



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**“Obtención de marcadores moleculares para la identificación rápida
y específica de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y
C. parapsilosis sensu stricto“**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

EDUARDO GARCÍA SALAZAR

Directora de tesis: **DRA. MARÍA GUADALUPE FRÍAS DE LEÓN**

México, D. F.

Marzo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Epidemiología Molecular del Hospital Juárez de México, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Frías De León.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), dentro de la convocatoria “PROYECTOS DE DESARROLLO CIENTÍFICO PARA ATENDER PROBLEMAS NACIONALES, PDCPN2013-01”, Clave: 216112.

Durante la realización de este trabajo, el autor fue becario de CONACyT, en el proyecto PDCPN2013-01, Clave: 216112

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella y abrirme las puertas para realizar mi carrera en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, así como también a todos los profesores que compartieron sus conocimientos durante este camino.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por su asesoría académica durante la realización de la tesis.

Al M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez, Dr. Juan José Rodríguez Mercado, M. en C. Yolanda Córdova Galaviz. Por las valiosas observaciones y correcciones realizadas al trabajo escrito.

Al Dr. Gustavo Acosta Altamirano, por su asesoría académica durante el desarrollo del proyecto y especialmente por su apoyo laboral.

Al M. en C. Emmanuel Rosas de Paz, por su asesoría en el diseño de los oligonucleótidos.

A quienes proporcionaron los aislados clínicos de *Candida* spp.: QFB. Roberto Rivera Sánchez, Dra. Myriam Arriaga Alba, Hospital Juárez de México, SS; M. en C. María del Rocío López Álvarez, Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, ISSSTE y Biól. Elva Bazán Mora, Unidad de Micología, Facultad de Medicina, UNAM.

“ORGULLOSAMENTE UNAM”

DEDICATORIA

A mi familia Hernández Salazar y esposa Paola Betancourt Cisneros por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A mi directora de tesis Dra. María Guadalupe Frías De León quien me brindó su orientación y guía en la elaboración del presente trabajo de investigación, a parte de su valiosa confianza y lo más importante su gran amistad.

A todas las personas que de una u otra forma me apoyaron en la realización de este trabajo.

La amistad es el elemento más importante en la fórmula de la vida. A un gran amigo, Ulises González, por ser un elemento más para seguir adelante.

Las personas que queremos y nos quieren no se van nunca, se quedan con nosotros todo el día, todo el tiempo en nuestra mente y corazón, van a donde vamos y vamos a donde ellas van, pero nunca mueren, viven siempre en nuestro recuerdo y pensamiento.

A Gael Garcia Betancourt †

Ma. Remedios Salazar Hernández †

Ramón Garcia Moreno †

Ángela Perfecto Mota †

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
Objetivo general	9
Objetivos particulares	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Diseño experimental	10
Origen de los aislados de <i>Candida</i> spp.	11
Extracción de ADN de <i>Candida</i> spp.	12
Amplificación al azar del ADN Polimórfico (RAPD)	13
Purificación y reamplificación de bandas diferenciales	14
Ligación de las bandas diferenciales al vector de clonación	15
Transformación de <i>Escherichia coli</i> con las bandas diferenciales ligadas al vector de clonación	15
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia	17
Purificación de plásmidos por método alcalino	17
Liberación del fragmento ligado por digestión con <i>EcoRI</i>	18
Secuenciación y diseño de oligonucleótidos	18
Estandarización de las condiciones de la PCR con los oligonucleótidos específicos	19
Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos	19
Evaluación de la sensibilidad de los oligonucleótidos	19
Consideraciones de bioseguridad. Manejo de las muestras biológicas	20
Manejo de material contaminado	20
Consideraciones éticas	20
RESULTADOS	21
Extracción de ADN de <i>Candida</i> spp.	21
Amplificación al Azar del DNA Polimórfico (RAPD)	23
Purificación y reamplificación de bandas diferenciales	28
Transformación de <i>Escherichia coli</i> con las bandas diferenciales ligadas al vector de clonación	28
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia	30
Purificación de plásmidos por método alcalino	30
Liberación del fragmento ligado por digestión con <i>EcoRI</i>	31
Secuenciación y diseño de oligonucleótidos	32
Estandarización de las condiciones de PCR con los oligonucleótidos específicos	36
Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos	37
Evaluación de la sensibilidad de los oligonucleótidos	38
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43

PERSPECTIVAS	43
REFERENCIAS	44

Índice de cuadros

Cuadro I. Origen de los aislados y cepas de referencia de <i>Candida</i> spp.	12
Cuadro II. Cuantificación por espectrofotometría de los ADN obtenidos de los aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Candida</i> spp.	22
Cuadro III. Bandas diferenciales observadas en los patrones polimórficos de <i>Candida</i> spp., generados por RAPD con el oligonucleótido T3B.	28
Cuadro IV. Cuantificación por espectrofotometría de los plásmidos purificados	32
Cuadro V. Oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de las clonas analizadas	35
Cuadro VI. Oligonucleótidos diseñados para la discriminación de <i>Candida</i> spp.	36

Índice de figuras

Figura 1. Vector de clonación pGEM®-T Easy. Vector linearizado, con un sitio de inserción (T-T) flanqueado por sitios de reconocimiento para <i>Eco</i> RI, lo que facilita la liberación de los fragmentos clonados	16
Figura 2. Cuantificación por electroforesis de DNAs obtenidos de aislados clínicos y cepas de referencia de <i>Candida</i> spp. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con diferentes concentraciones (10, 20 y 50 ng/μl) de ADN de fago λ.....	23
Figura 3. RAPD de cepas de referencia de <i>Candida</i> spp. La reacción se llevó a cabo utilizando las condiciones de reacción descritas por Correia <i>et al.</i> (2004) y Thanos <i>et al.</i> (1996). M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	23
Figura 4. Curva de temperatura de alineamiento para la obtención de patrones polimórficos de <i>Candida albicans</i> , usando el oligonucleótido T3B. La amplificación se llevó a cabo a 36, 42 y 47 °C. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb	24
Figura 5. Curva de concentración de ADN para la obtención de patrones polimórficos de <i>C. glabrata</i> , usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	24
Figura 6. Curva de concentración de oligonucleótido T3B para la obtención de patrones polimórficos de <i>Candida</i> spp. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo ..	25

Figura 7. Curva de concentración de MgCl ₂ para la obtención de patrones polimórficos de <i>Candida</i> spp., usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	25
Figura 8. Patrón polimórfico por RAPD a partir del ADN de aislados de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis sensu stricto</i> , usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	26
Figura 9. Patrón polimórfico por RAPD a partir del ADN de aislados de <i>Candida glabrata</i> , usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	26
Figura 10. Reproducibilidad de los patrones polimórficos generados por RAPD a partir del ADN de aislados de <i>Candida</i> spp., usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	27
Figura 11. Bandas diferenciales en los patrones polimórficos de <i>Candida</i> spp., obtenidos por RAPD con el oligonucleótido T3B. Las flechas blancas indican las bandas diferenciales. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	27
Figura 12. Purificación de bandas diferenciales de <i>Candida</i> spp. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo	28
Figura 13. Selección de clonas recombinantes obtenidas en medio de selección Lb/Amp/IPTG/X-Gal. Las clonas que no tienen un fragmento de ADN de <i>Candida</i> spp. integrado desarrollaron una pigmentación azul por la degradación del X-Gal (A). Las clonas que contienen alguno de los fragmentos de interés no desarrollaron pigmentación (B).....	29
Figura 14. Caracterización de clonas recombinantes mediante PCR. M: tamaño molecular de fragmentos del fago λ digeridos con <i>HindIII/EcoRI</i>	30
Figura 15. Purificación de plásmidos por método alcalino de las clonas Calb-T3B ₅₀₀ , Cgla-T3B ₃₀₀ , Cgla-T3B ₄₀₀ , Cpar-T3B ₄₀₀ y Ctro-T3B ₆₀₀ . M: tamaño molecular de fragmentos del fago λ digeridos con <i>HindIII/EcoRI</i>	31
Figura 16. Digestión de los plásmidos obtenidos de las clonas Calb-T3B ₅₀₀ , Cgla-T3B ₃₀₀ , Cgla-T3B ₄₀₀ , Cpar-T3B ₄₀₀ y Ctro-T3B ₆₀₀ con la enzima <i>EcoRI</i> . M: tamaño molecular de fragmentos del fago λ digerido con <i>HindIII/EcoRI</i>	31
Figura 17. Alineamiento de la secuencia de las clonas Calb-T3B ₅₀₀ , Cgla-T3B ₃₀₀ y Ctro-T3B ₆₀₀ con las secuencias depositadas en el GenBank	33
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de la clona Cpar-T3B ₄₀₀ , mediante el algoritmo BLASTn, con las secuencias depositadas en el GenBank	34
Figura 19. Amplificación inespecífica de <i>Candida</i> spp., con los oligonucleótidos a) CalbF y CalbR, b) CglaF y CglaR, c) CparF y CparR, d) CtroF y CtroR. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.....	35
Figura 20. Estandarización de la amplificación del ADN de <i>Candida</i> spp., con los oligonucleótidos Ca _{spp} -F y Ca _{spp} -R. La figura muestra los resultados de las curvas de concentración de a) ADN, b)	

oligonucleótidos, **c)** MgCl₂ y **d)** dNTP. M: marcador de tamaño molecular de 100 p. T: testigo negativo36

Figura 21. Amplificación de aislados de *Candida* spp. con los oligonucleótidos específicos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-F. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo37

Figura 22. Amplificación, con los oligonucleótidos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-F, del ADN obtenido de aislados de **a)** *C. albicans*, **b)** *C. glabrata*, **c)** *C. parapsilosis* s. str., **d)** *C. tropicalis*. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: Testigo negativo37

Figura 23. Especificidad de los marcadores SCAR **a)** Ca₈₅₀, **b)** Cgl₁₀₀₀, **c)** Ctr₇₉₀, **d)** Cpa₇₃₁, utilizando ADN de otros hongos patógenos. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo38

Figura 24. Sensibilidad de los marcadores SCAR **a)** Ca₈₅₀, **b)** Cgl₁₀₀₀, **c)** Ctr₇₉₀ y **d)** Cpa₇₃₁. La cantidad mínima detectada fue de 1 pg/μl. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: Testigo negativo38

RESUMEN

La combinación de métodos diagnósticos convencionales, microbiológicos e inmunológicos, con los nuevos métodos moleculares ha mostrado ser la mejor alternativa para lograr un diagnóstico oportuno de la candidiasis invasiva; sin embargo, los marcadores moleculares reportados en la literatura se han obtenido de aislados procedentes de otros países, lo que limita su aplicación al considerar la gran variabilidad genotípica que existe entre los aislados de *Candida* spp. En este trabajo se analizaron los patrones polimórficos generados por la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) con el oligonucleótido T3B de cepas de referencia y aislados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis sensu stricto* y *C. tropicalis*, procedentes de México. De los patrones polimórficos, se seleccionaron cinco bandas diferenciales entre las especies estudiadas: una de 500 pb para *C. albicans*, una de 300 y otra de 400 pb para *C. glabrata*, una de 400 pb para *C. parapsilosis s. str.* y una de 600 pb para *C. tropicalis*. Estas bandas se purificaron, reamplificaron y clonaron en el vector pGEM-T easy, los plásmidos de las clonas recombinantes (Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀) se purificaron por el método alcalino y fueron secuenciados. Las secuencias mostraron bajo porcentaje de similitud con las secuencias correspondientes a cada especie, excepto la secuencia de la clona Cpar-T3B₄₀₀, que mostró 99-100% de similitud con la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del ARNr de *C. parapsilosis*. A partir de esta secuencia, se diseñó un par de oligonucleótidos, Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-R, que amplifican cuatro marcadores Ca₈₅₀, Cgl₁₀₀₀, Ctr₇₉₀ y Cpa₇₃₁ para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis s. str.* y *C. tropicalis*, respectivamente. Los marcadores Ca₈₅₀, Cgl₁₀₀₀, Ctr₇₉₀ y Cpa₇₃₁, resultaron específicos de especie, ya que solo amplificaron con el ADN de la especie correspondiente de *Candida* y no amplificaron con el ADN de otros patógenos. La sensibilidad de estos marcadores fue de 10 pg/μl de ADN, por lo que tiene un potencial uso para el diagnóstico de la candidiasis invasiva en laboratorios intrahospitalarios de nuestro país, después de ser validados en la detección de *Candida* spp. en muestras clínicas.

INTRODUCCIÓN

En décadas recientes, se ha reportado un aumento considerable en la incidencia de las micosis invasivas debido al incremento de individuos inmunodeprimidos quienes, junto con los pacientes sometidos a cirugías y con estancia prolongada en las unidades de cuidados intensivos, constituyen el grupo de mayor riesgo para el desarrollo de estas micosis (Delaloye y Calandra, 2014). Dentro de los factores más comunes para la invasión y diseminación de las infecciones micóticas están el uso de antibióticos, catéteres venosos centrales, nutrición parenteral total, quemaduras, inmunosupresión y la gravedad de la enfermedad de base (León *et al.*, 2006; de Bedout y Gómez, 2010).

Los agentes más frecuentes de las micosis invasivas son *Candida* spp. y *Aspergillus* spp.; sin embargo, *Candida* es el género más importante, ya que ocasiona alrededor del 75% de los casos, con una tasa de mortalidad de hasta el 40%. El género *Candida* está integrado por más de 200 especies diferentes, de las cuales algunas forman parte de la microbiota comensal de la piel y de los tractos genitourinario, respiratorio y gastrointestinal. Por su amplia distribución, *Candida* puede llegar a causar infecciones en diferentes sitios anatómicos, principalmente asociadas a factores de oportunismo. Es importante destacar que no obstante que *Candida* es microbiota habitual, su presencia en sitios estériles, como sangre, líquido cefalorraquídeo o pulmones es siempre indicativo de infección (de Bedout y Gómez, 2010).

Las manifestaciones de la enfermedad dependen del lugar de la infección, y va desde cuadros leves de estomatitis crónica, candidiasis mucocutánea y vulvovaginitis hasta cuadros más graves con manifestaciones invasivas en el paciente crítico o inmunodeprimido, como la candidiasis diseminada, candidemia, endoftalmitis y peritonitis (Montravers *et al.*, 2006). La colonización e infección por *Candida* depende de su habilidad para adherirse a diversas superficies, la producción de pseudohifas, la actividad de enzimas (proteasas, fosfolipasas y lipasas), variabilidad genética y antigénica, y factores de virulencia relacionados a cada especie de *Candida*. La capacidad de adherencia es esencial para la expresión de la patogenicidad, así las levaduras de *Candida* spp. pueden adherirse a la superficie de distintas células como epitelio cutáneo, orofaríngeo, urinario, cervical,

gastrointestinal, endotelio vascular, así como a materiales inertes (plástico, nylon, PVC, polietileno y vidrio) utilizados en catéteres venosos, prótesis, lentes de contacto, etc., lo que favorece la formación de una biopelícula, que las hacen menos vulnerables a la acción de los antimicóticos, debido a que la matriz extracelular excluye o limita el acceso de éstos, haciendo de este foco el origen de la persistencia, la invasión y diseminación de la infección.

Hasta hace algunos años, *C. albicans* era reconocida como la especie más frecuentemente aislada de los casos de candidiasis invasiva; sin embargo, diversos autores han demostrado cambios notables en la epidemiología de la candidiasis, ya que con mayor frecuencia se están aislando otras especies, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. zeylanoides* y *C. parapsilosis sensu stricto* (Morales-Mendoza *et al.*, 2013). También se han registrado variaciones en la prevalencia, actualmente existe un incremento de especies no *albicans*, como *C. krusei* y *C. glabrata*, especialmente en pacientes neutropénicos con malignidad hematológica (de Bedout y Gómez, 2010). El incremento en la prevalencia de *C. glabrata* y de otras especies no *albicans* se ha atribuido, principalmente, a que son especies poco sensibles al fluconazol y a otros azoles administrados habitualmente en el tratamiento de candidiasis (de Bedout y Gómez, 2010).

Es interesante señalar que el aislamiento de especies no *albicans* varía según la región, por ejemplo, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son aisladas con mayor frecuencia (55%) en América Latina; *C. glabrata* es la segunda especie con mayor prevalencia en Estados Unidos y Canadá; mientras que en México, las especies con mayor incidencia, son *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* y *C. kefyr*, que causan más del 50% de los casos de candidiasis (Reséndiz-Sánchez y Morales-Aguirre, 2007).

Debido a la diversidad de especies patógenas del género *Candida*, actualmente es necesario que el diagnóstico y el tratamiento de la candidiasis invasiva se establezca con base en la identificación certera de los aislados a nivel de especie, con el fin de garantizar

una prescripción médica adecuada, ya que no todas las especies responden a la misma terapia antifúngica (de Bedout y Gómez, 2010). Sin embargo, desde el punto de vista clínico, el diagnóstico etiológico de la candidiasis invasiva es complicado por la ausencia de sintomatología patognomónica, lo que dificulta el manejo adecuado del proceso (Colom *et al.*, 2006), prolonga la hospitalización de los pacientes e incrementa los costos para el sistema sanitario, por ello, se recurre al diagnóstico microbiológico.

El cultivo (hemocultivo) positivo es el estándar de oro o la histopatología; pero estos dos métodos tienen una sensibilidad limitada (50%), haciendo que el diagnóstico sea difícil y obliga al médico a considerar únicamente el cuadro clínico y factores de susceptibilidad del paciente para decidir el tratamiento empírico (León *et al.*, 2006). Otro de los inconvenientes, es que *Candida* presenta un crecimiento lento a partir de muestras de sangre, e infecciones bacterianas concomitantes pueden hacer que disminuya la posibilidad de obtener hemocultivos positivos y aun cuando se han mejorado las técnicas de cultivo, sólo se ha incrementado la sensibilidad al 70%. Los cultivos de sitios no estériles son más difíciles de interpretar, y no es fácil discernir entre contaminación y colonización. Otra desventaja es la frecuente obtención de cultivos negativos en pacientes que suelen recibir terapia antifúngica profiláctica (Colom *et al.*, 2006).

Otra opción diagnóstica es la demostración histológica de levaduras, pseudohifas o ambos, la cual es considerada definitiva para el diagnóstico de candidiasis invasiva, pero en el caso de pacientes críticos, no siempre es factible obtener la muestra apropiada para el análisis. No obstante la diversidad de opciones microbiológicas para la detección e identificación del patógeno, todas presentan limitaciones. Una de ellas, y quizás la más importante en los casos de CI, es el tiempo requerido antes de obtener un resultado (por lo menos 48 h) y la poca sensibilidad (50%) de los hemocultivos para revelar la presencia del hongo.

Otros métodos de diagnóstico que se utilizan en la sospecha de candidiasis invasiva son la detección de antígeno o anticuerpos. Sin embargo, los procedimientos de inmunodiagnóstico pueden presentar reacciones cruzadas con otras especies de hongos

asociados a cuadros clínicos semejantes. Además, debe considerarse que, la mayoría de las candidiasis invasivas son de origen endógeno, producidas por levaduras que se encuentran colonizando el tubo digestivo o la mucosa genital de los propios individuos (García-Ruiz *et al.*, 2004), lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos por los métodos de diagnóstico convencionales que sólo detectan e identifican la levadura en sangre y tejidos.

Las limitaciones que presentan los métodos convencionales para el diagnóstico de la candidiasis invasivas crean la necesidad de plantear el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y específicos, tales como los moleculares, que permitan distinguir colonización de infección, ya que en los hospitales de nuestro país, la identificación de las especies del género *Candida* se hace con base en sus características fenotípicas, las cuales en muchas ocasiones no son determinantes (Clancy y Nguyen, 2013).

Desde hace algunos años, se ha intentado abordar el problema de la detección rápida y específica de *Candida* spp., en sangre y otros tejidos, aplicando métodos que se basan en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Recientemente se ha reportado la espectrometría de masas (MALDI TOF-MS) como una técnica fiable y rápida para la identificación de *Candida* spp. en hemocultivos (Yaman *et al.*, 2012; Pulcrano *et al.*, 2013); sin embargo, a pesar de la novedad de esta técnica su uso es menos común que la PCR debido al elevado costo del equipo. Por lo que la PCR sigue siendo una opción al alcance de los laboratorios intrahospitalarios.

Al respecto, desde la década de los noventa, se han desarrollado diversos métodos de diagnóstico molecular, en los que se persigue la detección de secuencias genómicas específicas de *Candida*, para conseguir un método rápido y fiable en el diagnóstico de la CI. Dentro de todos los ensayos de PCR reportados en la literatura para la identificación de *Candida* spp., destacan los que tienen como dianas específicas las regiones del ADN que codifican para los genes ribosomales y sus espaciadores internos (ADNr-ITS). Estas regiones (genes ribosomales) ofrecen secuencias muy conservadas y estables para la hibridación de los oligonucleótidos, a la vez que regiones con variabilidad intragénero especie-específica (espaciadores internos) confieren una especificidad muy alta a la

detección e identificación de especies de *Candida*. Se estima que las levaduras poseen más de 150 copias de estos complejos génicos ribosomales a lo largo del genoma, lo que confiere al método una sensibilidad mayor que la del cultivo y una especificidad similar a éste, que le permite detectar el ADN de menos de una célula en un volumen determinado de muestra (Colom *et al.*, 2006; Xafranski *et al.*, 2013; Ledesma *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Uno de los problemas más serios que presentan estas técnicas, es el alto riesgo de falsos positivos, indistinguibles de los que arroja la presencia de una infección activa, esto se debe a la elevada sensibilidad del método.

Los protocolos de PCR en tiempo real, en los que se minimiza tanto la manipulación de la muestra como de los productos de PCR, son una interesante propuesta para evitar estos problemas. Este tipo de PCR, permite hacer una cuantificación del número de moléculas de genoma diana que se encuentran en la muestra. La elevada sensibilidad del método aunada a la posibilidad de cuantificación, podría facilitar el establecer criterios de valoración para descartar falsos positivos por contaminación, así como distinguir entre colonización e infección fúngica (Colom *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que, no obstante la demostración de la rapidez, amplia sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares que se han desarrollado para la detección e identificación de *Candida* spp., su completa aplicación en el diagnóstico se ha visto limitada. La gran mayoría de los métodos con base en la PCR no han sido validados en muestras clínicas o a nivel interlaboratorio para garantizar su reproducibilidad y especificidad, lo que es de gran relevancia debido a la significativa variabilidad genética en el hongo, asociada a su origen geográfico (Farkas *et al.*, 2009), por lo que es deseable que los marcadores moleculares sean obtenidos a partir del análisis de aislados autóctonos.

En este proyecto, para superar las limitaciones mencionadas, se plantea la obtención de marcadores SCAR (Región amplificada de una secuencia caracterizada) específicos para identificar *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicales* y *C. parapsilosis* s. str. Estos marcadores se obtendrán a partir de patrones polimórficos generados por RAPD (amplificación al azar del ADN polimórfico) con el oligonucleótido T3B en aislados autóctonos del hongo, de

acuerdo con lo descrito por Correia *et al.* (2004). Las bandas especie-específicas de los patrones polimórficos serán clonadas, secuenciadas y comparadas en el GenBank para el diseño de oligonucleótidos especie-específicos. Posterior al diseño de estos oligonucleótidos, se estandarizará un ensayo de PCR para la identificación de *Candida* spp., se evaluará la especificidad y sensibilidad del ensayo, utilizando diferentes concentraciones de ADN de *Candida* así como ADN extraído de diferentes microorganismos patógenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de la candidiasis invasiva continúa siendo un reto, ya que depende de la demostración de la invasión tisular por el hongo y su aislamiento mediante cultivo de muestras habitualmente estériles. Sin embargo, para obtener resultados de un cultivo se requiere tiempo prolongado, además frecuentemente resulta negativo debido a su escasa sensibilidad. Esto limita el diagnóstico y repercute directamente en el tratamiento y la supervivencia del paciente.

La combinación de métodos convencionales, tanto microbiológicos como inmunológicos, con nuevos métodos moleculares ha mostrado ser la mejor alternativa para lograr un diagnóstico oportuno; sin embargo, los avances han sido lentos y, a pesar de las múltiples publicaciones respecto a marcadores moleculares para identificar *Candida* spp., aún no hay suficiente validación ni consenso para su aplicación como herramienta diagnóstica.

Además, los marcadores moleculares reportados en la literatura se han obtenido de aislados procedentes de otros países, lo que limita su aplicación al considerar la gran variabilidad genotípica entre los aislados de *Candida* spp. (Farkas *et al.*, 2009). Por esta razón, es necesario contar con marcadores moleculares específicos que sean obtenidos de aislados autóctonos que nos permitan detectar e identificar al patógeno en muestras clínicas, de manera rápida e inequívoca. Cabe destacar que en el Hospital Juárez de México se ha utilizado la técnica de RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) para identificar algunas de las especies de *Candida* que predominan en México,

C. albicans (80.3%), *C. tropicalis* (8.9%), *C. glabrata* (5.4%) y *C. parapsilosis* (5.4%); sin embargo, aunque este tipo de técnicas permite diferenciar entre las especies de *Candida* no es factible su uso en el diagnóstico porque metodológicamente es complejo y para llevarse a cabo se requiere obtener primero el aislamiento para posteriormente generar los patrones polimórficos.

Por lo que en este trabajo planteamos obtener marcadores SCAR (región amplificada de una secuencia caracterizada) derivados de bandas polimórficas generadas por RAPD usando el oligonucleótido T3B, el cual discrimina claramente entre las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* (Correia *et al.*, 2004). Creemos que estos marcadores serán de gran utilidad para la identificación rápida y certera de dichas especies de *Candida*, mediante PCR, porque tienen la ventaja de poder identificar las levaduras, directamente en muestras clínicas, sin necesidad de aislar primero al patógeno.

JUSTIFICACIÓN

En el Hospital Juárez de México, la candidiasis invasiva es la infección micótica más frecuente en pacientes inmunosuprimidos, principalmente los que se encuentran en el área de cuidados intensivos, en quienes la tasa de mortalidad es elevada (de la Torre-Saldaña *et al.*, 2014). Debido a las dificultades para establecer el diagnóstico de la candidiasis invasivas, mencionadas anteriormente, se hace uso de escalas, como el “*Candida score*”, que ayudan a predecir el riesgo de candidiasis invasiva en los pacientes críticos, y con base en ello iniciar la profilaxis (de la Torre-Saldaña *et al.*, 2014). Sin embargo, los cambios epidemiológicos de la candidiasis invasiva reportados a nivel mundial permiten vislumbrar que este tipo de escalas, aunque han resultado efectivas en muchos casos, pueden ser el origen de otras complicaciones, como son el desarrollo de resistencia a antifúngicos. De ahí la importancia de desarrollar métodos rápidos, específicos y sensibles para el diagnóstico de la candidiasis invasiva. El uso de este tipo de métodos en México es novedoso, porque si bien, en el caso de la bacteriología y la virología los métodos de diagnóstico molecular son cada vez más empleados, en el área de la micología aún no se utilizan de manera rutinaria en los laboratorios intrahospitalarios. Además, la

implementación de este tipo de métodos moleculares nos permitirá tener un panorama más amplio de la epidemiología de la candidiasis invasiva.

HIPÓTESIS

Los marcadores SCAR permiten identificar específicamente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis sensu stricto*, mediante la técnica de PCR.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener marcadores SCAR, a partir de patrones polimórficos generados por RAPD-PCR, para la identificación rápida y específica de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis sensu stricto*.

Objetivos particulares

1. Extraer el ADN de aislados de *Candida* spp., así como de cepas de referencia de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*
2. Estandarizar la técnica de RAPD con el oligonucleótido T3B, para obtener los patrones polimórficos del ADN de los aislados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*
3. Identificar y seleccionar de los patrones polimórficos RAPD, las bandas diferenciales de las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*
4. Purificar y clonar las bandas diferenciales de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*
5. Secuenciar las bandas diferenciales y compararlas en el GenBank con todas las secuencias depositadas para descartar homología con otros patógenos.
6. Diseñar oligonucleótidos (marcadores SCAR), con base en las secuencias

específicas encontradas para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*

7. Estandarizar la PCR con los oligonucleótidos especie-específicos para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*
8. Determinar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados probando ADN de *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans*.
9. Determinar la sensibilidad de los oligonucleótidos especie-específicos mediante la amplificación de diferentes concentraciones del ADN de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Tipo de estudio

Prueba diagnóstica no experimental, prospectivo, longitudinal.

Tamaño de la muestra

Cuarenta aislados de *Candida* spp. (nueve aislados clínicos y una cepa de referencia de cada especie estudiada).

Criterios de selección de la muestra

Inclusión. Se incluirán aislados clínicos identificados fenotípicamente como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*

Exclusión. Se excluirán los aislados clasificados como *Candida* sp.

Definición de variables

- Variable: Amplificación por PCR
- Definición: Producto de la hibridación de los oligonucleótidos al ADN diana de cada especie de *Candida*

- Tipo: Cualitativa, nominal, dicotómica
- Operacionalización: Si (positivo), no (negativo)

Origen de los aislados de *Candida* spp.

Se trabajó con cuatro cepas de referencia correspondientes a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* s. str., obtenidas de la colección ATCC (American Type Culture Collection), y nueve aislados clínicos de cada especie estudiada, procedentes de pacientes atendidos en los diferentes servicios del Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud (SS), del Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), así como de la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Cuadro I).

Las levaduras de *Candida* spp. se cultivaron en agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol a 28 °C durante 48 h y se conservaron a 4 °C.

Cuadro I. Origen de los aislados y cepas de referencia de *Candida* spp.

Código	Especie	Fuente	Origen
18804	<i>C. albicans</i>	Piel	ATCC
71	<i>C. albicans</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
7	<i>C. albicans</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
FM828	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	FM, UNAM
LEV 80	<i>C. albicans</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
316-1	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HRGIZ, ISSSTE
108-2	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HRGIZ, ISSSTE
209-4	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HRGIZ, ISSSTE
104	<i>C. albicans</i>	Secreción de herida	HRGIZ, ISSSTE
407-06	<i>C. albicans</i>	Expectoración	HJM
2001	<i>C. glabrata</i>	Heces	ATCC
79	<i>C. glabrata</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
149	<i>C. glabrata</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
25-C	<i>C. glabrata</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
73	<i>C. glabrata</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
25	<i>C. glabrata</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
FM227	<i>C. glabrata</i>	Urocultivo	FM, UNAM
2	<i>C. glabrata</i>	Exudado vaginal	HJM, SS
109	<i>C. glabrata</i>	Cultivo de biopsias	HRGIZ, ISSSTE
22	<i>C. glabrata</i>	Cultivo de biopsias	HRGIZ, ISSSTE
22019	<i>C. parapsilosis</i> s. str.	-----	ATCC
FM216	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Urocultivo	FM, UNAM
147	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ, ISSSTE
767	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
754	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
11	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ, ISSSTE
147	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ, ISSSTE
626	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Cultivo de abscesos	HRGIZ, ISSSTE
562	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
751	<i>C. parasilopsis</i> s. str.	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
750	<i>C. tropicalis</i>	Espuito	ATCC
FM832	<i>C. tropicalis</i>	-----	FM, UNAM
266	<i>C. tropicalis</i>	Urocultivo	HRGIZ, ISSSTE
70	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
71	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
151	<i>C. tropicalis</i>	Urocultivo	HRGIZ, ISSSTE
152	<i>C. tropicalis</i>	Urocultivo	HRGIZ, ISSSTE
153	<i>C. tropicalis</i>	Espuito	HRGIZ, ISSSTE
154	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE
155	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultivo	HRGIZ, ISSSTE

ATCC- American Type Culture Collection, **HJM, SS-** Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud; **FM, UNAM-** Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, **HRGIZ, ISSSTE-** Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, s. str.- *sensu stricto*.

Extracción de ADN de *Candida* spp.

Previo a la extracción, las cepas de referencia y aislados de *Candida* spp. fueron

resembradas en agar Sabouraud e incubadas a 28 °C, con el fin de obtener cultivos frescos (24 h). Se tomó una colonia aislada, se inoculó en tubos de ensaye conteniendo 3 ml de medio YPD (glucosa 2%, extracto de levadura 1%, peptona 2%) y se incubó a 28 °C con agitación orbital (100 rpm) durante toda la noche. Después se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de amortiguador fosfato salino (PBS), pH 7,4 y se centrifugó 3 min a 10000 rpm, para lavar el botón. El botón se lavó dos veces y posteriormente se extrajo el ADN con el kit comercial Yeast ADN Preparation (Jena Bioscience, GE) de la siguiente manera: se agregaron 300 µl de solución de resuspensión celular, 1 µl de solución de liticasa (2.5 U/µl), se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C por 1 h. Luego se centrifugó, a 10000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 300 µl de solución de lisis celular y 100 µl de solución de precipitación de proteínas, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo conteniendo 300 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10000 rpm por 1 min, el sobrenadante se desechó y se agregaron 500 µl de amortiguador de lavado, se mezcló varias veces por inversión y se centrifugó a 10000 rpm por 1 min y el tubo abierto se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, se agregaron 70 µl de solución de hidratación de ADN, 1.5 µl de ARNsa A (4 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 30 min e inmediatamente después a 65 °C por 1 h, para hidratar el ADN. Los ADN se almacenaron a -20 °C.

La calidad y cantidad de ADN extraído se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm (DS 11 Spectrophotometer, DeNovix, EUA). Las mediciones en el espectrofotómetro se realizaron por duplicado.

Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD)

Para las amplificación del ADN de las cepas de referencia y aislados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*, se utilizó el oligonucleótido T3B, el cual se deriva de un espaciador intergénico del ARNt (Thanos *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2004). La reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 50 µl conteniendo 1-25 ng de ADN de *Candida* spp., 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Jena Bioscience), 25 pmol de oligonucleótido T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3') y 1.5 U de *Taq* ADN

polymerase (Jena Bioscience) en amortiguador para PCR 1X. En todos los ensayos se incluyó un testigo negativo (mezcla de reacción sin ADN). El programa de amplificación consistió en un ciclo de 5 min a 95 °C; 32 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 52 °C y 80 s a 72 °C, y un ciclo de extensión final por 6 min a 72 °C. Al término de la reacción, los productos de amplificación se concentraron a un volumen aproximado de 20 µl (Speed Vac; Savant, Hicksville, NY) y posteriormente se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa, M, ES) al 1.5%, teñido con GelRed™ 3X (Biotium, Hayward, CA) en amortiguador TBE 0.5X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA y pH de 8.3) a 70 v. El marcador de tamaño molecular empleado fue el 100 bp ADN Ladder (Fermentas). Las imágenes de los geles se capturarán en un fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR, (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

Purificación y reamplificación de bandas diferenciales

De los patrones polimórficos generados por RAPD con el oligonucleótido T3B, se identificaron las bandas diferenciales de cada especie de *Candida*. Estas bandas se cortaron del gel con ayuda de un bisturí. Los fragmentos se purificaron usando el kit para extracción a partir de gel de agarosa (Jena Bioscience, GmbH, GE), de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. Los fragmentos de ADN eluido se concentraron al vacío (Instrumental Speed Vac System AES1010) durante 2 h y se eluyeron en 30 µl de agua desionizada. La pureza y concentración del fragmento se verificó por electroforesis en agarosa al 1.5 %. La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente, la concentración de los fragmentos de ADN purificados se determinó por espectrofotometría, a 260 y 280 nm. Los fragmentos purificados se amplificaron nuevamente utilizando el oligonucleótido T3B y las condiciones descritas inicialmente para RAPD-PCR. Al final de la amplificación se adicionó 1.5 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen, EUA) y se incubó en el termociclador a 70 °C por 10 min. Este paso se llevó a cabo con el objetivo de adicionar una adenina a la terminal 3' de cada uno de los amplicones y favorecer la ligación de los mismos al vector de clonación. Posteriormente, los productos de esta segunda amplificación se purificaron por columna usando el kit de purificación de productos de PCR (Jena Bioscience, GmbH, GE), de acuerdo con la metodología descrita por el fabricante.

Ligación de las bandas diferenciales al vector de clonación

Los amplicones finales purificados se concentraron al vacío y se ajustaron a un volumen final de 5 μ l, se tomó 1 μ l de éste y se ligó al vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA) (Fig. 1). Para ello, en un tubo cónico de plástico, de 0.2 ml, se colocó 1 μ l del vector pGEM®-T Easy (Promega), 5 μ l de amortiguador 2x de T4 ADN ligasa (Promega), 1 μ l de T4 ADN ligasa (3 U/ μ l) (Promega) y 3 μ l de agua desionizada para ajustar a 10 μ l. Como testigo positivo, se preparó otro tubo con los mismos reactivos, pero colocando 2 μ l del control de inserción de ADN, en lugar del amplicón purificado. Como testigo negativo, se preparó otro tubo sin control de inserción ni amplicón. Las mezclas de reacción se mezclaron e incubaron a 4 °C durante toda la noche, de acuerdo con las indicaciones descritas en el protocolo de la casa comercial.

Transformación de *Escherichia coli* con las bandas diferenciales ligadas al vector de clonación

Los productos de la ligación, que incluyen los fragmentos amplificados en el vector pGEM®-T Easy Vector (plásmidos), se transformaron en células competentes *E. coli* JM109 de la siguiente manera: Las células competentes JM109 se descongelaron sobre hielo, y se les adicionó 1 μ l del producto de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min e inmediatamente se dio un choque térmico a 42 °C por 90 s y se regresaron las células al hielo por 2 min. Se agregaron 900 μ l de medio Luria-Bertani (LB) (extracto de levadura 2%, peptona 1%, NaCl 1%) a las células competentes y se incubaron a 37°C en agitación por 1 h. Se centrifugaron las células a 5000 rpm por 1 min, se eliminó el sobrenadante hasta la décima parte del volumen inicial. La cantidad total (100 μ l) se sembró en cajas de Petri con medio de selección [LB adicionado de ampicilina 100 μ g/ml, isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) (Sigma) 0.1 M, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) (Sigma) 50 mg/ml] y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente, se seleccionaron las posibles clonas recombinantes (colonias blancas). La caracterización de las clonas recombinantes se realizó por PCR en colonia y posteriormente se llevó a cabo la purificación de los plásmidos.

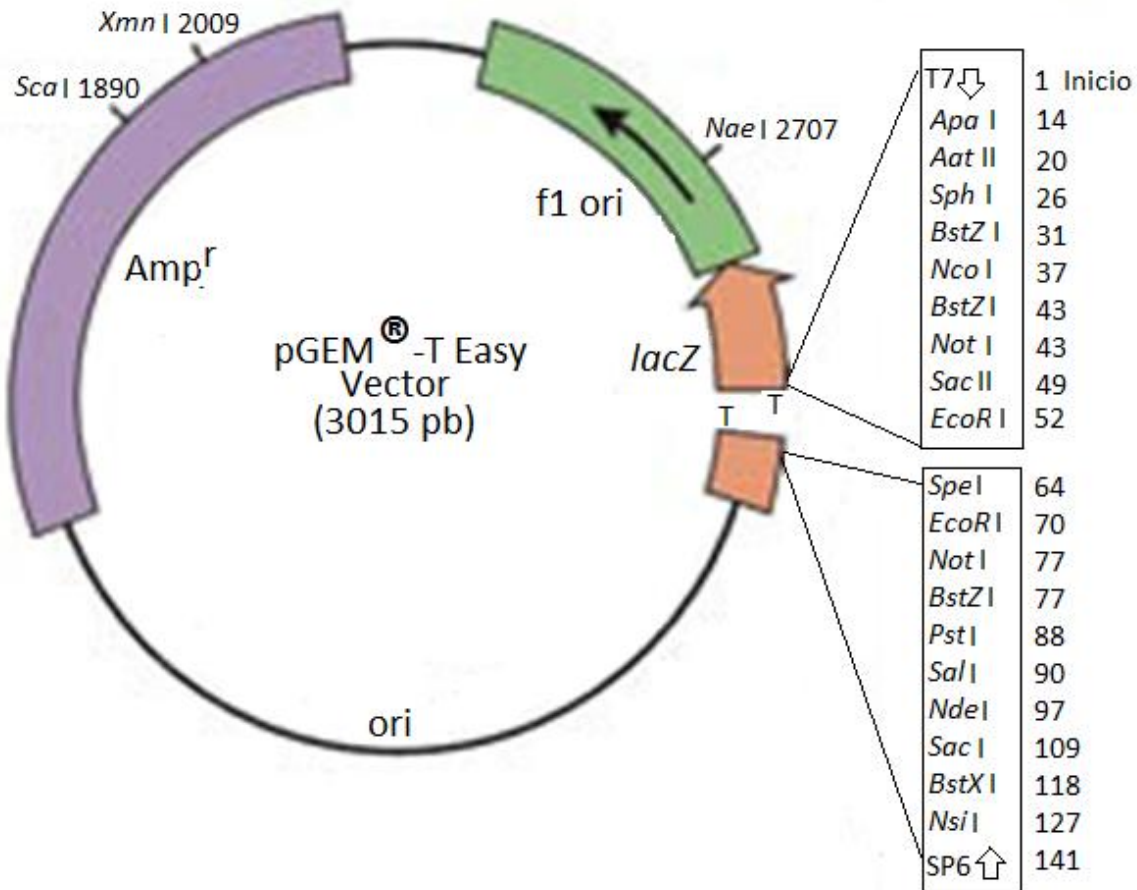


Figura 1. Vector de clonación pGEM®-T Easy. Este vector es una molécula lineal de ADN de doble cadena, con 3015 pb. Posee un sitio de inserción (T-T), conformado por una timidina en la terminal 3' en ambos extremos, lo que previene la recircularización del vector y facilita la unión de un producto de PCR (inserto) generado por ciertas polimerasas termoestable. El sitio de inserción se localiza dentro de la secuencia del gen *lacZ*, que codifica para la β-galactosidasa, esta enzima actúa sobre el compuesto X-Gal para generar un compuesto de color azul. La inactivación del gen *lacZ* por inserción de un producto de PCR permite la identificación de los recombinantes mediante la observación de colonias azules y blancas, desarrolladas en la presencia de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido), el sustrato de la β-galactosidasa, e IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) que induce la transcripción del gen *lacZ*. El sitio de clonación del vector está flanqueado los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa, así como por múltiples sitios de restricción conocidos, los cuales permiten la liberación del inserto con una sola digestión con *EcoRI*, *BstZ I* o *Not I*, o bien por una doble digestión con dos enzimas de diferentes, por ejemplo *ApaI* y *SacI*, de tal manera que los productos de PCR o fragmentos de ADN insertados puede ser fácilmente liberados. El vector también contiene el origen de replicación del fago f1 para la preparación de cadenas de ADN de una sola hebra, un origen (ori) de replicación autónomo para *Escherichia coli*, que permite la replicación autónoma en esta bacteria y un gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r) a la bacteria portadora del vector. Los números en la figura indican la localización en la secuencia de 3015 pb.

Previo a la transformación de *E. coli* con las bandas diferenciales ligadas al vector

de clonación, se determinó la eficiencia de transformación de las células competentes *E. coli* JM109. Para ello, se transformaron 100 μ l de células *E. coli* JM109 con 0.1 ng del vector pGEM®-T Easy (Promega) no digerido, a la reacción de transformación se le agregaron 900 μ l de medio LB (0.1 ng ADN/ml). De ese volumen, se realizó una dilución 1:10 con LB (0.01 ng ADN/ml) y se tomaron 100 μ l para sembrar por duplicado en placas con LB (0.001 ng ADN/100 μ l), se incubó a 37 °C por 24 h. Luego se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se obtuvo el promedio. La eficiencia de transformación se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \text{Promedio de UFC} / 0.001 \text{ ng de ADN plasmídico}$$

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia

Para poner de manifiesto la presencia de insertos y verificar su tamaño, se tomó una asada de cada una de las clonas recombinantes previamente seleccionadas y se resuspendió en 500 μ l de agua desionizada. Se calentó a ebullición en baño de agua durante 5 min y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, se tomaron 5 μ l del sobrenadante para llevar a cabo la PCR en colonia (Frías De León *et al.*, 2012), utilizando oligonucleótidos universales (pUC/M13-F y pUC/M13-R). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l conteniendo 5 μ l del plásmido, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 250 μ M (Jena Bioscience), mezcla de oligonucleótidos 10 pmol y *Taq* polimerasa 2.5 U (Jena Bioscience) en amortiguador 1X (Jena Bioscience). El programa de amplificación consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 55 °C. Finalmente, 5 μ l del producto de reacción se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Purificación de plásmidos por método alcalino

Las clonas seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. El cultivo se transfirió a tubos cónicos de plástico de 1.5 ml y se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200 μ l de solución I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se homogeneizó suavemente. Posteriormente, se agregaron 400 μ l de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y se mezcló

por inversión hasta observar la aparición de hebras de ADN. Se adicionaron 300 µl de solución III (acetato de potasio 5 M 60% V/V, ácido acético glacial 11.5% V/V, agua desionizada 28.5 % V/V) manteniendo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 15000 rpm durante 1 min. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -40 °C por 30 min. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se lavó el botón con etanol al 70% y se secó a temperatura ambiente durante 2 h. El ADN plasmídico se resuspendió en 20 µl de agua desionizada. La presencia del plásmido se comprobó por electroforesis en agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm y 260/230 nm. Los plásmidos se conservaron a -20 °C hasta su secuenciación.

Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*

Antes de enviar a secuenciar los plásmidos purificados, se verificó que contuvieran los fragmentos ligados mediante su liberación por digestión enzimática. Para ello, en tubos de 0.2 ml, se colocaron 10 µl de plásmido purificado, 2 µl de regulador H (*EcoRI* 10X) (Roche), 1 µl de *EcoRI* (50 U/µl) (Roche), 1 µl de ARNasa A 100 µg/µl (Qiagen) y 6 µl de agua desionizada. Se incubó a 37 °C durante 5 h y se conservó a 4 °C. Posteriormente, se analizaron 2 µl del producto de la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con GelRed. Para detectar los fragmentos de elevado tamaño molecular, se utilizó el marcador de peso molecular λ *HindIII* (Roche)/*EcoRI* (Roche), el cual se preparó de la siguiente manera: 10 µl de λ *HindIII* (500 µg/µl) se digirieron con 2 µl de *EcoRI* (50 U/µl) en el amortiguador correspondiente, en un volumen final de 70 µl a 37 °C durante 24 h.

Secuenciación y diseño de oligonucleótidos

Los fragmentos clonados fueron secuenciados en la Unidad de servicios genómicos del Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad-CINVESTAV, Irapuato, utilizando oligonucleótidos universales pUC/M13-F (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') y pUC/M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Promega). Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos clonados se alinearon y compararon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, mediante el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.* 1997), con el propósito de descartar homologías con genes de hongos patógenos relacionados. Con base en los resultados de esta comparación, se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada

especie de *Candida* estudiada, utilizando el programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys (The Woodlands, TX). La concentración de los oligonucleótidos se ajustó a 100 pmol/μl.

Estandarización de las condiciones de reacción para la PCR con los oligonucleótidos específicos

Para la estandarización de los oligonucleótidos diseñados para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*, se probaron diferentes temperaturas de alineamiento (60, 62, 67 y 70 °C) y curvas de concentración de MgCl₂ (1, 1.2, 1.4 y 1.5 mM), ADN (5, 10, 15 y 20 ng), dNTP (50, 100, 150 y 200 μM) y oligonucleótidos (50, 75, 100 y 200 pmol/μl). El programa de amplificación inicial consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C; 30 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a 70 °C, 2 min a 72 °C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. Las curvas se realizaron con cuatro ADN, uno representativo de cada especie. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5%. Como marcador de tamaño molecular, se utilizó el 100 pb ADN Ladder (Jena Bioscience).

Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos específicos

Con las condiciones óptimas de amplificación determinadas para la PCR, se amplificaron todos los ADN de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis s. str.* y *C. tropicalis*, así como los ADN de otros microorganismos patógenos (*H. capsulatum*, *S. schenckii*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. neoformans*).

Evaluación de la sensibilidad de los oligonucleótidos específicos

Para determinar la cantidad mínima de ADN fúngico que puede ser detectada por PCR, se eligió un ADN de cada especie de *Candida* estudiada, se cuantificó en espectrofotómetro a 260 y 280 nm y posteriormente se hicieron diluciones que contenían concentraciones de 20 ng/μl hasta 1 ag/μl. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en agarosa al 1.5 %.

Consideraciones de bioseguridad

Manejo de las muestras biológicas. Como *Candida spp.* es un patógeno nivel 2, la obtención del ADN se hizo en campanas de seguridad biológica. Estos equipos tienen como objetivo principal proporcionar una zona de trabajo que minimice la probabilidad de que una partícula transportada por el aire escape hacia el exterior de la cabina y contamine así al operario y la zona que le rodea. Por otro lado, todo el material de desecho se esterilizó para posteriormente lavarlo o eliminarlo.

Manejo de material contaminado. Después de manejar los cultivos fúngicos, se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 1 h, antes de su eliminación, siguiendo las indicaciones de la Comisión de Bioseguridad del Hospital Juárez de México.

Consideraciones éticas

Investigación sin riesgo. Los aislados fúngicos utilizados en el estudio fueron obtenidos del laboratorio de análisis clínicos. Las muestras procedieron de pacientes a quienes el médico tratante solicitó el cultivo en búsqueda de *Candida*, por lo que no se requirió de consentimiento informado por parte de los pacientes.

RESULTADOS

Extracción de ADN *Candida spp.*

De acuerdo con el análisis espectrofotométrico y electroforético, la cantidad e integridad de los ADN obtenidos, correspondientes a los 50 aislados y cepas de referencia de *Candida spp.*, fue adecuada para los ensayos de PCR. Las lecturas realizadas en espectrofotómetro mostraron concentraciones entre 20.7 y 74.2 ng/ μ l, con una pureza adecuada, ya que todos los valores de la relación de absorbancia a 260 y 280 nm se encontraron entre 1.7-1.9, valor que indica que una muestra de ADN es pura (Cuadro II), lo cual se pudo corroborar en el corrimiento electroforético, en donde se observó una sola banda (Fig. 2). Así mismo, las concentraciones de ADN, determinadas por comparación con diferentes concentraciones de fago λ , concordaron con las determinadas por espectrofotometría. Los ADN obtenidos de cada uno de los aislados de *Candida spp.* se diluyeron a 10 ng/ μ l con agua desionizada, para los ensayos de RAPD.

Cuadro II. Cuantificación por espectrofotometría de los ADN obtenidos de los aislados clínicos y cepas de referencia de *Candida* spp.

No. de registro	Especie	Concentración (ng/μl)	A260/A280
18804	<i>C. albicans</i>	65.3	1.70
71	<i>C. albicans</i>	32.4	1.89
7	<i>C. albicans</i>	28.6	1.77
FM828	<i>C. albicans</i>	49.7	1.89
LEV 80	<i>C. albicans</i>	65.6	1.91
316-1	<i>C. albicans</i>	74.1	1.90
108-2	<i>C. albicans</i>	29.4	1.87
209-4	<i>C. albicans</i>	45.5	1.75
104	<i>C. albicans</i>	74.2	1.76
407-06	<i>C. albicans</i>	34.8	1.72
2001	<i>C. glabrata</i>	35.9	1.80
79	<i>C. glabrata</i>	45.6	1.83
149	<i>C. glabrata</i>	44.4	1.76
25-C	<i>C. glabrata</i>	29.8	1.85
73	<i>C. glabrata</i>	67.0	1.81
25	<i>C. glabrata</i>	73.2	1.91
FM227	<i>C. glabrata</i>	24.1	1.90
2	<i>C. glabrata</i>	23.8	1.88
109	<i>C. glabrata</i>	49.0	1.78
22019	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	54.6	1.76
FM216	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	57.1	1.71
147	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	67.8	1.75
767	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	65.2	1.76
754	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	37.4	1.84
11	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	47.7	1.87
147	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	71.4	1.90
626	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	41.1	1.87
562	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	58.2	1.95
751	<i>C. parapsilosis s. str.</i>	49.5	1.79
750	<i>C. tropicalis</i>	57.8	1.83
FM832	<i>C. tropicalis</i>	64.6	1.92
266	<i>C. tropicalis</i>	35.6	1.85
70	<i>C. tropicalis</i>	58.9	1.78
71	<i>C. tropicalis</i>	57.7	1.90
151	<i>C. tropicalis</i>	40.2	1.80
152	<i>C. tropicalis</i>	47.5	1.78
153	<i>C. tropicalis</i>	34.9	1.86
154	<i>C. tropicalis</i>	23.6	1.90
155	<i>C. tropicalis</i>	20.7	1.86

A260/A280- cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, *s. str.*- *sensu stricto*

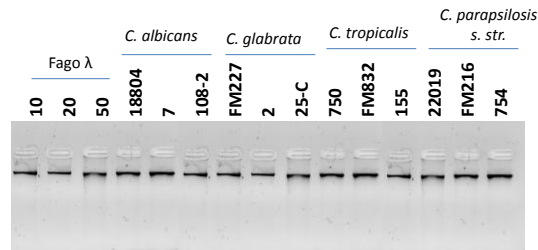


Figura 2. Cuantificación por electroforesis de ADN obtenidos de aislados clínicos y cepas de referencia de *Candida* spp. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con diferentes concentraciones (10, 20 y 50 ng/μl) de ADN de fago λ.

Amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD)

Inicialmente, se utilizaron las condiciones de reacción descritas por Correia *et al.*, (2004) y Thanos *et al.*, (1996) para obtener los patrones polimórficos de *Candida* spp., sin embargo, no se logró la amplificación de los ADN (Fig. 3), por lo que se procedió a la estandarización del RAPD mediante la realización de curvas de concentración de ADN, oligonucleótidos y MgCl₂, así como diferentes temperaturas de alineamiento.

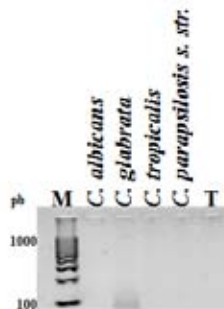


Figura 3. RAPD de cepas de referencia de *Candida* spp. La reacción se llevó a cabo utilizando las condiciones de reacción descritas por Correia *et al.* (2004) y Thanos *et al.* (1996). M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Curva de temperatura de alineamiento

La estandarización se inició probando tres temperaturas de alineamiento diferentes (36, 42 y 47 °C). Los resultados mostraron que al disminuir la temperatura el patrón de bandeo era mayor (Fig. 4), por lo que se eligió la temperatura de 36 °C para continuar la estandarización de la técnica.

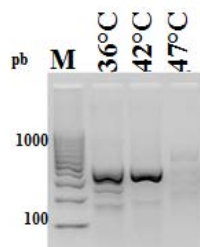


Figura 4. Curva de temperatura de alineamiento para la obtención de patrones polimórficos de *Candida albicans*, usando el oligonucleótido T3B. La amplificación se llevó a cabo a 36, 42 y 47 °C. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb.

Curva de concentración de ADN

En el RAPD se probaron 10, 20, 30 y 40 ng/μl de ADN, utilizando dos ADN diferentes, uno de *C. albicans* y otro de *C. parapsilosis s. str.* A la concentración de 10 ng/μl los patrones polimórficos fueron más nítidos (Fig. 5), por lo que se continuó la estandarización del RAPD utilizando esta concentración de ADN.

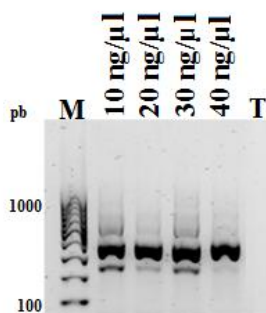


Figura 5. Curva de concentración de ADN para la obtención de patrones polimórficos de *C. glabrata*, usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Curva de concentración de oligonucleótidos

Se realizaron ensayos de RAPD utilizando 25, 50 y 100 pmol/μl del oligonucleótido T3B. Los resultados muestran que la concentración adecuada para la amplificación del ADN de *Candida* spp. fue de 50 pmol/μl (Fig. 6).

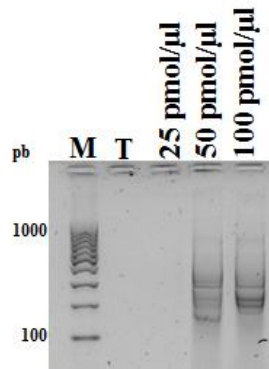


Figura 6. Curva de concentración de oligonucleótido T3B para la obtención de patrones polimórficos de *Candida* spp. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Curva de concentración de MgCl₂

Las concentraciones de MgCl₂ probadas en la estandarización fueron 1.5, 2, 2.5 y 3 mM, siendo 2.5 mM la concentración a la que se observaron los patrones polimórficos más adecuados (Fig. 7).

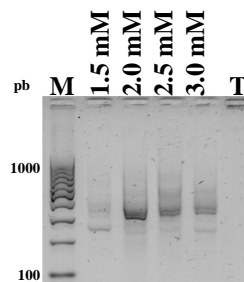


Figura 7. Curva de concentración de MgCl₂ para la obtención de patrones polimórficos de *Candida* spp., usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Con base en los resultados de las curvas de concentración de reactivos y temperaturas de alineamiento, se determinaron, como óptimas, las siguientes condiciones para la amplificación del ADN de *Candida* spp.: 10 ng de ADN, 50 pmol/μl de T3B, 2.5 mM de MgCl₂, y una temperatura de alineamiento de 36 °C.

Con las condiciones ya estandarizadas, se amplificaron los ADN de las cepas de referencia y de los aislados clínicos. Los patrones mostraron diferentes bandas,

comprendidas entre los 180 y 1000 pb (Fig. 8). Los patrones fueron distintos para cada especie. Dentro de la misma especie, la mayoría de los patrones fueron monomórficos, aunque también se puede observar también la variabilidad intraespecie que hay en los aislados estudiados (Fig. 9).

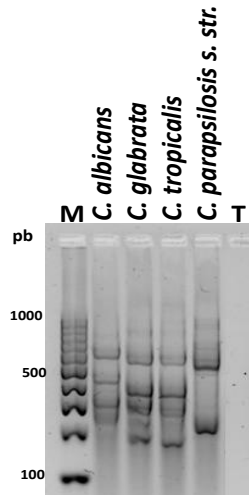


Figura 8. Patrón polimórfico por RAPD a partir del ADN de aislados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis sensu stricto*, usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.



Figura 9. Patrón polimórfico por RAPD a partir del ADN de aislados de *Candida glabrata*, usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

La reproducibilidad del ensayo se verificó llevando a cabo 10 amplificaciones de cada ADN en distintas ocasiones, observando en todos los casos que el patrón polimórfico obtenido fue el mismo (Fig. 10).

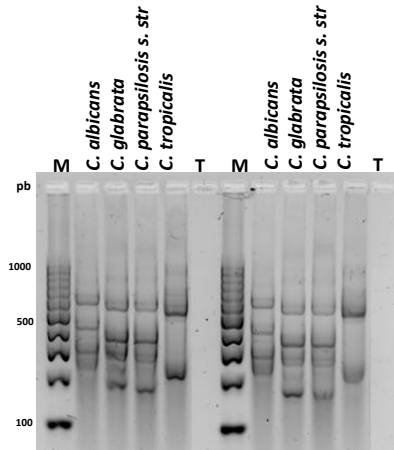


Figura 10. Reproducibilidad de los patrones polimórficos generados por RAPD a partir del ADN de aislados de *Candida* spp., usando el oligonucleótido T3B. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

De los patrones polimórficos se observaron cinco bandas diferenciales entre las especies de *Candida* estudiadas (Fig. 11, Cuadro III).

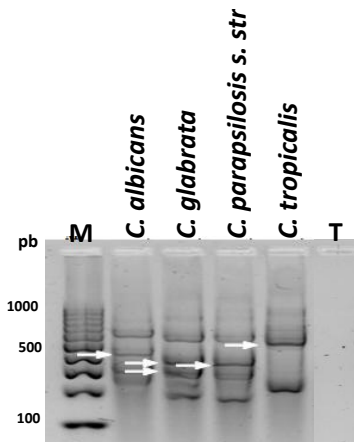


Figura 11. Bandas diferenciales en los patrones polimórficos de *Candida* spp., obtenidos por RAPD con el oligonucleótido T3B. Las flechas blancas indican las bandas diferenciales. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Cuadro III. Bandas diferenciales observadas en los patrones polimórficos de las cepas de referencia de *Candida*, generados por RAPD con el oligonucleótido T3B

Especie	Bandas diferenciales (pb)
<i>Candida albicans</i>	500
<i>Candida glabrata</i>	300 y 400
<i>Candida parapsilopsis s. str.</i>	400
<i>Candida tropicalis</i>	600

pb: pares de bases

Purificación y reamplificación de bandas diferenciales

Las bandas seleccionadas y purificadas se obtuvieron adecuadamente, ya que por electroforesis, observamos una sola banda del tamaño previamente determinado en los patrones polimórficos (Fig. 12). Después de purificar, las bandas fueron reamplificadas con las mismas condiciones de reacción empleadas para la obtención de los patrones polimórficos.

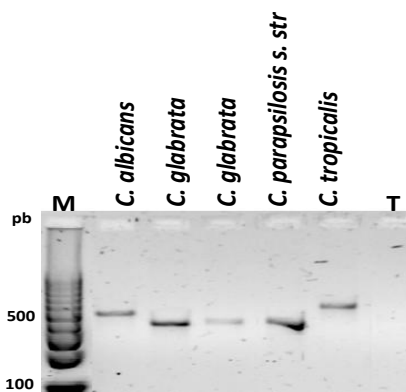


Figura 12. Purificación de bandas diferenciales de *Candida* spp. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Transformación de *E. coli* con las bandas diferenciales ligadas al vector de clonación

El promedio de las colonias, obtenidas como resultado de la transformación de las células *E. coli* JM109 con 0.1 ng del vector pGEM®-T Easy (Promega) no digerido, fue de 139 UFC, por lo que la eficiencia de transformación fue:

$$\text{Eficiencia} = 139 \text{ UFC} / 0.001 \text{ ng de ADN plasmídico} = 1.39 \times 10^5 \text{ UFC} / \text{ng de ADN}$$

plasmídico.

Este resultado de eficiencia fue adecuado para la transformación, ya que la casa comercial del vector de clonación recomienda una eficiencia de 1×10^5 UFC / ng de ADN.

Después de determinar la eficiencia de transformación de las células competentes, las cinco bandas diferenciales (500, 300, 400, 400 y 600 pb) ligadas al vector de clonación pGEM®-T Easy, se utilizaron para la transformación de las células competentes *E. coli* JM109. La selección de clonas recombinantes se basó en el color que desarrollaron las colonias en el medio selectivo LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, en donde las clonas recombinantes presentaron color blanco debido a que la secuencia del gen que codifica para la β -galactosidasa se interrumpe al integrar un fragmento de ADN, y por lo tanto las células pierden la capacidad de degradar el X-Gal presente en el medio. Por otro lado, las clonas que no tenían algún fragmento de ADN integrado, conservaron intacta la secuencia de la β -galactosidasa y la capacidad de degradar el X-Gal presente en el medio, desarrollando una pigmentación azul (Fig. 13). Se seleccionaron 10 clonas recombinantes por cada especie de *Candida* estudiada, las cuales se sembraron en medio LB/Ampicilina para analizarlas posteriormente.

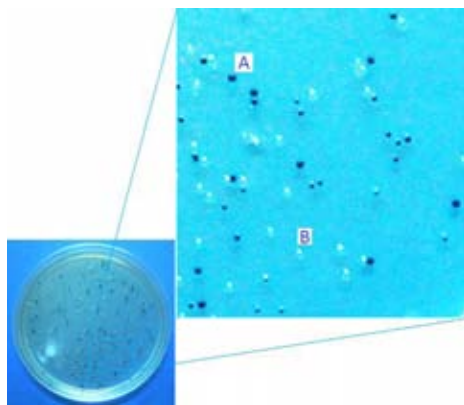


Figura 13. Selección de clonas recombinantes obtenidas en medio de selección Lb/Amp/IPTG/X-Gal. Las clonas que no tienen un fragmento de ADN de *Candida* spp. integrado desarrollaron una pigmentación azul por la degradación del X-Gal (A). Las clonas que contienen alguno de los fragmentos de interés no desarrollaron pigmentación (B).

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia

Para verificar que las clonas elegidas realmente contienen los fragmentos de interés, se llevó a cabo una PCR con el material genómico de cada clona liberado por calentamiento a ebullición de una muestra de la clona y los oligonucleótidos pUC/M13-F y pUC/M13-R. El producto de la amplificación nos reveló cinco tipos de clonas (Fig. 14): las que tienen integrado el fragmento de: 1) 500 pb de *C. albicans*, 2) 400 pb de *C. parapsilosis*, 3) 600 pb de *C. tropicalis*, 4) 300 pb y 5) 400 pb de *C. glabrata*. Es importante mencionar que el tamaño que se observa en la figura es ligeramente mayor al observado en la reamplificación debido a que se amplifica tanto el fragmento integrado como una parte del vector, aproximadamente 250 pb, lo cual incrementa el tamaño del producto de amplificación.

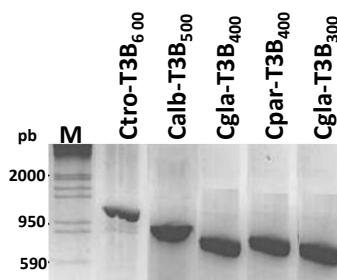


Figura 14. Caracterización de clonas recombinantes mediante PCR. M: tamaño molecular de fragmentos del fago λ digeridos con *HindIII/EcoRI*.

Después de verificar la transformación, se eligió sólo una clona representativa de cada tipo, dichas clonas se nombraron de la siguiente manera: Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀. En donde Calb, Cgla, Cpar y Ctro corresponden a las especies. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis s. str.* y *C. tropicalis*, respectivamente; T3B indica el oligonucleótido que generó el fragmento y los números 500, 300, 400, 400 y 600 corresponden al tamaño de cada fragmento clonado.

Purificación de plásmidos por método alcalino

Los plásmidos de las cinco clonas seleccionadas Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀ fueron liberados y purificados por los métodos alcalino, como se encuentra especificado en la metodología. Por electroforesis, se observó que los

plásmidos presentaron un tamaño molecular mayor al del vector pGEM-T-Easy® (3015 pb), esto debido a que contienen los fragmentos de ADN de 300-600 pb (Fig. 15).

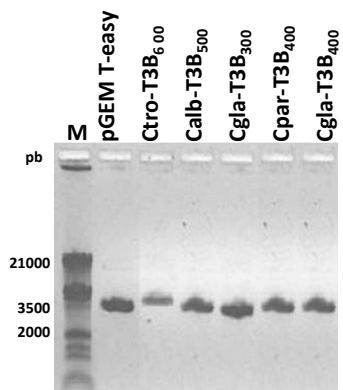


Figura 15. Purificación de plásmidos por método alcalino de las clonas Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀. M: tamaño molecular de fragmentos del fago λ digeridos con *HindIII/EcoRI*.

Liberación del fragmento ligado por digestión con *EcoRI*

Al digerir los plásmidos obtenidos de las clonas Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀ con la enzima de restricción *EcoRI*, se observaron dos bandas, la de mayor tamaño (3015 pb) correspondiente al vector de clonación y las de menor tamaño correspondientes a los fragmentos clonados de 300-600 pb (Fig. 16).

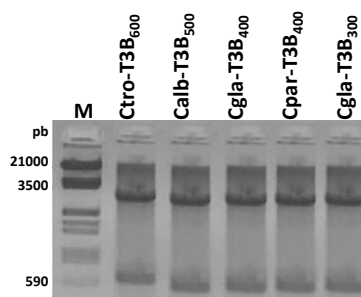


Figura 16. Digestión de los plásmidos obtenidos de las clonas Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀ con la enzima *EcoRI*. M: tamaño molecular de fragmentos del fago λ digerido con *HindIII/EcoRI*.

Secuenciación y diseño de oligonucleótidos

De las clonas Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀ se realizaron mini preparaciones para obtener suficiente plásmido (>120 ng/μl) para la secuenciación. La concentración de ADN plasmídico fue de 195.5 - 277.5 ng/μl, con una adecuada calidad (260/280= 1.7 - 2.0 y 260/230= 2.0), como se detalla en la Cuadro IV.

Cuadro IV. Cuantificación por espectrofotometría de los plásmidos purificados

Plásmido	Concentración (ng/μl)	A260/A280	A260/230
Calb-T3B ₅₀₀	240.1	2.0	2.0
Cgla-T3B ₃₀₀	195.5	1.7	2.1
Cgla-T3B ₄₀₀	277.5	1.8	2.0
Cpar-T3B ₄₀₀	263.6	1.8	2.0
Ctro-T3B ₆₀₀	276.9	1.9	2.2

A260/A280- Relación de lecturas de absorbancia a las longitudes de onda 260 y 280 nm

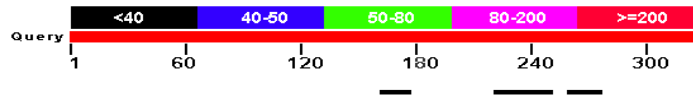
A260/A230- Relación de lecturas de absorbancia a las longitudes de onda 260 y 230 nm

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa CHROMAS Versión 1.48 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y se alinearon con el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.*, 1997) con las secuencias de *Candida* spp., así como de todos los hongos registradas hasta la fecha, en el GenBank.

Se encontró que las secuencias de Calb-T3B₅₀₀, Cgla-T3B₃₀₀, Cgla-T3B₄₀₀, Cpar-T3B₄₀₀ y Ctro-T3B₆₀₀ presentaban escasa similitud con las secuencias depositadas en el GenBank (Altschul *et al.*, 1997), correspondientes únicamente a diferentes especies de *Candida* (Fig. 17). En el caso de la secuencia de la clona Cpar-T3B₄₀₀, se observó una similitud de 99-100% con la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del ARNr de *C. parapsilosis* (Fig. 18).

Calb-T3B₅₀₀

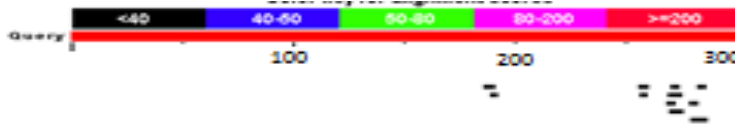
TCAGCAGCTGCTCTCCGAGTATGATCGTGTACTGTGCGTACGCAGATTATGTTAAGCAGTAAAGGTTGTGGCTTCACGTC
 AATATACGCTGGCTGATCTTTAC TGACAGAGTTGTAGGCGCC TCGTACCCTCTGAG AAGTC TCTTGGGACAAAG AAGCGAGG
 GGAGAATTCATCTCTTCTGATGC TGGCCGAC TG TGC GGT TTT TTTAC TG TTGAATTAAAAACC TTGACAC TG TTTTGAAG
 AGACCCCGTTCTTAC AAG AATTAAATTCACCTGCCGTGAACATCGACCC TCAGATGATCGTAAAATC ACGG TTTTGGG



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Candida albicans SC5314 likely vesicula transport factor Uso 1p (USO1) mRNA, partial cds	33.7	33.7	9%	0.25	85%	XM_70502
Candida albicans SC5314 hypothetical protein (CaO19.3247) mRNA, complete cds	30.1	30.1	5%	3.1	95%	XM_71284
Candida albicans SC5314 potential chromatin remodeling complex compoent Rvb2p (RVB2) mRNA, complete cds	30.1	30.1	4%	3.1	100%	XM_71628

Cgla-T3B₃₀₀

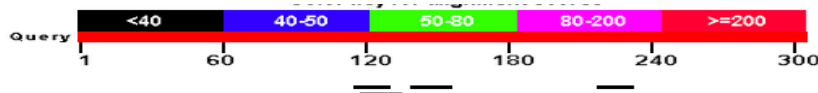
AGGCCG AACATTTTGAAGGACGTATAGTATACTCAAGCTATGCA TCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCC ATATGGTCGACC TGC
 AGGGCGCCGCAATTCAC TAGTGATTAGGTCGCGGGTTCGAATCGCGCACCGCC TCCAGC AACCGATCGGCGTCTTTGGGG
 GATCGCAGCAGGTACAACGTC TCATCAA TCGACGCCATTCGCTGCCGCACACCAGCACC GCGCCTTCGCCGCGTTCCAGCGT
 GATCGCCAGCGGCTACAGTCGGCAACGACCCGCTCGATCGCTCCGCC



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Candida glabrata CBS 138: hypothetical protein partial mRNA	33.7	33.7	1%	0.63	95%	XM_447710.1
Candida glabrata CBS 138: hypothetical protein partial mRNA	33.7	33.7	1%	0.63	100%	XM_446637.1
Candida glabrata CBS 138: hypothetical protein partial mRNA	31.9	31.9	2%	2.2	85%	XM_448232.1
Candida glabrata CBS 138: hypothetical protein partial mRNA	30.1	30.1	1%	7.7	100%	XM_449654.1

Ctro-T3B₆₀₀

GAGCTAGAGAGAGAGTACCAGTGGAGTGTGGGGGCTGTAGTGATGTTGACTGGTGCGAGAAGGGGAAGGCGATGAAAAGAA
 TCGTGGCGTCGCGCGGGAAAAATGGGC TGGGCAGGGTGTGCTTCGTTGGGCATATGCACGACTTTGGATGGATTAGTCGCT
 CCTTACCGGTGAGCACGAAACAAC TTCGCCAAACGAGCGTCGGTGAAGGTCGGGTAGTTTTTGTGATCGTCGCTCGGTCAGC
 GTCAGCC TGC GCTAGGTGC TTGTTCTACGCGTCAAATGCGCGCAGAGCGCGCGCGCGGAGC TAGAGAGAGAGTACCAG
 TGGAGTGTGGGGGCTGTAGTGATGTTGACTGGTGCAGAAAGGGGAAGGCGATGAAAAG AATGCTGGCGTCGCGCGGGAAA
 AATGGGCTGGGCAGGGTGTGCTTCGTTGGGCATATGCACGACTTTTGGATGGATTAGTCGCTCCTTACCGGTGAGCACGAAAC
 AACTTCGCCAAACGAGCGTCGGTGAAGGTCGGGTAGTTTTT



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Candida tropicalis MYA-3404 predicted protein, mRNA	28.3	28.3	4%	7.5	100%	XM_002550864.1
Candida tropicalis MYA-3404 hypothetical protein, mRNA	28.3	28.3	4%	7.5	100%	XM_002549160.1
Candida tropicalis MYA-3404 hypothetical protein, mRNA	28.3	28.3	5%	7.5	94%	XM_002546869.1
Candida tropicalis MYA-3404 predicted protein, mRNA	28.3	28.3	5%	7.5	94%	XM_002545726.1

Figura 17. Alineamiento de la secuencia de las clonas Calb-T3B₅₀₀ Cgla-T3B₃₀₀ Ctro-T3B₆₀₀ con las secuencias depositadas en el GenBank.



Figura 18. Alineamiento de la secuencia de la clona Cpar-T3B₄₀₀, mediante el algoritmo BLASTn, con las secuencias depositadas en el GenBank.

Con base en la secuencia de las cuatro clonas se diseñaron cuatro pares de oligonucleótidos (Cuadro V). Los marcadores moleculares SCAR corresponden al fragmento amplificado por cada par de oligonucleótidos diseñados y son denominados con las primeras letras de la especie y el tamaño del amplicón, por ejemplo el marcador SCAR de 158 pb de *C. albicans* se llama Calb₁₅₈.

Para el diseño de los oligonucleótidos, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: la longitud ideal de los oligonucleótidos (18 a 25 pb), el porcentaje de guanina-citosina (40 a 60%), la temperatura de alineamiento (T_m) (55 a 70 °C), además deben ser

100% complementarios al ADN molde, no autocomplementarse, ni formar estructuras secundarias que impidan el alineamiento de los oligonucleótidos al ADN molde.

Cuadro V. Oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias obtenidas de las clonas analizadas

SCAR	Clona	Oligonucleótidos 5' --- 3'	T _m (°C)	%GC	Amplición (pb)
Calb₁₅₈	Calb- T3B ₅₀₀	CalbF- GGC GGG ATCGCTTTGACAATGGC	77.4	60.8	158
		CalbR- TCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTG	75.8	45.1	
-----	Cgla- T3B ₃₀₀	La secuencia de esta clona no fue adecuada para el diseño de oligonucleótidos			
Cgla₂₂₅	Cgla- T3B ₄₀₀	CglaF- GAGTTCTCCAGTGGATGCAAACACAAACAAT A	75.6	41.1	225
		CglaR- CCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTG	77.5	60	
Cpar₂₅₀	Cpar- T3B ₄₀₀	CparF- GCCTTCTATATGGGGCCTGCCAGAGATTAAC	75.1	50	250
		CparR- CCGAGGGTTTGAGGGAGAAATGACGC	76.7	57.6	
Ctro₂₁₂	Ctro- T3B ₆₀₀	CtroF- TGGACCCAACCGAGCCTTTCCTTCTG	77.2	57.6	212
		CtroR- ACCTCTGACA ACTGAATACTGATACCCCGACC	76.0	51.5	
		CdubR- CGACGCCAGAGACCGCCTTAGCAAT	76.6	60.0	

GC- Guanina-Citosina; T_m- Temperatura de fusión; pb- pares de bases; SCAR- Región amplificada de una secuencia caracterizada

Sin embargo, cuando estos oligonucleótidos se utilizaron en la PCR para identificar las diferentes especies de *Candida* estudiadas, se observó inespecificidad, ya que amplificaron más de una especie de *Candida* (Fig. 19).

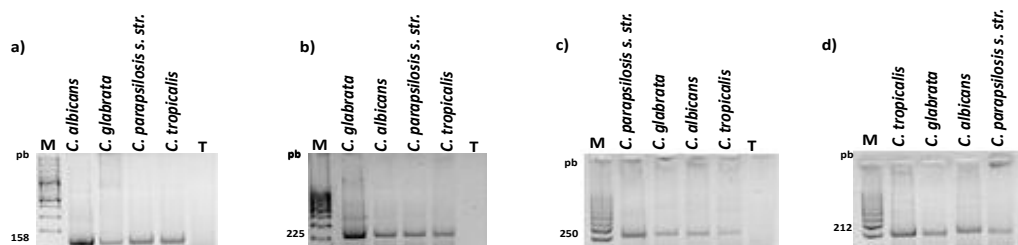


Figura 19. Amplificación inespecífica de *Candida* spp., con los oligonucleótidos **a)** CalbF y CalbR, **b)** CglaF y CglaR, **c)** CparF y CparR, **d)** CtroF y CtroR. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Debido a los resultados obtenidos, se realizó un rediseño de oligonucleótidos tomando como base las secuencias EU552502.1, EU564205.1, EU552503.1, EU564195.1, EU552501.1, ya que con éstas la secuencia completa de Cpar-T3B₄₀₀ mostró mayor similitud. Para ello, se hizo un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal Omega

(URL 2), y se llevó a cabo la búsqueda manual de regiones únicas (inserciones, deleciones de varios nucleótidos o regiones con secuencias únicas) para cada especie de *Candida* estudiada, con ayuda de los programas Bioedit ver 7.2.5 (Hall, 1999) y GeneDoc ver. 2.7 (Nicholas *et al.*, 1997), una vez localizadas dichas regiones se diseñó un nuevo par de oligonucleótidos, con el programa Primer-BLAST, que identifica cada especie estudiada con un amplicón de distinto tamaño (Cuadro VI).

Cuadro VI. Oligonucleótidos diseñados para la discriminación de *Candida* spp.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	T _m (°C)	% GC	Especie	Amplicón (pb)	Marcador SCAR
Ca_{spp}-F	AGCTTGC GTT GATTACGTCCCTGCC	76.9	57.6	<i>C. albicans</i>	850	Ca ₈₅₀
				<i>C. glabrata</i>	1000	Cgl ₁₀₀₀
Ca_{spp}-R	TTC ACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCC	75.7	55.5	<i>C. tropicalis</i>	790	Ctr ₇₉₀
				<i>C. parapsilosis s. str.</i>	731	Cpa ₇₃₁

T_m- temperatura de fusión, pb- pares de bases, SCAR- Región amplificada de una secuencia caracterizada

Estandarización de las condiciones de reacción para la PCR con los oligonucleótidos específicos

La amplificación de los fragmentos esperados para las especies de *Candida* estudiadas se obtuvo adecuadamente con todas las concentraciones de reactivos y temperaturas de alineamiento probadas (Fig. 20), por lo que se eligieron, en un volumen final de reacción de 25 µl, 10 ng de ADN genómico, dNTP 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótido 50 pmoles de cada uno y *Taq* ADN polimerasa 1 U en amortiguador de PCR 1X. El programa de amplificación óptimo consistió de un ciclo de 5 min a 94 °C; 30 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 70 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C.

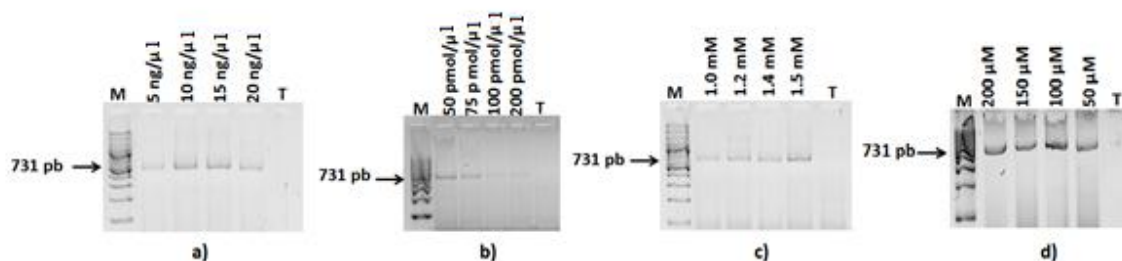


Figura 20. Estandarización de la amplificación del ADN de *Candida* spp., con los oligonucleótidos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-R. La figura muestra los resultados de las curvas de concentración de a) ADN, b)

oligonucleótidos, **c)** MgCl₂ y **d)** dNTP. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Evaluación de la especificidad de los oligonucleótidos

Con estas condiciones de reacción se amplificó el ADN de todos los aislados incluidos en el estudio, observando la banda del tamaño esperado para cada especie (Fig. 21).

Así mismo, se comprobó que los marcadores son específicos, ya que amplificaron la banda esperada en los ADN de todos los aislados incluidos en este estudio (Fig. 22), y no amplificaron el ADN de otros microorganismos patógenos (Fig. 23).

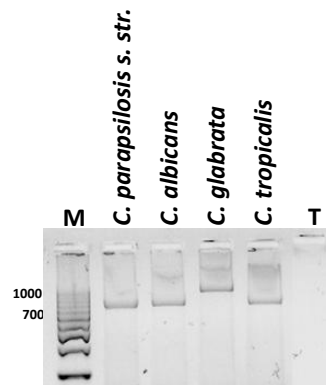


Figura 21. Amplificación de aislados de *Candida* spp. con los oligonucleótidos específicos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-R. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: Testigo negativo.

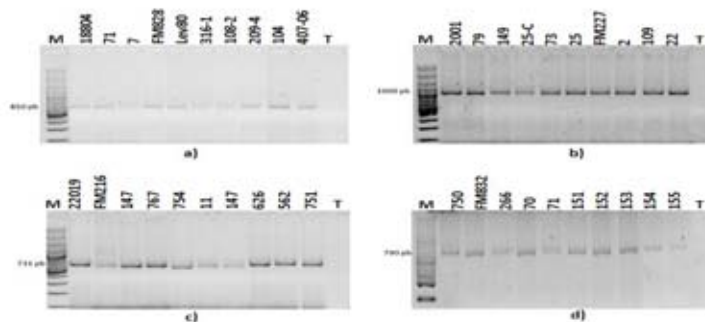


Figura 22. Amplificación, con los oligonucleótidos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-F, del ADN obtenido de aislados de **a)** *C. albicans*, **b)** *C. glabrata*, **c)** *C. parapsilosis s. str.*, **d)** *C. tropicalis*. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: Testigo negativo.

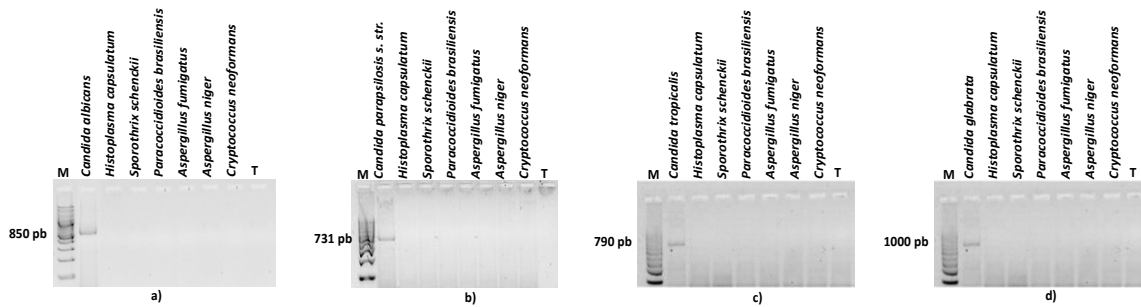


Figura 23. Especificidad de los marcadores SCAR **a)** Ca₈₅₀, **b)** Cgl₁₀₀₀, **c)** Ctr₇₉₀, **d)** Cpa₇₃₁, utilizando ADN de otros hongos patógenos. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: testigo negativo.

Evaluación de la sensibilidad de los oligonucleótidos específicos

Los oligonucleótidos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-R amplificaron el ADN, de las cuatro especies de *Candida* estudiadas, desde una concentración de 20 ng/μl - 10 pg/μl, por lo que la sensibilidad de los marcadores SCAR Ca₈₅₀, Cgl₁₀₀₀, Ctr₇₉₀ y Cpa₇₃₁ es de 10 pg/μl (Fig. 24).

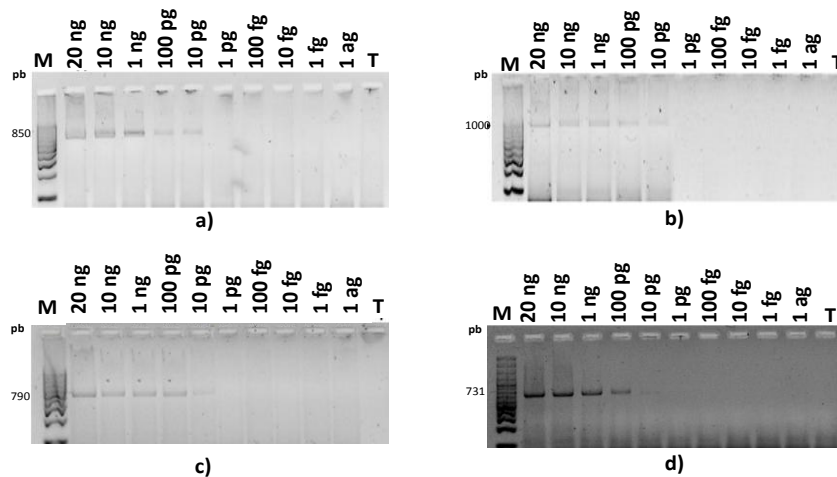


Figura 24. Sensibilidad de los marcadores SCAR **a)** Ca₈₅₀, **b)** Cgl₁₀₀₀, **c)** Ctr₇₉₀ y **d)** Cpa₇₃₁. La cantidad mínima detectada fue de 1 pg/μl. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. T: Testigo negativo.

DISCUSIÓN

A nivel internacional, está documentado que cerca del 90% de las candidiasis invasiva son causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*; sin embargo, se han aislado cada vez con mayor frecuencia *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. famata*, *C. intermedia*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. stellatoidea* y *C. kefyr* (Ruhnke *et al.*, 2011; Sardi *et al.*, 2013; Bassetti *et al.*, 2015; Caggiano *et al.*, 2015). Este cambio en la etiología de la candidiasis invasiva posee una especial relevancia clínica y terapéutica, debido a la resistencia intrínseca que poseen algunas de las especies no-*albicans* frente a los antifúngicos disponibles para su tratamiento (Gómez Quintero, 2010). Por ello, resulta trascendental identificar las levaduras a nivel de especie para el diagnóstico de la candidiasis invasiva, ya que de este resultado depende, en parte, la elección adecuada del tratamiento antimicótico.

En México, de acuerdo con los datos reportados en la última década, las principales especies causantes de candidiasis invasiva son: *C. albicans*, *Candida* sp., *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. zeylanoides*, *C. utilis*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* y *C. boidinii* (Reyna *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2007; Arellano *et al.*, 2008; González *et al.*, 2008; Hernández-Castro *et al.*, 2010; Íñiguez *et al.*, 2009; Rivera-Sánchez *et al.*, 2010; Méndez-Tovar *et al.*, 2012; Aguilar-García, 2013; González *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2013; Corzo-León *et al.*, 2014; De la Torre-Saldaña *et al.*, 2014). Estos datos son similares a los de otros países; sin embargo, destaca el reporte de *Candida* sp. como segundo agente más frecuente, ya que esto no solo limita el conocimiento sobre la etiología de la candidiasis invasiva en nuestro país, sino que puede tener implicaciones importantes en el manejo terapéutico de los pacientes. Esta situación puede deberse a que los métodos comúnmente utilizados, para la identificación de *Candida* spp., se basan en características fenotípicas, las cuales pueden variar y conducir a identificaciones erróneas o imprecisas (Liguori *et al.*, 2010). Por ejemplo, para el cultivo en “CHROMagar *Candida*”, uno de los métodos más utilizados en los laboratorios clínicos, se ha reportado que la intensidad del color de las colonias no es restrictivo para las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*, además el color de las colonias se va perdiendo con el subcultivo o almacenamiento de las cepas (Eraso *et al.*, 2006). Respecto a los sistemas

diseñados para identificar múltiples especies (VITEK 2, API 20C y API 32C), se ha reportado que son menos certeros en la clasificación de las especies, especialmente de las inusuales. Desnos-Ollivier *et al.* (2008), reportaron que varios aislados identificados por API 32C como *C. famata*, correspondían a *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae* y *C. palmiophila*, de acuerdo con el análisis de secuencias génicas. También se ha reportado la identificación errónea de *C. parapsilosis* como *C. famata* (Burton *et al.*, 2011) o como *Lodderomyces elongisporus* (Lockhart *et al.*, 2008). Otra causa, por la que frecuentemente las levaduras son reportadas solo a nivel de género, es que no se logra el aislamiento del patógeno (Colom *et al.*, 2006), por lo que en ocasiones el diagnóstico se establece únicamente con base en la evaluación clínica del paciente.

Estas limitaciones de las técnicas convencionales para la identificación de *Candida* spp. demuestran la necesidad de implementar, en nuestro país, el uso rutinario de los métodos moleculares para el diagnóstico de la candidiasis invasiva, con el fin de garantizar un diagnóstico específico que facilite la selección de estrategias terapéuticas adecuadas que, a su vez, ayuden a frenar los cambios en la etiología de la candidiasis, atribuidos al uso inadecuado de los antifúngicos.

En la actualidad existe una amplia variedad de métodos moleculares para la identificación de *Candida* spp., como PCR punto final (simplex, semi anidada, anidada, multiplex), PCR en tiempo real, secuenciación de fragmentos génicos, espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y resonancia magnética (Bacconi *et al.*, 2014; Foongladda *et al.*, 2014; Taira *et al.*, 2014; Halliday *et al.*, 2015; Mylonakis *et al.*, 2015; Corrales *et al.*, 2015; Vahidnia *et al.*, 2015); sin embargo, por la complejidad de sus técnicas o por el costo de los equipos utilizados, son prácticamente inaccesibles a los laboratorios intrahospitalarios, por lo que la PCR punto final parece ser la opción más factible, por su bajo costo, fácil realización y uso de equipo de fácil adquisición. Al respecto, en la literatura internacional se encuentran reportados múltiples ensayos de PCR, en la mayoría, la región espaciadora transcrita interna (ITS) I o la ITS II de los genes del rARN fúngico ha sido la región blanco para la identificación de los hongos, principalmente a nivel de género, pero para definir correctamente cada especie de *Candida* es necesaria la secuenciación de los productos de PCR (Romeo *et al.*, 2009; Xafranski *et al.*, 2013; Makene 2014), ya que la secuencia de nucleótidos de esos genes es altamente conservada.

Otros ensayos emplean, como blanco de amplificación, la secuencia parcial de algún gen cuya secuencia es conservada y contiene tanto regiones homólogas como especie-específicas, por ejemplo, el gen de la topoisomerasa II (Kanbe *et al.*, 2002). Las características de este tipo de genes permiten el diseño de oligonucleótidos específicos para la identificación de un amplio rango de especies fúngicas. Sin embargo, una limitante para el uso de estos oligonucleótidos es la variabilidad genética que existe entre los organismos de una misma especie con respecto al origen geográfico (Farkas *et al.*, 2009), lo que puede llevar a identificaciones erróneas, como se ha reportado en otros hongos patógenos (Rosas de Paz, 2015; Frías De León *et al.*, 2012).

Por estas razones, en este trabajo se obtuvieron marcadores SCAR para identificar *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis s. str.* y *C. tropicalis*, utilizando aislados procedentes de México y cepas de referencia de cada especie, a partir de patrones polimórficos generados por RAPD con el oligonucleótido T3B, los cuales son distintos para cada especie (Correia *et al.*, 2004; Thanos *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando se intentaron reproducir los patrones polimórficos reportados por Correia *et al.* (2004), no se observó amplificación de los ADN, por lo que fue necesario estandarizar la técnica mediante curvas de concentración de reactivos y temperaturas de alineamiento. Una vez estandarizadas las condiciones para la amplificación, observamos que los patrones polimórficos no eran reproducibles a nivel interlaboratorio, es decir, el número y tamaño de las bandas amplificadas fue diferente a las reportadas en el trabajo de Correia *et al.* (2004), pero fueron reproducibles a nivel intralaboratorio, ya que cuando se repitieron los ensayos en distintas ocasiones, siempre obtuvimos el mismo patrón de bandeo. Este resultado se debe a que en la técnica RAPD se utilizan condiciones de amplificación de baja astringencia, por lo que la calidad y concentraciones del ADN y reactivos influyen en la reproducibilidad de los resultados (Williams *et al.*, 1990).

No obstante estas dificultades, se lograron visualizar cinco bandas diferenciales entre las especies estudiadas: *C. albicans* (500 pb), *C. glabrata* (300 y 400 pb), *C. parapsilosis s. str.* (400 pb) y *C. tropicalis* (600 pb), estas bandas fueron clonadas y secuenciadas. Al analizar las secuencias de las cinco bandas diferenciales mediante el algoritmo Blastn, no se encontró similitud cruzada entre especies, es decir, que la secuencia

de la banda de 500 pb correspondiente a *C. albicans* sólo mostraba similitud con secuencias de *C. albicans* pero no de las otras especies. Cabe destacar que esta similitud entre las secuencias analizadas y las del Genbank solo se refiere a fragmentos de menos de 100 pb (Fig. 17), excepto en el caso de la secuencia de *C. parapsilosis s. str.*, que presentó 99-100% de similitud con las secuencias de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S de la misma especie (Fig. 18). No obstante, con base en las secuencias de estas bandas se realizó el diseño de cuatro pares de oligonucleótidos (CalbF y CalbR, CglaF y CglaR, CparF y CparR, CtroF y CtroR), los cuales resultaron 100% inespecíficos. Esto puede deberse a que las regiones del genoma de *Candida* spp. que secuenciamos nosotros no están depositadas en la base de datos utilizada, lo que ocasionó que no se detectara similitud cruzada, excepto en el caso de la secuencia de *C. parapsilosis*.

Por lo que decidimos llevar a cabo el rediseño de oligonucleótidos, mediante un análisis bioinformático de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S, tomando en cuenta que presenta tanto fragmentos conservados como variables a nivel interespecie. Con base en el análisis de dicha región, se diseñó un par de oligonucleótidos (Ca_{spp} -F y Ca_{spp} -R) que amplifican cuatro marcadores moleculares especie-específicos: Ca_{850} , Cgl_{1000} , Ctr_{790} y Cpa_{731} , para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*, respectivamente, de esta manera, mediante un sistema de PCR simplex se pueden identificar estas especies.

Los marcadores Ca_{850} , Cgl_{1000} , Ctr_{790} y Cpa_{731} fueron específicos, ya que se amplificaron exclusivamente con el ADN de la especie correspondiente de *Candida* y no mostraron amplificación con el ADN de otros hongos patógenos. En cuanto a la sensibilidad, cuando se probaron diluciones seriadas de los ADN observamos que se amplifica adecuadamente hasta 10 pg de ADN de cada especie. Esta alta sensibilidad supera la de algunos ensayos basados en la amplificación de genes específicos que son unicopia, aun cuando son amplificados mediante PCR anidada (Kanbe *et al.*, 2002). La alta sensibilidad de los marcadores Ca_{850} , Cgl_{1000} , Ctr_{790} y Cpa_{731} se atribuye a que corresponden a regiones multicopia, lo que favorece su amplificación, aun por PCR simplex.

CONCLUSIONES

El sistema de PCR simplex para la identificación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis s. str.*, con los oligonucleótidos Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-R, es una herramienta rápida, sensible y específica, con potencial uso para el diagnóstico de la CI en laboratorios intrahospitalarios de nuestro país.

PERSPECTIVAS

Para implementar el uso de la PCR simplex, con Ca_{spp}-F y Ca_{spp}-R, en el diagnóstico de la CI, se establecerán las condiciones apropiadas para la extracción y amplificación del ADN obtenido de muestras clínicas procedentes de pacientes con sospecha de CI y con CI confirmada.

REFERENCIAS

1. Aguilar-García CR. 2013. Colonización por *Candida* en pacientes no neutropénicos en la unidad de cuidados intensivos Med Int Mex, 29:595-599.
2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 25:3389-3402.
3. Arellano-Galindo J, Moreno Galván M, Sarti E. 2008. Infecciones por hongos y neutropenia en un hospital pediátrico de tercer nivel. Salud Pública Mex, 50:197-198.
4. Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, Laffler TG, Blyn LB, Carolan HE, Frinder MR, Toleno DM, Metzgar D, Gutierrez JR, Massire C, Rounds M, Kennel NJ, Rothman RE, Peterson S, Carroll KC, Wakefield T, Ecker DJ, Sampath R. 2014. Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. J Clin Microbiol, 52(9):3164-3174.
5. Bassetti M, Merelli M, Ansaldi F, de Florentiis D, Sartor A, Scarparo C, Callegari A, Righi E. 2015. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. PLoS One, 10:e0127534.
6. Burton MJ, Shah P, Swiatlo E. 2011. Misidentification of *Candida parapsilosis* as *C. famata* in a clinical case of vertebral osteomyelitis. Am J Med Sci, 341:71-73.
7. Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. 2015. *Candida* bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. BioMed Res Int, 2015:256580.
8. Colom MF, Jover A, Ferrer C. 2006. Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. Rev Iberoam Micol, 23:26-28.
9. Corrales I, Giménez E, Aguilar G, Delgado C, Puig J, Izquierdo A, Belda J, Navarro D. 2015. Detection of fungal DNA in peritoneal fluids by a PCR DNA low-density microarray system and quantitation of serum (1-3)- β -D-glucan in the diagnosis of peritoneal candidiasis. Med Mycol, 53(2):199-204.
10. Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C. 2004. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. J Clin

Microbiol, 42:5899-5903.

11. Corzo-León DE, Alvarado-Matute T, Colombo AL, Cornejo-Juárez P, Cortes J, Echevarría JI, Guzman-Blanco M, Macias AE, Nucci M, Ostrosky-Zeichner L, Ponce-de-Leon A, Queiroz-Telles F, Santolaya ME, Thompson-Moya L, Tiraboschi IN, Zurita J, Sifuentes-Osornio J. 2014. Surveillance of *Candida* spp. bloodstream infections: Epidemiological trends and risk factors of death in two mexican tertiary care hospitals. Plos One, 9:e97325.
12. Chávez-García A, Cabrera-Rayó A, Marín-Romero MC, Villagómez-Ortiz A, Méndez-Reyes R, Guzmán-Gómez R. Incidencia y pronóstico de candidiasis invasora en pacientes no neutropénicos de terapia intensiva. Med Int Mex 2007; 23:481-485.
13. Clancy CJ, Nguyen MH. 2013. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. Clin Infect Dis, 56(9):1284-1292.
14. De Bedout C, Gómez BL. 2010. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. Infectio, 14:S159-S171.
15. De la Torre-Saldaña VA, Martínez-Velázquez M, Reséndiz-Sánchez J. 2014. Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. Med Int Méx, 30:121-132.
16. Delaloye J, Calandra T. 2014. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. Virulence 5(1):161-169.
17. Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Dromer F. 2008. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). J Clin Microbiol, 46:3237-3242.
18. Eraso E, Sahand IH, Villar-Vidal M, Marcos C, Moragues MD, Madariaga L. 2006. Usefulness of *Candida* ID2 for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. Med Mycol, 44:611-615.
19. Farkas Z, Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Kucséra J, Varga J, Pfeiffer I. 2009. Genetic variability of *Candida albicans* isolates in a university hospital in Hungary.

- Mycoses, 52:318-325.
20. Foongladda S, Mongkol N, Petlum P, Chayakulkeeree M. 2014. Multi-probe real-time PCR identification of four common *Candida* species in blood culture broth. *Mycopathologia*, 177(5-6):251-261.
 21. Frías-De León MG, Arenas-López G, Taylor ML, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MR. 2012. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*, 50:673-679.
 22. García-Ruíz JC, Amutio E, Pontón J. 2004. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev Iberoam Micol*, 21:55-62.
 23. Gómez-Quintero CH. 2010. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*, 14(S2):S172-S180.
 24. González GM, Elizondo M, Ayala J. 2008. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol*, 46:92902-92905.
 25. González GM, Treviño-Rangel RJ, Palma-Nicolás JP, Martínez C, González JG, Ayala J, Caballero A, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Velarde F, Ascencio EP, Tinoco JC, Vázquez JA, Cano MA, León-Sicairos N, González R, Rincón J, Elías MA, Bonifaz A. 2013. Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother*, 68:2847-2851.
 26. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41:95-98.
 27. Halliday CL, Kidd SE, Sorrell TC, Chen SC. 2015. Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? *Pathology*, 47(3):257-269.
 28. Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Álvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, Torres Narváez P, Lavallo-Villalobos A. 2010. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatr*, 169:783-787.

29. Íñiguez RC, Morales CI, Rivera ME. 2009. Colonización por *Candida* en enfermos en estado crítico. Acta Médica Grupo Ángeles, 7:75-80.
30. Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A. 2002. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. Yeast, 19(11):973-989.
31. Ledesma Taira C, Suely Okay T, Figueiredo Delgado A, Jurfest Rivero ME, Gottardo de Almeida MT, Barbaro Del Negro GM. 2014. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. BMC Infect Dis, 14:406.
32. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, Garnacho-Montero J, León MA; EPCAN Study Group. 2006. A bedside scoring system (“*Candida* score”) for early antifungal treatment in non neutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. Crit Care Med, 34:730-737.
33. Liguori G, Galle F, Lucariello A, Di Onofrio V, Albano L, Mazzarella G, D’Amora M, Rossano F. 2010. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. New Microbiol, 33:63-67.
34. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. 2008. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. J Clin Microbiol, 46:374-376.
35. Makene VA. 2014. Identification of non-*albicans* *Candida* yeasts associated with vulvovaginal candidiasis in Tanzania using a combination of multiplex PCR and DNA sequence divergence of the 26S LSU rDNA. Sch. Acad. J. Biosci., 2(2):124-131.
36. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Cumplido-Urbe C, Hernández-Hernández F, Ramos-Hernández J, López-Martínez R. 2012. Micosis invasivas en pacientes inmunodeprimidos con fiebre de origen desconocido. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 50:609-614.
37. Montravers P, Dupont H, Gauzit R, Veber B, Auboyer Ch, Blin P, Hennequin C, Martin C. 2006. *Candida* as a risk factor for mortality in peritonitis. Crit Care Med, 34(3):646-652.

38. Morales-Mendoza Y, Moncada-Barrón D, Arroyo-Escalante S, Sánchez MC, Manzano-Gayosso P, Arenas R. 2013. Candidemias en un hospital general de la Ciudad de México: estudio de sensibilidad a antifúngicos con el método de microplaca colorimétrica y microdilución en caldo. *Dermatol Rev Mex*, 57:155-158.
39. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, Groeger JS, Judson MA, Vinagre YM, Heard SO, Zervou FN, Zacharioudakis IM, Kontoyiannis DP, Pappas PG. 2015. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin Infect Dis*, 60(6):892-899.
40. Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DWII. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS*. 4:14.
41. Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, Tucci A, Cerullo M, Esposito M, Rossano F, Catania MR. 2013. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods*, 94:262-266.
42. Reséndiz-Sánchez J, Morales-Aguirre JJ. 2007. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 64:91-98.
43. Reyna Figueroa J, Fragoso Díaz A, Ortiz Ibarra FJ, Soriano Becerril D, Bermúdez G, Plazola Camacho N. 2007. Epidemiología hospitalaria de candidiasis neonatal en el Instituto Nacional de Perinatología en un periodo de cinco años. *Enf Inf Microbiol*, 27:110-113.
44. Rivera-Sánchez R, Delgado-Ochoa D, Flores-Paz RR, García-Jiménez EE, Espinosa-Hernández R, Bazan-Borges AA, Arriaga-Alba M. 2010. Prospective study of urinary tract infection surveillance after kidney transplantation. *BMC Infect Dis*, 10:245.
45. Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G. 2009. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods*, 79(1):117-120.
46. Rosas de Paz E. 2015. Caracterización polifásica de aislados clínicos de *Aspergillus* spp. procedentes de México y Argentina (Tesis de maestría). Escuela Nacional de

Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.

47. Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, Buchheidt D, Glöckner A, Heinz W, Höhl R, Horré R, Karthaus M, Kujath P, Willinger B, Presterl E, Rath P, Ritter J, Glasmacher A, Lass-Flörl C, Groll AH, German Speaking Mycological Society, Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. 2011. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses*, 54:279-310.
48. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*, 62:10-24.
49. Taira CL, Okay TS, Delgado AF, Ceccon ME, de Almeida MT, Del Negro GM. 2014. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infect Dis*; 14:406.
50. Thanos M, Schonian G, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell TG, Presber W, Tietz HJ. 1996. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol*, 34:615-621.
51. Vahidnia A, Bekers W, Blikendaal H, Spaargaren J. 2015. High throughput multiplex-PCR for direct detection and diagnosis of dermatophyte species, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* in clinical specimen. *J Microbiol Methods*, 113:38-40.
52. Wang HY, Kim S, Kim H, Kim J, Kim Y, Park SD, Jin H, Choi Y, Uh Y, Lee H. 2014. Real-time PCR TaqMan assay for rapid screening of bloodstream infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 7:3.
53. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22):6531-6535.
54. Xafranski H, Melo AS, Machado AM, Briones MR, Colombo AL. 2013. A quick and low-cost PCR-based assay for *Candida* spp. identification in positive blood culture bottles. *BMC Infect Dis*, 13:467.

55. Yaman G, Akyar I, Can S. 2012. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73:65-67.