejanzas de dos regiones específicas del genoma, entre aislados comensales y patógenos de *Candida albicans*.

PARTICULARES

- Analizar el genoma de aislados de *Candida albicans* provenientes de especímenes patológicos y exudados faríngeos de personas aparentemente sanas.
- Amplificar mediante PCR las regiones ITS1 e ITS2 del genoma de los aislados de *Candida albicans*.
- Secuenciar los productos obtenidos.
- Mediante el análisis bioinformático de las secuencias, establecer la relación entre los aislados de los pacientes y personal a cargo de los mismos.
- Evaluar el poder de discriminación de la técnica utilizada a través del análisis de las construcciones filogenéticas obtenidas
- Conocer mediante el análisis efectuado si *Candida albicans* puede ser adquirida de una fuente exógena.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de aislados

A partir de un lote de 208 cultivos de *Candida* spp, provenientes de productos patológicos de pacientes, los cuales fueron solicitados al Laboratorio de Microbiología del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE se escogieron los aislados que cumplieran con la característica de provenir sólo de muestras biológicas que implicaran infección profunda (sangre, orina , líquidos de lavados bronquiales, etc.).

A partir de un muestreo practicado al personal de la Unidad de Cuidados intensivos del CMN, se obtuvieron 30 cultivos de *Candida* spp, crecidos a partir del raspado de manos y exudado faríngeo.

Todos los aislados fueron previamente identificados como *Candida* spp mediante la siembra de los productos biológicos en los agares cromogénicos *Candida* ID2® y ChromAgar *Candida*®, y se identificaron a nivel de especie con pruebas bioquímicas y fisiológicas (filamentación en suero humano a 37°C, producción de clamidoconidios en agar harina de maíz Tween 80, siembra en agar Niger y auxanograma automatizado Vitek®)¹

Del total de los aislados provenientes de productos patológicos se escogieron 16 que fueron identificados como *C. albicans* y cumplieron con las características antes mencionadas. De los obtenidos del personal se escogieron solo 13 aislados que fueron identificados también como *C. albicans*.

¹ Ver Anexo de pruebas bioquímicas y fisiológicas.

2. Identificación morfo-fisiológica

Para todos los estudios realizados se utilizó como referencia la cepa de *Candida albicans* ATCC 90026, proporcionada por la Dra. Patricia Manzano del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, UNAM.

Para confirmar la identificación como *Candida albicans* de los aislados, se procedió a efectuar nuevamente pruebas bioquímicas y fisiológicas (filamentación en suero humano a 37°C y producción de clamidoconidios en agar harina de maíz Tween 80)

3. Extracción de DNA

Todos los aislados se crecieron en agar dextrosa Sabouraud durante 48 horas, una vez transcurrido este tiempo se cosechó la levadura crecida con un asa bacteriológica, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 50 µl de agua y se le agregaron perlas de vidrio (Sigma, acid-washed, 425-600µm), posteriormente se procedió a homogeneizar con el vórtex vigorosamente; para proceder a realizar la extracción de DNA.

La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy Plant MiniKit de la marca Qiagen® siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante con algunas modificaciones.

Una vez homogeneizadas las levaduras, se agregaron 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNasa A (solución stock [100 mg/ml]) y se agitó en el vórtex vigorosamente. Se incubó la mezcla a 65°C por 10 minutos, durante la incubación se agitó por inversión 2 veces. Después de la incubación se agregaron 130 µl de buffer AP2, se mezcló y se incubó en hielo 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos.

A continuación se transfirió el sobrenadante dentro de una columna QIAshredder Mini Spin colocada en un tubo colector de 2 ml y se centrifugó por 2 minutos a 13 000 rpm. El líquido filtrado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, teniendo cuidado de no

perturbar la pastilla del fondo, a ésta se le agregaron 1.5 volúmenes de buffer AP3/E y se mezcló con la micropipeta. Se transfirieron 650 µl de la mezcla anterior en una columna DNeasy mini spin colocada dentro de un tubo colector de 2 ml y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm, se descartó el líquido colectado y se repitió el paso anterior con la mezcla restante. Se colocó la columna en un tubo colector de 2 ml nuevo, se agregaron 500 µl de buffer AW y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm; se descartó el líquido colectado y se agregaron nuevamente 500 µl de buffer AW a la columna, se centrifugó por 2 minutos a 13 000 rpm para secar la membrana de la columna.

Después de la centrifugación, se removió la columna DNeasy mini spin del tubo colector cuidadosamente para que no entrara en contacto con el filtrado y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml; se le agregó a la columna 100 µl de buffer AE directamente dentro de la membrana, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm para eluir el DNA. Se almacenó a -20°C.

4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA, usando los primers universales ITS1 (forward 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (reverse 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Con las siguientes condiciones de amplificación reportadas por Shokohi y colaboradores (2010).

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
PCR buffer	10X	1X	5µl
MgCl ₂	50mM	1.5mM	1.5µl
dNTPs*	5mM	0.125mM	1.25µl
ITS1	25µM	0.5mM	0.5µl
ITS4	25µM	0.5mM	0.5µl
Taq DNA polimerasa*	0.5U/µl	0.5U/µl	0.1µl
DNA	-	-	2µl
H ₂ O	-	-	39.15µl

*Los dNTPs y la Taq DNA polimerasa utilizada fueron de la marca Invitrogen®

El PCR se realizó usando un termociclador de la marca Corbett Research modelo CG1-96. Los parámetros de amplificación fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos			
35 ciclos					
Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
94°	1 min	56°C	1 min	72°C	1 min
Extensión final		72°C		7 min	

El tamaño esperado del producto de PCR fue de 535 pb.

5. Electroforesis en gel de agarosa y purificación del DNA

Para visualizar el resultado de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) utilizando regulador TAE 1X, tanto para la preparación como para la corrida. Se utilizó también bromuro de etidio (10 mg/ml; 5 µl para 100 ml de agarosa) en la preparación del gel. En el gel se cargaron 5 µl del producto de PCR mezclado con 1 µl de buffer de carga. Se utilizó un marcador molecular de 100 pb. El gel se corrió a 90 volts por 1 hora.

Todos los procedimientos antes mencionados se realizaron en el Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

6. Secuenciación

El DNA amplificado de las muestras se purificó utilizando el kit QIAquick PCR Purification® de Qiagen siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Posteriormente se procedió a la secuenciación de los mismos, para ello las muestras fueron enviadas al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

7. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se llevó a cabo con la colaboración de la M. en C. Fabiola Ramírez Corona del Taller de Sistemática y Biogeografía de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Se verificaron y editaron los electroferogramas de cada una de las secuencias obtenidas con el programa BioEdit Versión 7.0.9, para su posterior alineamiento con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), esto con el fin de compararlas con las secuencias de la base de datos del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.gov>) y encontrar las secuencias con las que presentaban una mayor similitud.

Para alinear todas las secuencias ya editadas se utilizó Clustal W a través del programa Mega versión 5 (Tamura *et. al*, 2011). Una vez realizado el alineamiento se realizó la matriz de distancia genética utilizando el método p-distance y se generaron los árboles, también utilizando Mega versión 5 (Tamura *et. al*, 2011).

VII. Resultados

1. Selección de aislados

Del total de aislados obtenidos, sólo 29 de ellos cumplieron con los requisitos necesarios para ser incluidos en el estudio. En el cuadro 2 se anotan las características generales de los 30 aislados estudiados, incluyendo la cepa de referencia ATCC 90026.

No.	Clave	A partir de	Fecha primo-aislamiento	Diagnóstico principal
1	ATCC 90026		Cepa de referencia	
2	41	Urocultivo	14/12/2007	Cálculo de riñón
3	48	Urocultivo	Desconocido	Desconocido
4	51	Urocultivo	17/06/2008	Infección de vías urinarias
5	63	Urocultivo	23/01/2008	Leucemia linfocítica crónica
6	66	Urocultivo	05/01/2008	Cólico renal
7	67	Punta de Catéter	30/12/2007	Pólipos
8	70	Urocultivo	13/01/2008	Acidosis
9	80	Urocultivo	19/05/2008	Osteoporosis ideopática
10	81	Urocultivo	20/06/2008	Choque hipobulémico
11	87	Urocultivo	04/02/2008	Hernia abdominal
12	90	Escaras	06/02/2008	Úlcera gástrica con HTDA*
13	97	Urocultivo	31/03/2009	Cardiopatía isquémica
14	98	Urocultivo	22/05/2008	Control prenatal
15	173	Lavado Bronquial	28/07/2008	Síndrome de choque tóxico
16	197	Hemocultivo	Desconocida	Desconocido
17	198	Hemocultivo	19/09/2008	Cardiopatía hipertrófica
18	F131	Exudado faríngeo	14/03/2007	Paciente hospitalizado
19	F14A	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
20	F14B	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
21	E5V	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
22	E14V	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
23	E2N	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
24	E3N	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
25	E4N	Exudado faríngeo	07/03/ 2007	Biota normal
26	E8N1A	Exudado faríngeo	26/02/2007	Biota normal
27	E8N1B	Exudado faríngeo	26/02/2007	Biota normal
28	E10N	Exudado faríngeo	26/02/2007	Biota normal
29	E12A	Exudado faríngeo	26/02/2007	Biota normal
30	702EX	Exudado faríngeo	26/02/2007	Biota normal

Cuadro 2. Características de la procedencia de los aislados utilizados en este estudio.

* HTDA (Hemorragia del tubo digestivo alto)

2. Identificación morfo-fisiológica.

Los 29 aislados fueron positivos a las pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas (Figs. 1 y 2) confirmando su identificación como *Candida albicans*.

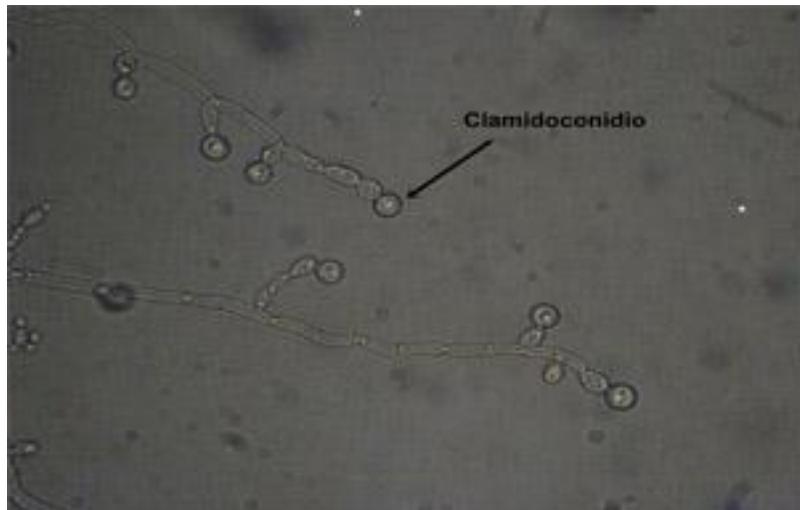


Figura 1. Formación de clamidoconidios en agar harina de maíz Tween 80.



Figura 2. Filamentación en suero humano a 37°C.
Formación de tubo germinativo

3. Amplificación de DNA por PCR y purificación de los productos.

A partir del DNA genómico extraído, se amplificó la región ITS1-5.8S-ITS2 utilizando los *primers* universales de hongos ITS1 e ITS4, con los cuales se obtuvo un producto de un tamaño de 535 pb (Figura 3). Los productos obtenidos fueron purificados para ser secuenciados (Figura 4).

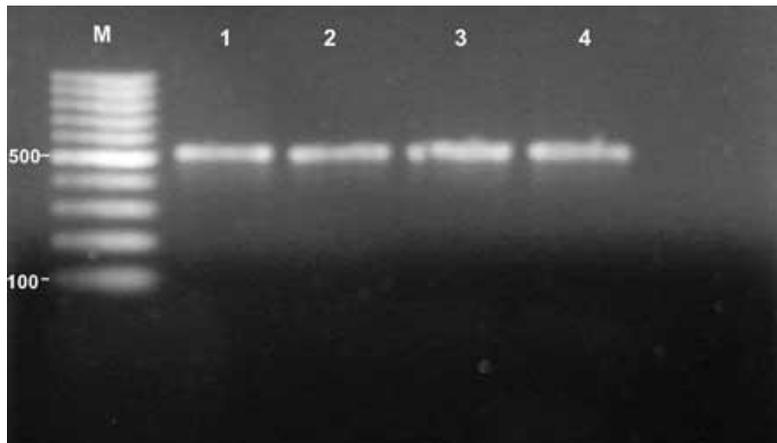


Figura 3. Amplificados. M: Marcador 100 pares de bases (pb), 1-4: muestras amplificadas.

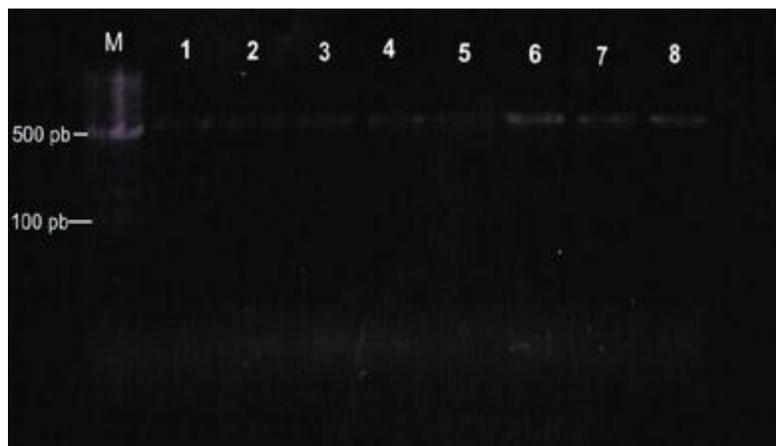


Figura 4. Amplificados purificados. M: Marcador 100 pb, 1-8: muestras amplificadas y purificadas.

4. Análisis Bioinformático

4.1 Comparación de las secuencias obtenidas con secuencias del GenBank

Todas las muestras que fueron seleccionadas habían sido identificadas previamente como *Candida albicans* por métodos fisiológicos y bioquímicos, sin embargo al comparar las secuencias usando la herramienta BLAST se observó que dos de ellas (correspondientes a las muestras con clave 87 y 98) alinearon con otra especie de *Candida*, resultando ser *Candida parapsilosis*, presentando un porcentaje de identidad con la secuencia de la base de datos de esta especie de 99% y un *E-value* de cero, lo cual señala una completa similitud con dicha especie, ya que cuanto más cercano a cero sea este valor, más parecidas son ambas secuencias. Todas las demás secuencias de las muestras se alinearon con secuencias de *Candida albicans* en un porcentaje de entre 97 y 100% de similitud, y un *E-value* de cero, confirmando la identificación; sin embargo, la secuencia con la clave 90 aunque se alineó con secuencias de *C. albicans* presentó un porcentaje de identidad de 79% y un *E-value* mayor a cero (Ver Cuadro 3).

No.	Clave	% de cobertura	E-value	% de identidad	Especie con que alinea	No. De accesión	Región con que alinea	% de gaps
1	ATCC 90026	68%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	GQ280317.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
2	41	92%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
3	48	75%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	GQ280317.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
4	51	93%	0.0	97%	<i>Candida albicans</i>	JF736843.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
5	63	79%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	GQ280317.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
6	66	75%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
7	67	70%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	HQ014717.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
8	70	69%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	DQ231530.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
9	80	68%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	DQ231530.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
10	81	82%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	FJ662399.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
11	87	68%	0.0	99%	<i>Candida parapsilosis</i>	FJ662416.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
12	90	76%	1e-81	79%	<i>Candida albicans</i>	FJ662402.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
13	97	70%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	FJ662400.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
14	98	76%	0.0	99%	<i>Candida parapsilosis</i>	FJ662412.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
15	173	84%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	JN606273.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
16	197	84%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	GU319987.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
17	198	83%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	GQ280317.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
18	F131	79%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
19	F14A	83%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
20	F14B	84%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
21	E5V	84%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
22	E14V	79%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	FJ662400.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
23	E2N	84%	0.0	100%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
24	E3N	67%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	GQ280305.2	ITS1-5.8S-ITS2	0%
25	E4N	68%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
26	E8N1A	84%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
27	E8N1B	77%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	1%
28	E10N	76%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	HQ014713.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%
29	E12A	73%	0.0	98%	<i>Candida albicans</i>	FJ 619278.1	ITS1-5.8S-ITS2	1%
30	702EX	69%	0.0	99%	<i>Candida albicans</i>	JN606307.1	ITS1-5.8S-ITS2	0%

Cuadro 3. Datos obtenidos por medio de BLAST

4.2 Reconstrucción filogenética.

Una vez analizadas las secuencias por medio del BLAST, se procedió a realizar el alineamiento múltiple usando Clustal W. Para los análisis llevados a cabo se utilizó MEGA 5 (Tamura *et. al*, 2011). Se construyó una matriz de distancias genéticas, que es una matriz de distancia pareada. En la matriz las secuencias mostraron valores menores a 0.1; en algunos casos, los valores fueron de cero, excepto en el caso de las muestras con clave 87 y 98 (identificada como *C. parapsilosis* por medio del BLAST), y 90 (identificada como *C. albicans*) en las que los valores obtenidos fueron mayores a 0.1 (Figura 5). Esto concuerda con los datos obtenidos con el BLAST que indican que existe diferencia entre estas tres muestras con respecto a las demás.

Para la construcción de los árboles, se eligieron métodos de distancia y criterios de optimización, a los cuales se les aplicaron diferentes modelos y parámetros (cuadro 4) para comparar la relación filogenética obtenida con los mismos. A estos se les aplicó el procedimiento de bootstrap con 1000 repeticiones.

Método de Distancia	Modelos/métodos
Neighbor Joining	- Jukes- Cantor - Kimura de 2 parámetros - Tamura- Nei - p- distance
UPGMA (Unweighted pair-group method of arithmetic means)	- p- distance
Criterio de optimización	Modelos/métodos
Máxima verosimilitud	-Tamura- Nei

Cuadro 4. Métodos de distancia, criterios de optimización y modelos utilizados en la construcción de los árboles filogenéticos.

Con todos los métodos se obtuvieron reconstrucciones filogenéticas con agrupamientos similares (Figuras 6- 11).

En todos los casos se agrupan a las secuencias identificadas como *C. parapsilosis* juntas (secuencias con clave 87 y 98) con valores de apoyo de la rama de 100, en tanto que la secuencia con clave 90 no se agrupó con ninguna de las otras secuencias. Las demás secuencias tanto de pacientes como de personal paramédico se agrupan juntas, lo que indica que existe relación entre ambos tipos de secuencias (comensales y virulentas). Se obtuvieron valores de apoyo mayores al 50% para la mayoría de los agrupamientos, lo cual proporciona un soporte más para la relación propuesta.

Se agregó un grupo externo para enraizar los árboles filogenéticos, el grupo externo que se usó fue *Saccharomyces cerevisiae* número de accesoión del GenBank U09327.1. En los casos en que se usaron los métodos de distancia UPGMA y Neighbor Joining con el método p-distance, y el criterio de optimización de máxima verosimilitud con el modelo Tamura-Nei las topologías de los árboles se mantuvieron iguales con respecto a las de los árboles construídos sin grupo externo. Cuando se usó el método de Neighbor Joining con los modelos de Jukes-Cantor, Kimura de 2 parámetros y Tamura- Nei, aunque las topología son similares en este caso la secuencia de la muestra 90 si se agrupa con las demás secuencias de *Candida albicans*, pues la rama de la secuencia 90 se une con la rama del *cluster* de las secuencias de pacientes y personal paramédico (Figuras 12-14).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1. ATCC																															
2. 41	0.004																														
3. 48	0.000	0.004																													
4. 51	0.004	0.007	0.004																												
5. 63	0.000	0.004	0.000	0.004																											
6. 66	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004																										
7. 67	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004																									
8. 70	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004																								
9. 80	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000																							
10. 81	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.007	0.007																						
11. 87	0.127	0.124	0.127	0.124	0.127	0.124	0.127	0.124	0.124	0.124																					
12. 90	0.265	0.261	0.265	0.265	0.265	0.261	0.265	0.261	0.261	0.265	0.290																				
13. 97	0.004	0.007	0.004	0.007	0.004	0.007	0.004	0.007	0.007	0.007	0.131	0.265																			
14. 98	0.127	0.124	0.127	0.124	0.127	0.124	0.127	0.124	0.124	0.124	0.000	0.290	0.131																		
15. 173	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.004	0.004	0.127	0.265	0.004	0.127																	
16. 197	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004																
17. 198	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.000	0.004	0.004	0.004	0.127	0.265	0.004	0.127	0.000	0.004															
18. F131	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004														
19. F14A	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000													
20. F14B	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000												
21. E5V	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000											
22. E14V	0.004	0.007	0.004	0.007	0.004	0.007	0.004	0.007	0.007	0.007	0.131	0.265	0.000	0.131	0.004	0.007	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007										
23. E2N	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007								
24. E3N	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000							
25. E4N	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000						
26. E8N1A	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000					
27. E8N1B	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000				
28. E10N	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
29. E12NA	0.004	0.007	0.004	0.007	0.004	0.007	0.004	0.007	0.007	0.007	0.131	0.265	0.000	0.131	0.004	0.007	0.004	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007
30. 701EX	0.004	0.000	0.004	0.007	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.007	0.124	0.261	0.007	0.124	0.004	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007

Figura 5. Matriz de distancias genéticas.

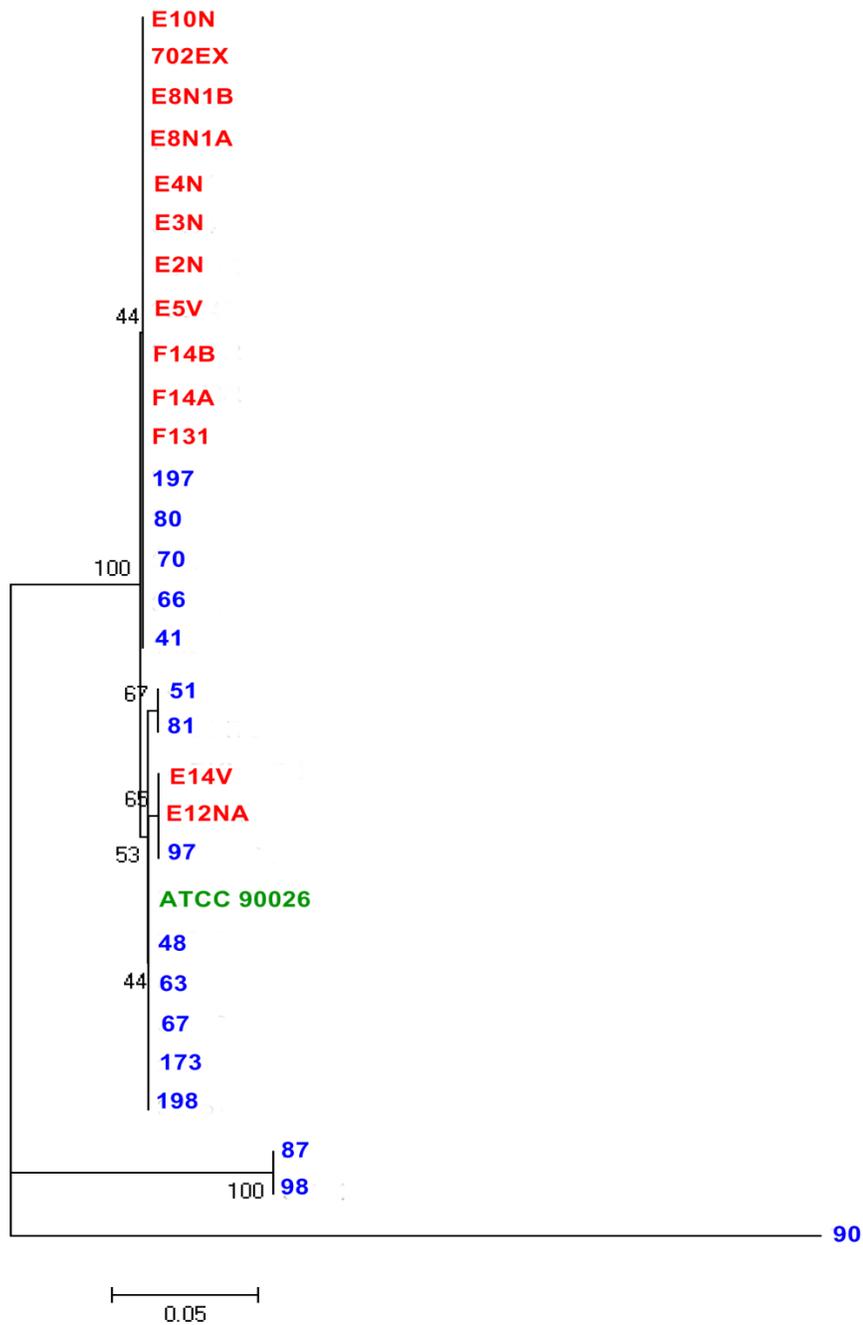


Figura 6. Neighbor Joining, con el modelo Jukes- Cantor. Bootstrap 1000 repeticiones.
■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia

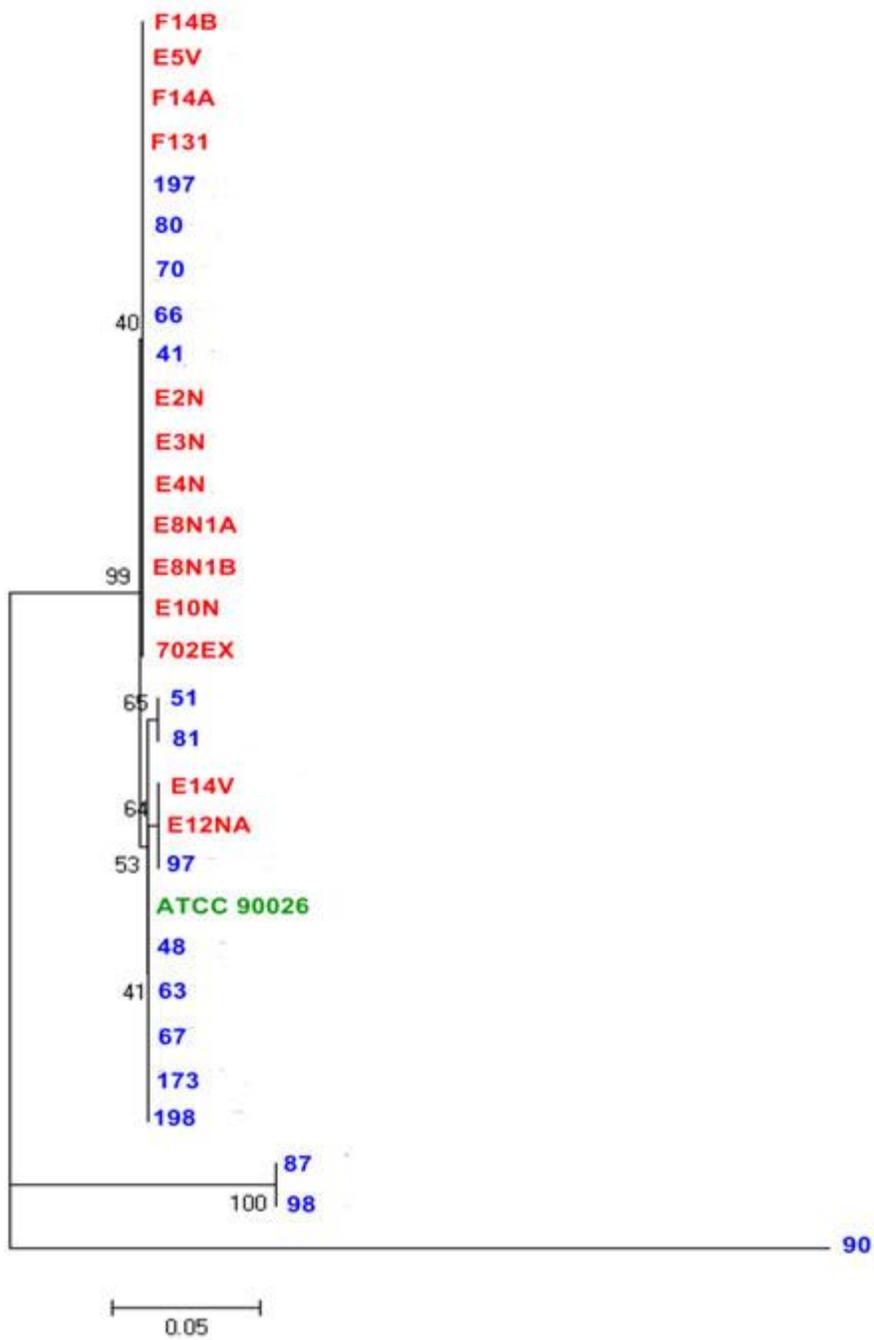


Figura 7. Neighbor Joining, con el modelo Kimura de 2 Parámetros. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia

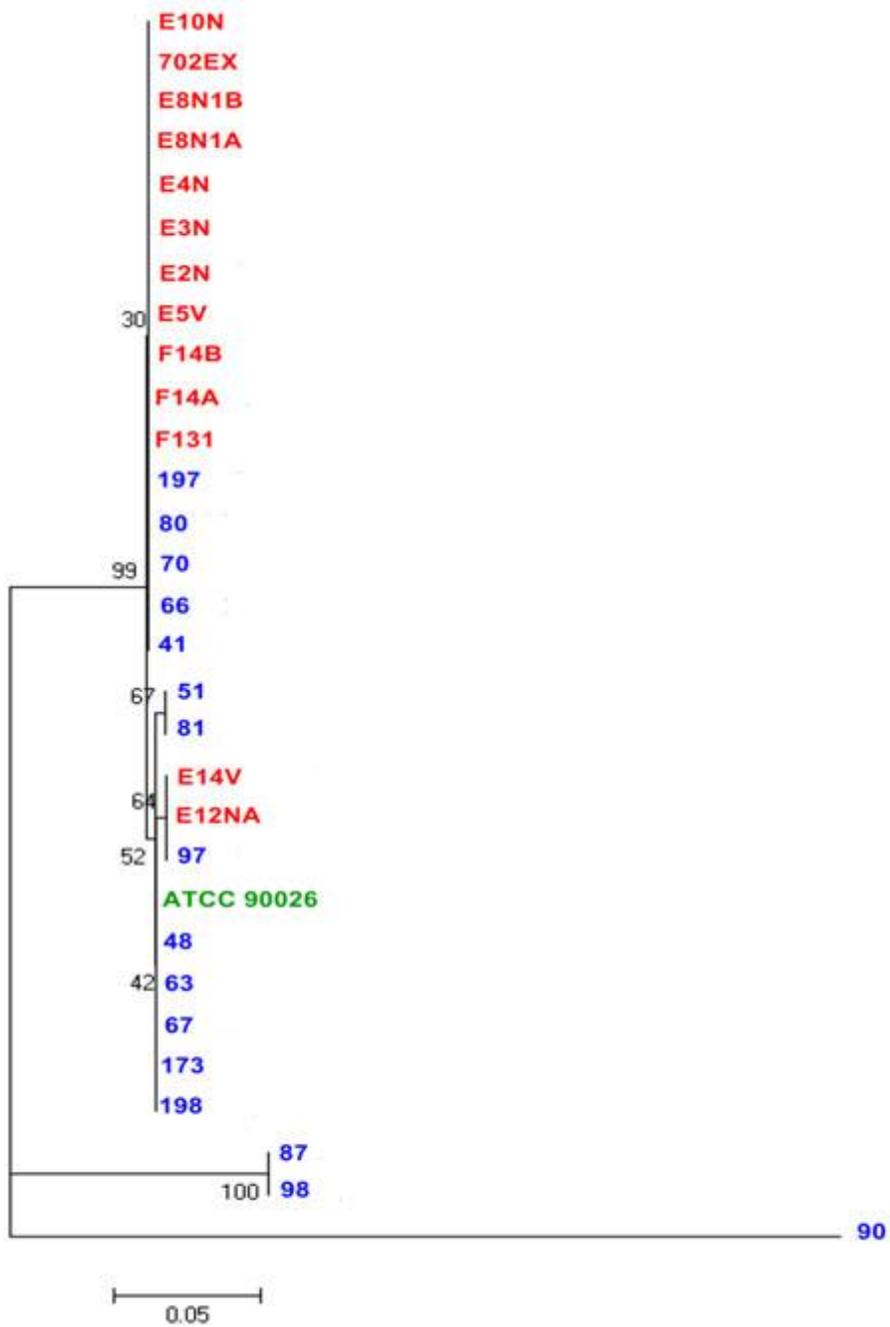


Figura 8. Neighbor Joining, con el modelo Tamura- Nei. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia

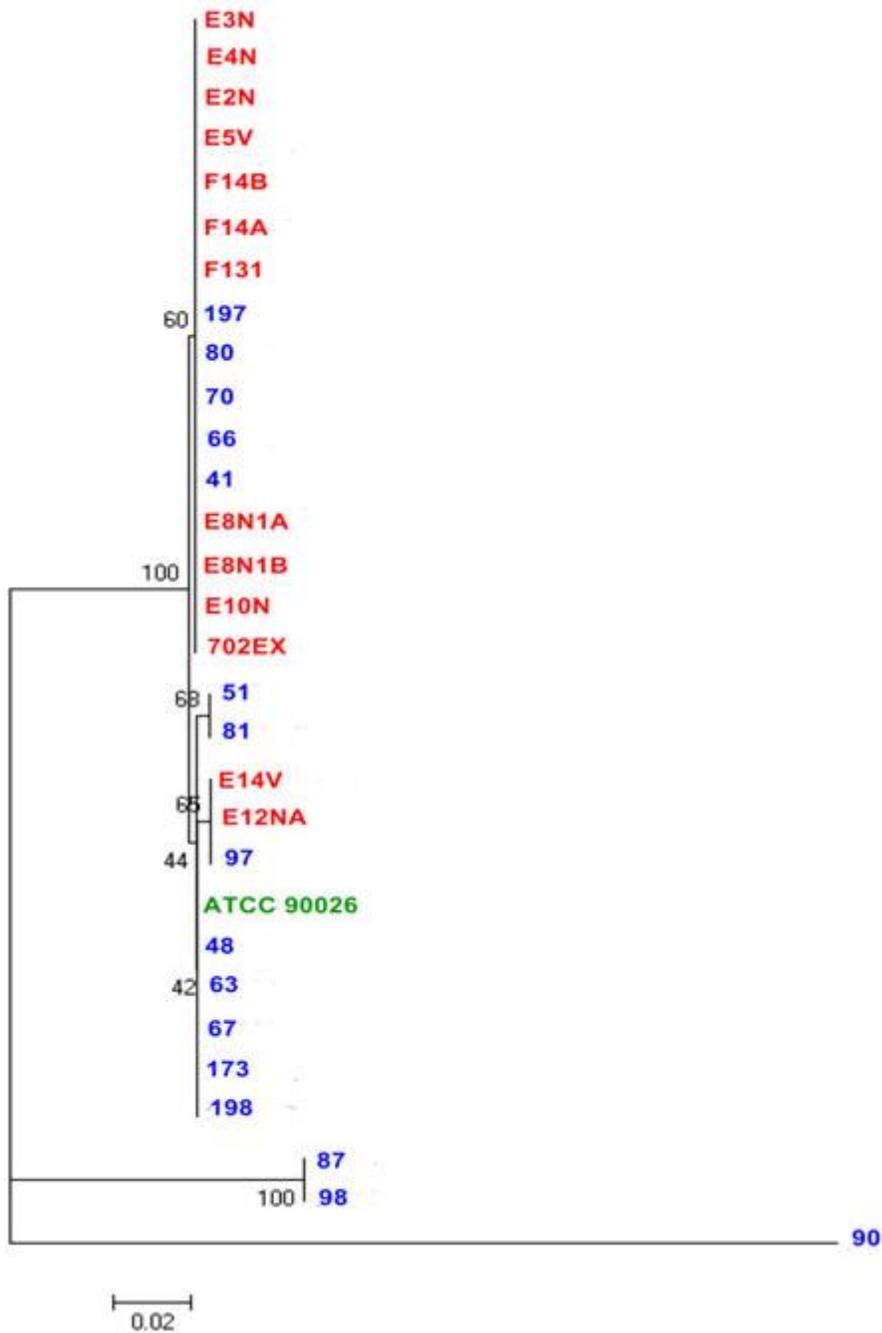


Figura 9. Neighbor Joining, con el método p-distance. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia

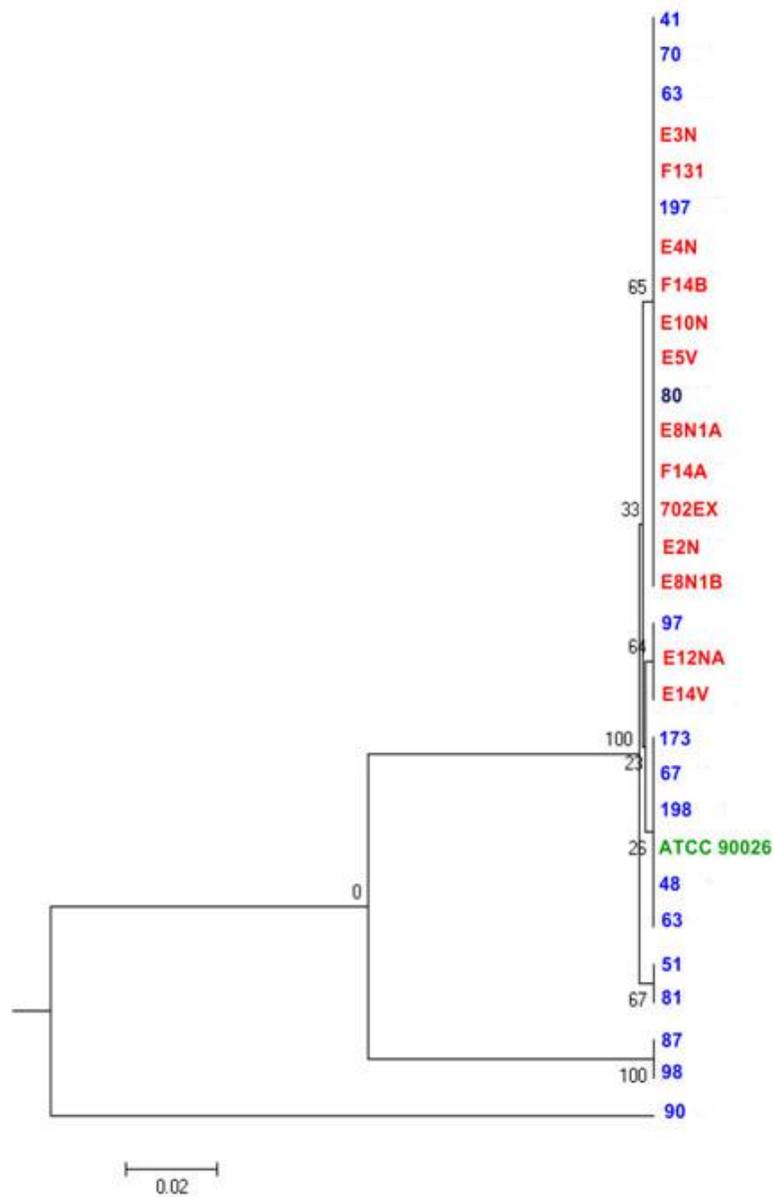


Figura 10. UPGMA, con el método p-distance. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia

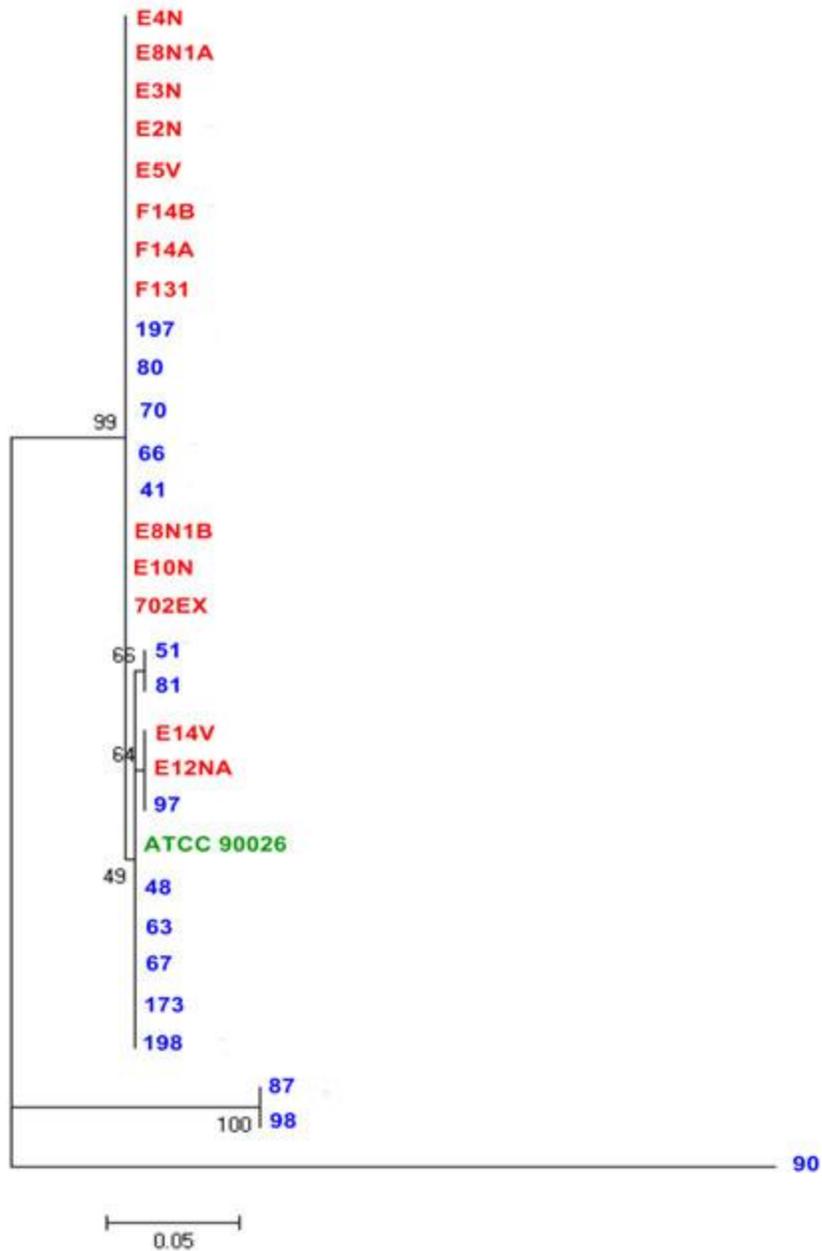


Figura 11. Máxima verosimilitud, con el modelo Tamura- Nei. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia

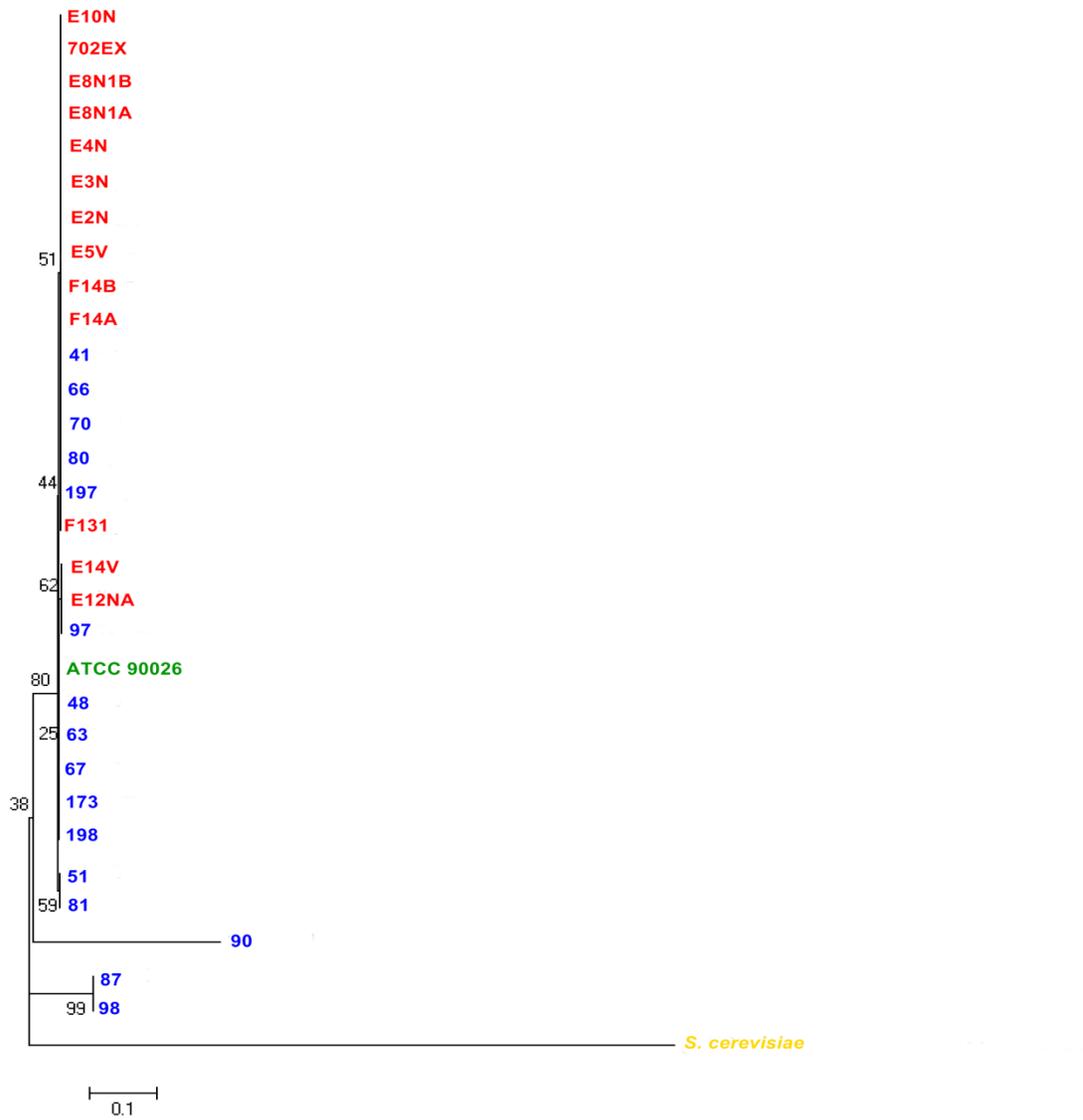


Figura 12. Neighbor Joining, con el modelo Jukes- Cantor. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia ■ *S. cerevisiae*

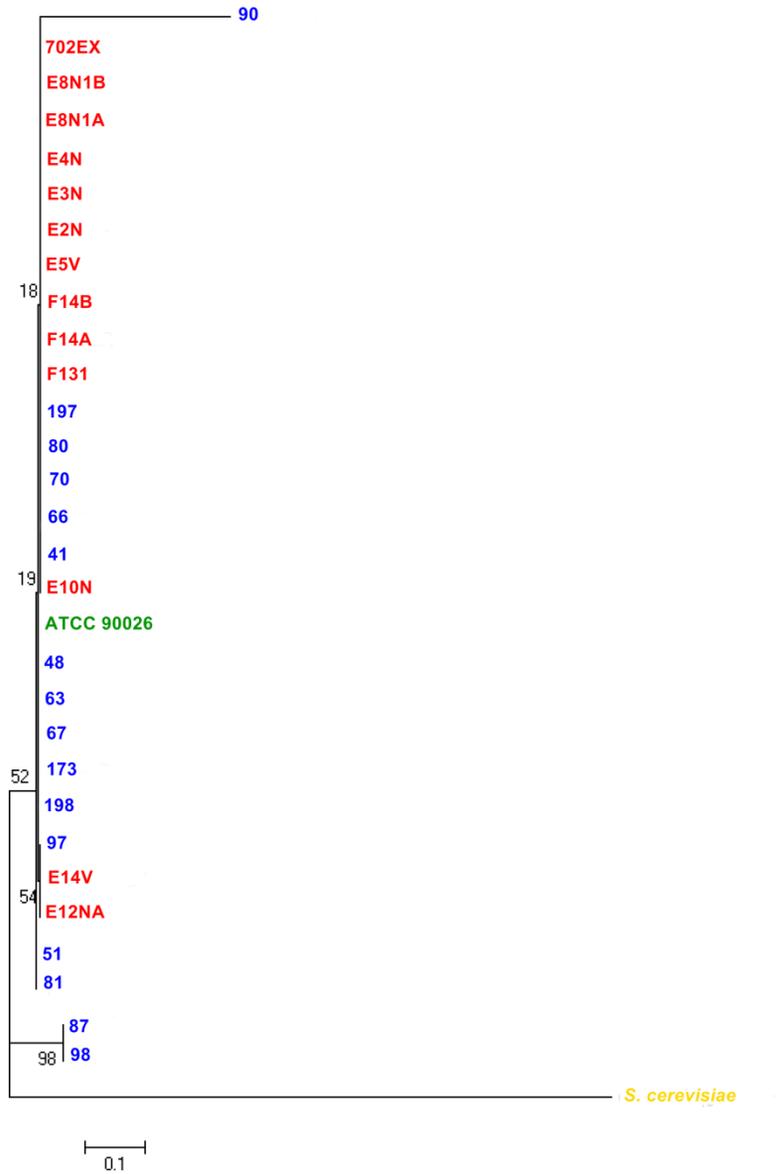


Figura 13. Neighbor Joining, con el modelo Kimura de 2 Parámetros. Bootstrap 1000 repeticiones.

■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia ■ *S. cerevisiae*

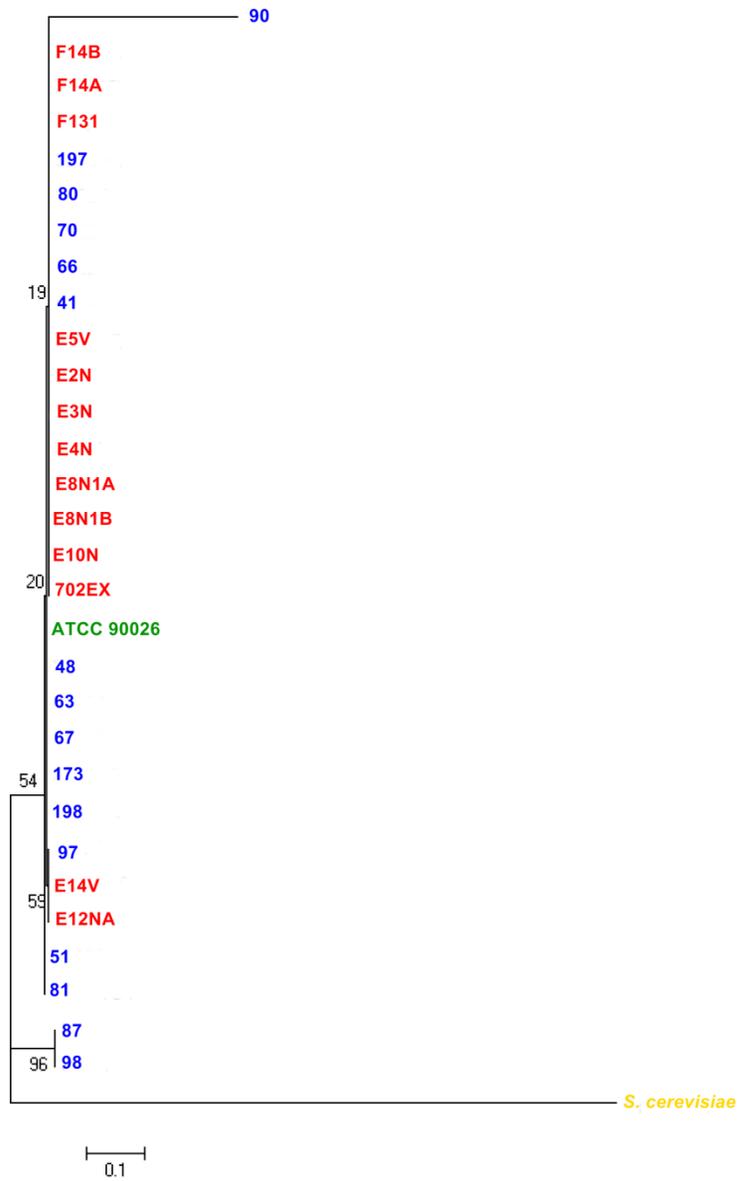


Figura 14. Neighbor Joining, con el modelo Tamura- Nei. Bootstrap 1000 repeticiones.
 ■ Personal paramédico ■ Pacientes ■ Cepa de referencia ■ *S. cerevisiae*

VIII. Discusión

En este estudio la identificación realizada por métodos tradicionales (fisiológicos y bioquímicos) y la identificación hecha por medio de biología molecular utilizando como blanco la región ITS1-5.8S-ITS2, coincidió para la mayoría de las muestras. Sólo hubo dos casos particulares en los que la biología molecular señaló a dos de éstas como pertenecientes a una especie de *Candida* distinta, pues el análisis las colocó como pertenecientes a la especie *Candida parapsilosis*. Por lo que, se destaca que las pruebas tradicionales pueden no ser suficientes para llevar a cabo la identificación de especies, ya que en algunos casos algunas de ellas se encuentran dentro del mismo grupo o *cluster*, como en el caso de *C. albicans* y *C. parapsilosis* (Lott *et. al*, 1998) y siendo genotípicamente tan relacionadas, pueden por tanto presentar también características fenotípicas similares y dar positivo para las mismas pruebas aun siendo dos especies diferentes, es decir se pueden obtener falsos positivos.

En cuanto al resto de los aislados, la combinación de análisis bioinformáticos utilizados para determinar la relación existente entre *C. albicans* de pacientes y personal paramédico, mostró que los aislados de patógenos y comensales están genéticamente relacionados.

En la matriz de distancias genéticas se puede notar dicha relación, ya que los valores obtenidos son muy cercanos a cero, por lo que existe una relación genética estrecha entre ambos tipos de secuencias. Por otro lado, las secuencias de las muestras 87 y 98 identificadas molecularmente como *C. parapsilosis*, presentan valores más altos pero entre sí son muy similares, pues los valores obtenidos para éstas son de alrededor de 0.124 y 0.127, los cuales expresan una gran diferencia con respecto a las otras muestras identificadas como *C. albicans*. Y del mismo modo, en las construcciones filogenéticas, estas se agrupan juntas en todos los árboles, con todos los métodos utilizados, con un bootstrap de 100% y se encuentran separadas del resto de las secuencias de *C. albicans*.

Por otra parte, encontramos que la muestra con clave 90, identificada como *C. albicans*, presenta una gran diferencia con respecto a las otras también identificadas con la misma especie; en la matriz de distancias genéticas se observan valores de alrededor de 0.261-

0.290, y en los árboles no se agrupa con las otras muestras sino que aparece como una rama independiente, esto con todos los métodos usados en la construcción de los árboles; aunque en los árboles enraizados en los que se aplicó el método de Neighbor Joining con los modelos de Jukes-Cantor, Kimura de 2 parámetros y Tamura- Nei si se agrupó con junto a las otras secuencias de *Candida albicans*, pues la rama de esta secuencia se une a la rama del *cluster* que agrupa a las otras secuencias de *C. albicans* de personal paramédico y pacientes, lo cual podría reflejar que esa muestra podría proceder de un origen distinto a las otras, es decir que este aislado proviene de una fuente distinta a las demás o que esta muestra podría ser de una cepa diferente a las otras, y por tanto se encuentra relacionada con los demás aislados filogenéticamente, aunque dicha relación no es tan estrecha, lo cual se apoya también con los valores obtenidos en el BLAST el cual la colocó como *C. albicans* con un porcentaje de identidad de 79%.

Analizando los árboles obtenidos utilizando los métodos de distancia y el criterio de optimización observamos lo siguiente:

En el caso del método de distancia de Neighbor Joining, en los árboles en los que se aplicó el modelo de Jukes- Cantor y el de Tamura-Nei, se agrupan las mismas secuencias de la misma forma en ambos casos, sin embargo los valores de apoyo de bootstrap son más altos en el caso de Jukes- Cantor. Para los casos en los que se aplicaron los modelos de p-distance y Kimura de 2 parámetros, el ordenamiento de las secuencias es diferente aunque las mismas secuencias se encuentran en el mismo agrupamiento, es decir se mantienen los *clusters*. Cuando se aplicó p-distance los valores de apoyo de bootstrap resultaron más altos.

En los cuatro modelos/métodos aplicados en el método de Neighbor Joining, las mismas secuencias se encuentran en los mismos agrupamientos, aun cuando se ordenan de manera diferente en algunos casos y presenten diferencia en los valores de apoyo de bootstrap. Los casos en los que se presentan valores de apoyo más altos de bootstrap nos indican que las relaciones filogenéticas mostradas en las ramas son suficientemente robustas. Por lo tanto en este caso las relaciones mejor soportadas son las obtenidas con el método de Jukes- Cantor y p-distance.

En el caso del método de distancia UPGMA el árbol obtenido mostró agrupamientos similares a los obtenidos con los construidos con los otros métodos. Se obtuvieron valores de apoyo de bootstrap altos en la mayoría de las ramas internas, en tanto que para las más externas los valores fueron menores, incluso para la rama que relaciona a las secuencias correspondientes a *C. parapsilosis* con el grupo de las *C. albicans* el valor de bootstrap fue de cero. Lo cual implica que la relación de estas secuencias con las demás tiene un soporte pobre. La rama de la secuencia 90 aparece aparte como no relacionada con ninguna de las otras. Cabe destacar que la rama principal que agrupa a todas las secuencias tanto de pacientes como de personal paramédico presentó un valor de apoyo de bootstrap de 100%, por lo que vemos que con este método también se observa la relación genética estrecha que existe entre ellas.

En la construcción filogenética realizada por medio del modelo de Máxima Verosimilitud (criterio de optimización), el árbol obtenido muestra que la rama principal que agrupa las secuencias tanto de pacientes como de personal tiene un valor de bootstrap de 99%, a diferencia de lo que se había observado en todos los demás árboles obtenidos con los otros métodos que había sido de 100%, sin embargo, este sigue siendo un valor alto que soporta fuertemente la relación de ambas secuencias. Las otras ramas internas presentan también valores altos, por lo que las relaciones genéticas entre las secuencias tienen un buen soporte; y se observa de igual forma una topología similar a la de los otros árboles obtenidos con los demás métodos.

En los árboles en los cuales se utilizó un grupo externo para enraizarlos los valores de bootstrap fueron más bajos que en los que no se usó el grupo externo, sin embargo los agrupamientos se mantuvieron muy similares a los que presentaron los árboles sin raíz, aunque como ya se había mencionado, el caso de los árboles obtenidos con el método de Neighbor Joining con los modelos de Jukes- Cantor, Kimura de 2 parámetros y Tamura- Nei la secuencia 90 si se agrupó con junto a las otras secuencias de *C. albicans*. Las secuencias de *C. parapsilosis* se agruparon juntas también en los árboles enraizados con bootstrap de entre 96 y 99%, valores que aunque son más bajos que los de los árboles sin grupo externo aún son valores de apoyo altos. En este caso el método con el que se construyó el árbol con relaciones mejor soportadas fue el de Neighbor Joining con el modelo Jukes- Cantor.

IX. Conclusiones

Los métodos moleculares y bioinformáticos pueden ser una buena herramienta para el estudio clínico de hongos como lo vimos en este caso con *Candida albicans*, ya que a través del estudio de las regiones variables ITS1 e ITS2 podemos obtener las relaciones intraespecíficas que existen, y del mismo modo distinguir entre especies a través de las mismas.

Estos métodos pueden servir también como un modo de confirmación para los métodos tradicionales, los cuales a veces pueden dar falsos positivos, como lo vimos con las secuencias de los aislados 87 y 90 que habían sido previamente identificados con estos métodos como *C. albicans* y a través de biología molecular y bioinformática se ubicaron como pertenecientes a *C. parapsilosis*. Los métodos tradicionales son útiles, sin embargo la biología molecular y la bioinformática brindan mayor certeza en la identificación de especies y establecimiento de relaciones intraespecíficas.

En cuanto al establecimiento de la relación entre aislados de pacientes y personal paramédico se pudo observar que el análisis bioinformático realizado, fue útil para ver que existe una relación estrecha entre algunas de las secuencias comensales y patógenas, ya que obtuvimos árboles con topologías y agrupamientos similares, los cuales presentaron altos valores de apoyo y siempre estrechamente relacionados.

Algunos de los métodos dieron relaciones mejor soportadas que otros, esto debido a que aplicamos un parámetro de apoyo para la reconstrucción filogenética, sin embargo con todos vemos que las secuencias se relacionan de manera muy similar. Por lo que podemos ver que hay secuencias de pacientes que están estrechamente relacionadas con las de personal y también encontramos secuencias de pacientes que aunque muestran relación con las demás esta no es tan cercana. Los métodos con los que se obtuvieron mejores reconstrucciones filogenéticas fueron el método de distancia Neighbor Joining con el modelo de Jukes- Cantor (con y sin grupo externo); y el criterio de optimización Máxima verosimilitud en el que se aplicó el modelo de Tamura- Nei (sin grupo externo), pues presentaron altos valores de apoyo.

Incluso estos análisis separaron claramente en el árbol a las secuencias de *C. parapsilosis* en otro grupo. Pudimos ver el caso de la secuencia del aislado 90 perteneciente a un paciente que se coloca en todos los árboles de manera independiente, no mostrando ninguna relación con las demás, ni con las patógenas ni con las comensales, y que sin embargo cuando se agrega un grupo externo a la construcción filogenética si aparece agrupada con ambos tipos de secuencias, tanto comensales como patógenas, por lo que se podría inferir que proviene de un origen diferente al de las demás y es una cepa diferente y esa fue la razón por la que no se agrupó en el mismo *cluster* con las otras secuencias.

Con todo esto podemos decir que sí existe una relación estrecha entre la mayoría de los aislados pertenecientes a la misma especie (*C. albicans*) de pacientes y personal paramédico, ya que presentaron similitudes en la región del genoma estudiada que permitió agruparlas juntas al realizar la reconstrucción filogenética; aunque encontramos un caso en el que hubo diferencias importantes y no presentó una relación tan cercana con las otras. Así mismo estos análisis nos permitieron identificar otra especie de *Candida*, *C. parapsilosis*, y ver como se relacionaba filogenéticamente con *C. albicans*.

Con todas estas pruebas aunque se pudo observar una clara relación filogenética entre ambos tipos de aislados, tanto patógenos como comensales, no podemos afirmar si *Candida albicans* fue adquirida de una fuente exógena, ya que los organismos patógenos y comensales son muy similares en sus secuencias, lo cual imposibilita decir en qué dirección ocurrió la adquisición, si fue personal paramédico- paciente o viceversa.

X. Referencias

1. ARENAS R. Micología Médica Ilustrada. Tercera edición. México. McGraw Hill. 2008.
2. BAND JD and Maki DG. Infections Caused by Arterial Catheters Used for Hemodynamic Monitoring. Am J Med. 1979. 67: 735-731.
3. BEHRENS-BAUMANN W, Ruechel R, Zimmermann O, Vogel M. *Candida tropicalis* Endophthalmitis Following Penetrating Keratoplasty. Br. J. Ophthalmol. 1991. 75:565.
4. BOYANTON BL, Luna RA, Fasciano LR, Menne KG, Versalovic J. DNA Pyrosequencing- Based Identification of Pathogenic *Candida* species by Using the Internal Transcribed Spacer 2 Region. Arch. Pathol. Lab. Med. 2008, p. 667.674.
5. CALDERONE RA. Taxonomy and Biology of *Candida*. **En:** *Candida* and candidiasis/Calderone RA, ed.- p. 15-21. ASM Press, 2002.
6. CALDERONE RA and Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in microbiol. 2001 Jul; 9: 327-335.
7. CALDERONE R and Gow NAR. Host Recognition by *Candida* Species. **En:** *Candida* and candidiasis/Calderone RA, ed.- p. 145-146. ASM Press, 2002.
8. CHEN YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian- Barrett SL, Lafe K, Yarfitz SL, Limaye AP y Cookson BT. 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; p. 2302- 2310.

9. CUGNO C and Cesaro Simone. Epidemiology, risk factors and therapy of candidemia in pediatric hematological patients. *Pediatric Reports* 2012; 4:e9: 30-34.
10. DEL PALACIO A, Villar J, Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(1):2-7.
11. FIGUERAS C, Díaz de Heredia C, García JJ, Navarro M, Ruíz-Contreras J, Rossich R, Rumbao J, Frick MA, Rosello EM. Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *An. Pediatr. (Barc).* 2011.
12. GÓMEZ J, García-Vázquez E, Hernández A, Espinosa C, Ruiz J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de un problema emergente. *Rev. Esp. Quimioter.* 2010. p. 158-168.
13. GOW NAR. Cell Biology and Cell Cycle of *Candida*. **En:** *Candida and candidiasis*/Calderone RA, ed.- p. 145-146. ASM Press, 2002.
14. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med mycol.* 2002; 40: 87-109.
15. KIM J and Sudbery P. *Candida albicans*, a Major Human Fungal Pathogen. *J. Microbiol.* 2011. p. 171-177.
16. KURTZMAN CP and Fell JW. *The Yeasts, a Taxonomic Study.* 4a ed. Amsterdam, Países Bajos. Elsevier Science. 1998.

17. LEAW SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara J-P, y Chang TC. Identification of Medically Important Yeast Species By Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region. *J. Clin. Microbiol.* 2006; p. 693–699.
18. LEE SA y Wong B. Advances in Diagnostic Methods of Invasive *Candida* and *Aspergillus* Infections. **En:** The Mycota XII. Human Fungal Pathogens/ Domer JE y Kobayashi GS, eds.- p. 47- 49 Springer-Verlag Berlin- Heilderberg, 2004.
19. LÓPEZ-MARTÍNEZ R. Candidosis, a new challenge. *Clin- Derm.* 2010. p. 178-184.
20. LÓPEZ- MARTÍNEZ R, Méndez Tovar J, Hernández Hernández F, Castañón Olivares R. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.* México. Editorial Trillas. 2004.
21. LOTT TJ, Burns BM, Zancoppe-Oliveira R, Elie CM, Reiss E. Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) from yeast species within the genus *Candida*. *Curr Microbiol.*1998; 36: 63–69.
22. MERCURE S, Rougeau N, Montplaisir S, Lemay G. Complete nucleotide sequence of *Candida albicans* 5.8S rRNA coding gene and flanking internal transcribed spacers. *Nucleic Acids Research*, 1993; 21: 4640
23. MIYAKAWA Y and Ozawa T. A New Type of DNA Polymorphism Identified in the Species- Specific DNA Region Originating from the *Candida albicans* Mitochondrial Genome. *Curr Microbiol.* 2009. 58: 438- 442.
24. PRESCOTT LM, Harley JP and Klein DA. *Microbiología.* 5ª. Ed. Madrid. McGraw Hill. 2004. 1240p.

25. RAJU BS and Rajappa S. Isolation and Identification of *Candida* from the Oral Cavity. Inter Scholarly Research Network. 2011. p. 1-7.
26. SAN-BLAS G, Travassos R, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VMS, Knox Y. Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol.* 2000. p. 79-86.
27. SHOKOHI T, Hashemi- Soteh MB, Pouri S, Hedayi MT, Mayahi S. Identification of *Candida* Species Using PCR-RFLP in Cancer Patients in Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2010; 28(2): 147-151.
28. TAMURA K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
29. WILLIAMS DW, Wilson MJ, Lewis MAO y Potts JC. Identification of *Candida* Species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Integenic Spacer Regions of Ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1995; p. 2476-2479.
30. WISE MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, Renwick A, Huong J, Young S, Tarrand J, Kontoyiannis DP. Species identification and differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence- based PCR. *J. Med. Microbiol.* 2007; p. 778-787.

XI. Anexos.

Métodos de identificación bioquímicos y morfológicos

Agar cromogénico Candida ID2®

Es un medio comercial que permite la identificación de levaduras a nivel de especie por la coloración que adopta la levadura en ellos.

Técnica. A partir de una solución levaduriforme inicial, hacer diluciones para hacer un conteo celular en una cámara de Neubauer, una vez determinada la concentración de 10000 células por ml, se toman 15 μ l y se siembran por estría cruzada para poder identificar si hay alguna contaminación a combinación de especies y ésta pueda ser percibida. Se incuba dos días a 37°C en condiciones de oscuridad con revisiones diarias.

Lectura. Si las levaduras son azules pertenecen a *C. albicans*, si son rosas pertenecen a *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* o *C. kefyr*; y blancas si pertenecen a otras levaduras que no sean aquellas caracterizadas por los dos colores anteriores.

Agar Níger

Es un medio que permite la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* por el acomodo de clamidoconidios que en *C. albicans* son únicos, y en *C. dubliniensis* están acomodados en racimos; y por la morfología macroscópica de las colonias. Además sirve para diferenciar levaduras del género *Cryptococcus*, ya que estas pueden pigmentar este medio con una coloración vino.

Preparación del medio. Pulverizar 50g de la semilla de Níger, ponerla en ebullición en 1 L de agua destilada durante 30 minutos. Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior. Añadir y disolver 1 g de glucosa, 1 g de fosfato, 1 g de creatinina y 15 g de agar. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos, enfriar a 50 °C. Disolver en baño maría 100 mg/ml de difenil en 1 ml de alcohol. Añadir al medio el difenil en ambiente estéril y antibióticos

(20 U/ml de penicilina, 40 mg/ml de estreptomicina, y 1 mg/ml de cloranfenicol). Homogeneizar y envasar.

Técnica. Con un palillo estéril tocar la levadura a identificar y llevar al medio. Tocar el agar en varios puntos de la placa. Dejar de incubar 2 a 3 días a temperatura ambiente.

Lectura. Observar en microscopio estereoscópico la morfología macroscópica y hacer un examen directo de las colonias poniendo énfasis en el acomodo de los clamidoconidios.

Filamentación en suero humano a 37 °C

Es una prueba que sirve para observar la formación del tubo germinativo, característico de *C. albicans*, y ello permite diferenciarla de otras especies pertenecientes al género *Candida*.

Técnica. Se pone una asada de la levadura en suero fisiológico humano, dejando incubar por 2 horas a 37 °C.

Lectura. Se hace una preparación de esta solución y se observa al microscopio determinando el porcentaje por campo en el que se observa la formación de tubo germinativo, para deducir la proporción en la formación de este. Es importante realizar la lectura dentro de las 2 a 4 horas, ya que pasado ese tiempo la prueba pierde viabilidad debido a que pasado ese tiempo las diferentes especies forma el tubo germinativo.

Producción de clamidocinidios en Agar harina de maíz tween 80

Este es un medio que simula el estrés, contiene pocos nutrientes y un factor estresante (tween 80), lo que provoca que se pueda diferenciar entre especies del género *Candida* por la formación de estructuras de resistencia, como lo son los clamidoconidios (formados por *C. albicans* y *C. dubliniensis*); así como la formación de pseudomicelio y blastoconidios.

Preparación. Se disuelven 17 g de agar harina de maíz en polvo en 1 L de agua destilada. Se añaden 10 ml de tween 80 (para obtener una concentración 1 %). Se disuelve se hierve y se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos y se vierte en cajas chicas estériles.

Técnica. Se emplea la técnica Dalmau, en la cual se trazan dos líneas verticales paralelas en el medio (apenas rasgando la superficie), dejando 1 cm entre ellas. Se inocula trazando una M y se coloca un cubreobjetos estéril. Se deja incubar 2 días a temperatura ambiente.

Lectura. Observar la caja directamente al microscopio, tratando de observar las estructuras que se forman en la periferia.

Prueba positiva (+): formación de clamidoconidios.

Prueba negativa (-): formación de pseudomicelio, blastoconidios y sin clamidoconidios o ausencia en la formación de los anteriores.

Auxanograma Vitek®

Es una prueba sistematizada que consiste en unas tarjetas que contienen productos bioquímicos que en contacto con la levadura podrán ser metabolizados o no, esto provocará un viraje de color en cada uno de los pozos que integran las tarjetas, creando un perfil bioquímico característico. La lectura de las tarjetas se realiza por medio de una computadora y un software que contiene una base de datos a partir de muestras clínicas, en ella se busca un perfil parecido al problema de estudio, e identifica la especie a la que pertenece, dando todo el perfil bioquímico del organismo, así como un porcentaje de certeza.

Técnica. Se hace una solución (con solución salina estéril más la levadura), se mide la concentración determinada por un espectrofotómetro (la cual debe mantenerse en un rango determinado para las levaduras), se introducen las tarjetas a un compartimiento del aparato para que sean llenadas. Se incuban 24 horas en una estufa a 37°C y al día siguiente son introducidas al lector para ser comparadas con la base de datos, dando un nombre de especie, así como el porcentaje de veracidad.