



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Candida glabrata* Y SUS ESPECIES
FILOGENÉTICAMENTE RELACIONADAS EN AISLADOS CLÍNICOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ADRIÁN ISAAC BABINA GÉRMAN



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Vázquez Ramos Jorge Manuel**

VOCAL: **Profesor: Gutiérrez Ramos Abel**

SECRETARIO: **Profesor: Frías De León María Guadalupe**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Martín Fuentes Ruth Edith**

2° SUPLENTE: **Profesor: Ruíz Villafan Beatriz**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE MICOLOGÍA MOLECULAR, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

SUSTENTANTE

Adrián Isaac Babina Gérman

ASESOR DEL TEMA

María Guadalupe Frías De León

SUPERVISOR TÉCNICO

Erick Obed Martínez Herrera

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
El género <i>Candida</i>	1
De microbiota habitual a oportunista.....	1
Infecciones causadas por el género <i>Candida</i>	2
Etiología de la candidiasis.....	3
Tratamiento de la candidiasis.....	4
<i>Candida glabrata</i>	4
<i>C. glabrata sensu stricto</i>	5
<i>Candida nivariensis</i>	6
<i>Candida bracarensis</i>	9
Identificación de las especies de <i>Candida</i>	11
Epidemiología.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
HIPÓTESIS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Obtención y origen de aislados clínicos del complejo <i>C. glabrata</i>	19
Cultivo.....	21
Extracción de DNA.....	21
Identificación molecular de las especies del complejo <i>C. glabrata</i>	22
Análisis de productos de amplificación.....	23
Purificación de los amplicones.....	23
Secuenciación de los amplicones.....	24
Comparación de las secuencias en el Genbank.....	24
RESULTADOS	25
Cultivo.....	25
Extracción de DNA.....	26
Identificación molecular de las especies del complejo <i>C. glabrata</i>	28
Purificación de los amplicones.....	32
Secuenciación de los amplicones y comparación en el GenBank.....	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	35
BIBLIOGRAFÍA	36

INTRODUCCIÓN

El género *Candida*

El género *Candida* pertenece a las levaduras de clase *Ascomycetes*, de la familia *Saccharomycetes* que incluye cerca de 300 especies diferentes, de las cuales, sólo 58 son oportunistas en animales y humanos y de éstas, alrededor de 20 especies son las principales causantes de enfermedad en seres humanos (Bonifaz, 2012). Sin embargo, el número de especies de *Candida* patógenas va incrementando debido a que se han aislado, cada vez con mayor frecuencia, las especies que forman parte de los complejos *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (Tavanti *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2006), además del aumento de pacientes inmunocomprometidos y la evolución de las intervenciones en el área de la salud que han convertido a las especies de *Candida* en una causa importante de infección nosocomial, mostrando altas tasas de mortalidad (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005b).

Las levaduras de *Candida* poseen características definidas, como su reproducción por blastoconidios (gemación holoblástica), ausencia de pigmentos melánicos y carotenoides, formas celulares poco variables (elípticas, globosas, cilíndricas o ligeramente triangulares) y la habilidad para formar pseudohifas e hifas, con excepción de *Candida glabrata* (Bonifaz, 2012). Algunas especies de *Candida* son consideradas flora habitual de las principales membranas mucosas (intestino, boca, tracto genito-urinario) y algunas zonas de la piel (Sardi *et al.*, 2013; Fornari *et al.*, 2016).

De flora habitual a oportunista

Las levaduras del género *Candida* se encuentran en el ambiente (suelo y agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en toda sustancia rica en hidratos de carbono simples). Además, diferentes especies forman parte de la flora habitual del aparato gastrointestinal (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. krusei*), piel (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*), mucosa oral (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. krusei*) y vaginal (*C. albicans* y con menor frecuencia *C. glabrata*, *C.*

tropicalis, *C. parapsilosis* y *C. krusei*). Entre esta flora habitual y el huésped existe un equilibrio. Por ejemplo, otros miembros de la flora intestinal (principalmente lactobacilos y bacterias anaerobias) ejercen un control en la densidad poblacional de las levaduras en el tracto gastrointestinal. Al romperse el equilibrio, se propicia el desarrollo de una infección oportunista, dependiendo de diversos factores, como del uso de antibióticos de amplio espectro, antiinflamatorios esteroideos, quimioterapia inmunosupresora, inmunosupresores para trasplante de órganos y uso de dispositivos tales como catéteres o prótesis dentales, etcétera. Otros factores de riesgo son inherentes al paciente, como inmunosupresión por VIH/SIDA, cáncer, atrofia genito-urinaria, alteración de la mucosa oral/gastrointestinal o de la flora habitual, e incluso una higiene escasa o excesiva (Bonifaz, 2012; Vipulanandan *et al.*, 2018). Además, *Candida* posee diversos factores de virulencia que facilitan la evasión del sistema inmune y la colonización de los tejidos, como la capacidad de adherirse a los tejidos y dispositivos médicos en el paciente, la producción de estructuras filamentosas con un papel relevante en la invasión dentro del huésped, la síntesis de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas, hemolisinas, etcétera) (Moreira *et al.*, 2015; Vipulanandan *et al.*, 2018).

Infecciones causadas por el género *Candida*

Las infecciones causadas por las levaduras del género *Candida* se asocian con una variedad de manifestaciones. Como manifestación clínica de infección superficial, destaca la candidiasis vulvovaginal (CVV) aguda o recurrente que afecta hasta 75% de las mujeres en edad fértil por lo menos una vez en su vida y cuyos factores de riesgo son: embarazo, fase premenstrual, diabetes, uso de anticonceptivos orales, o jabones con ácido fosfórico, además de una terapia antibiótica previa (Aznar-Marin *et al.*, 2016; Diaz *et al.*, 2016).

La manifestación clínica más importante de infección invasiva es la candidemia, que representa del 10-20% de las infecciones nosocomiales de torrente sanguíneo (Fraser *et al.*, 2012), siendo la tercera causa más común de sepsis en pacientes hospitalizados, con una alta tasa de mortalidad (50%) en unidades de cuidados intensivos (Parmeland *et al.*, 2013). La candidiasis invasiva (CI) es otra de

las causas más comunes de enfermedad infecciosa nosocomial, convertida ya en una amenaza a la salud pública, con un número aproximado de 250 000 personas afectadas cada año, con una mortalidad del 20%, basado en estudios poblacionales, los cuales también muestran que su incidencia está aumentando en pacientes inmunocomprometidos y con dispositivos médicos invasivos durante periodos prolongados de hospitalización (Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2017; Sony *et al.*, 2017).

Etiología de la candidiasis

De todas las especies de *Candida* que causan infecciones en humanos, *C. albicans* sigue siendo la más frecuente (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Fraser *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2017), pero durante las últimas dos décadas otras especies son cada vez más frecuentes en centros hospitalarios, modificando así la epidemiología de la candidiasis, con una proporción reducida de *C. albicans* en comparación con el conjunto de *Candida* no-*albicans* (CNA), como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, entre otras (Bishop *et al.*, 2008a, b; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2017).

Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie etiológica predominante en candidemias y CI, el 50% de los casos pueden ser causados por CNA (Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014), en los que *C. glabrata* ha surgido como la tercera causa más común de candidemia en México (Reyes-Montes *et al.*, 2017). También se ha determinado que *C. glabrata* y *C. parapsilosis* son patógenos nosocomiales importantes en recién nacidos, ancianos, receptores de trasplantes y pacientes con tratamiento antifúngico previo (Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Reyes-Montes *et al.*, 2017). De igual forma, aunque *C. albicans* es la levadura más comúnmente implicada en casos de CVV sintomática, informes recientes han descrito una disminución de su impacto, en comparación con especies CNA, donde

destacan *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* y principalmente *C. glabrata* (Warren *et al.*, 2010; Aznar-Marin *et al.*, 2016; Reyes-Montes *et al.*, 2017).

Tratamiento de la candidiasis

El tratamiento para las infecciones por CNA ha sido especificado por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA), que recomienda el uso de polienos, así como las equinocandinas parenterales (caspofungina, micafungina, anidulafungina) como tratamiento para la candidemia y la CI debido a su potente actividad fungicida contra *Candida* spp., ya que actúa en la subunidad catalítica de 1,3- β -D-glucano sintasa codificada por los genes FKS1, FKS2 y FKS3, para inhibir la síntesis del componente 1,3- β -D-glucano de la pared celular (Hall *et al.*, 2017).

El uso de azoles como fluconazol, principalmente intravenoso y como segunda opción de forma oral, es una alternativa para los pacientes que no están críticamente enfermos y que es poco probable que tengan una infección por *Candida* spp., mientras que una formulación lipídica de anfotericina B es la última alternativa en caso de intolerancia o resistencia a los antifúngicos anteriores (Hall *et al.*, 2017; Vipulanandan *et al.*, 2018). Lamentablemente, el uso indiscriminado de los azoles ha generado la resistencia, lo cual crea un gran obstáculo en la terapia, aunado a un aumento en los costos de tratamientos y hospitalización (Sony *et al.*, 2017).

Candida glabrata

Esta levadura posee diversas características particulares: forma celular globosa a elíptica, es haploide y es la única dentro del género *Candida* que no presenta micelio en su fase parasitaria ni en su fase saprobia (Bonifaz, 2012). Filogenéticamente, *C. glabrata* está más relacionada con el género *Nakaseomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* que con *C. albicans* (Gabaldón *et al.*, 2013).

Aunque su emergente aparición en aislados clínicos se debe en gran parte al uso indiscriminado de los antifúngicos y su reducida susceptibilidad a fluconazol (Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2016), la causa que actualmente está tomando mayor importancia es el hecho de que al referirnos a *C. glabrata* estamos hablando de un complejo de especies, las cuales provocan que no se llegue, en

muchas ocasiones, a una cura micológica a consecuencia de una identificación inespecífica (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b; Gabaldón *et al.*, 2013; Gorton *et al.*, 2013; Morales-López *et al.*, 2017).

C. glabrata sensu lato, refiriéndonos a ella como un complejo de especies, incluye como miembros a *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, siendo los dos últimos, patógenos oportunistas emergentes, con distribución mundial (Bishop *et al.*, 2008a, b; Lockhart *et al.*, 2009; Warren *et al.*, 2010; Cuenca-Estrella *et al.*, 2011; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Esposto *et al.*, 2012; Gabaldón *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Gil-Alonso *et al.*, 2015; Aznar-Marin *et al.*, 2016; Morales-López *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2013; Dudiuk *et al.*, 2017; Morales-López *et al.*, 2017). Aunque, a la fecha, son pocos los estudios que informan sobre la prevalencia, patrones de susceptibilidad antifúngica e importancia médica de estas especies (Bishop *et al.*, 2008a, b; Gil-Alonso *et al.*, 2015), los reportes de su aparición en casos infecciosos donde se les asocia con múltiple resistencia a fármacos está aumentando, por lo que ya se consideran como las únicas levaduras del género *Nakaseomyces* en ser patógenos potenciales (Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Swoboda-Kope *et al.*, 2012).

C. glabrata sensu stricto

Hasta la fecha, se sabe que esta levadura representa el 15 al 20% de todos los casos de infección por el género *Candida* en todo el mundo, y es la segunda causa más común de candidemia en EUA, además de ocupar el cuarto lugar en incidencia dentro de países latinoamericanos como Argentina, donde representa el 4% de los casos de candidemia (Morales-López *et al.*, 2017). También se tiene en cuenta su importancia en casos de CVV, donde las especies CNA ocupan porcentajes de prevalencia hasta del 40%, de las cuales, 11 a 20% se tratan de *C. glabrata sensu stricto*, por lo que el tratamiento varía desde ácido bórico vaginal, crema de flucitosina, nistatina e incluso anfotericina B, debido a que se ha registrado que de los casos de infección por esta levadura, sólo el 52.7% obtiene una mejora significativa en un tiempo relativamente corto de tratamiento, mientras que el 47.3%

presenta complicaciones, generando CVV recurrente (Diaz *et al.*, 2016; Powell *et al.*, 2016).

Se cree que *C. albicans* posee más factores de virulencia directos hacia el hospedero que *C. glabrata*, pero ésta posee mayor resistencia antimicótica, principalmente a los azoles (Powell *et al.*, 2016), por lo que, recientemente, la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) y la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) propusieron el uso de las equinocandinas, y conforme su manejo se ha ido ampliando, se han hecho notar en todo el mundo los reportes de resistencia a este fármaco (Morales-López *et al.*, 2017). Se ha demostrado que esta resistencia es mediada por mutaciones en el gen FKS, con una prevalencia del 2.9% al 18%, lo que implicaría que esta mutación es un factor de riesgo muy importante para el fracaso terapéutico (Morales-López *et al.*, 2017).

Candida nivariensis

C. nivariensis, una levadura filogenéticamente relacionada con *C. glabrata*, ha sido aislada de muestras de lavado broncoalveolar, hemocultivo, orina, líquido ascítico, líquido pleural, líquido peritoneal, abscesos pélvicos, exudados vaginales, vías respiratorias inferiores, uñas de los pies e incluso excremento, como un agente causal de candidiasis superficial e invasiva en diferentes partes del mundo, lo que demuestra su relevancia en la clínica (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b; Swoboda-Kope *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Gil-Alonso *et al.*, 2015; Aznar-Marin *et al.*, 2016; Morales-López *et al.*, 2016).

El nicho ecológico de *C. nivariensis* es el suelo de jardines y la superficie de las plantas en maceta (hongo geofílico), pero se ha adaptado adecuadamente del medio ambiente al ser humano (Swoboda-Kope *et al.*, 2012; Aznar-Marin *et al.*, 2016).

La infección se adquiere por medio de la transmisión sexual o del reservorio fecal, aunque hay factores predisponentes definitivos como la diabetes mellitus, inmunosupresiones de origen infeccioso o quimioterapéutico (Aznar-Marin *et al.*, 2016; Morales-López *et al.*, 2016).

Con frecuencia, los aislados de *C. nivariensis* exhiben resistencia a los azoles más usados (fluconazol, itraconazol, voriconazol), presentando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) similares o incluso más elevadas que *C. glabrata sensu stricto*, aunque existe controversia en cuanto a estos datos, al haber estudios que reportan CMI muy altas (Aznar-Marin *et al.*, 2016) o muy bajas (Li *et al.*, 2014; Morales-López *et al.*, 2016). Existen reportes en los que las pruebas de susceptibilidad *in vitro* arrojan CMI bajas, pero al aplicar el tratamiento, no se logra la cura micológica, probablemente debido a la formación de biopelículas, lo cual impide la acción del antifúngico (Li *et al.*, 2014; Aznar-Marin *et al.*, 2016). Por lo anterior, se han realizado estudios sobre la susceptibilidad de esta especie a otros fármacos con más expectativas, como las equinocandinas, en donde se han encontrado valores de CMI bajos para anidulafungina y caspofungina (Gil-Alonso *et al.*, 2015; Morales-López *et al.*, 2017). Son pocos los estudios sobre la actividad de los antifúngicos frente a *C. nivariensis*, pero los existentes permiten visualizar lo heterogénea que es la resistencia de este hongo, en función del tipo de paciente, zona geográfica y tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Reportes publicados sobre pruebas de susceptibilidad antifúngica *in vitro* en aislados de *Candida nivariensis*

Número de aislados probados	Fuente del aislamiento	CMI (µg/mL) de diversos antifúngicos		País	Referencia
1	Sangre	ANFB	0.5	Japón	Fugita <i>et al.</i> , 2007
		FLU	≥128		
		ITC	≥16		
		VRC	4		
		FC	2		
		MFG	0.06		
		MCZ	2		
16	Sangre, cavidad oral, absceso pélvico, líquido de ascitis, líquido peritoneal,	ANFB	CMI ₉₀ : 0.5	Reino Unido	Borman <i>et al.</i> , 2008
		FLU	CMI ₉₀ : >64		
		ITC	CMI ₉₀ : >16		
		VRC	CMI ₉₀ : 4		

	biopsia de pulmón	POS	CMI ₉₀ : 2				
		FC	CMI ₉₀ : 0.5				
		CAS	CMI ₉₀ : 1				
2	Enjuague de cavidad oral	ANF	1	Indonesia, España	Wahyuningsih <i>et al.</i> , 2008		
		FLU	2-8				
		ITC	0.125-0.5				
		VRC	0.063-0.125				
		POS	0.25-0.5				
		ISA	0.008-0.031				
		FC	0.125-0.5				
		CAS	0.5-1				
1	Líquido pleural	ANFB	1			Australia	Lockhart <i>et al.</i> , 2009
		FLU	2				
		CAS	0.06				
		MFG	0.015				
		AFG	0.06				
2	Sangre, expectoración	ANFB	0.5	India	Chowdhary <i>et al.</i> , 2010		
		FLU	1-2				
		ITC	0.25				
		VRC	0.03				
		FC	1				
		POS	0.38				
		CAS	0.125-0.5				
1	Sangre	ANFB	1	España	López-Soria <i>et al.</i> , 2012		
		FLU	4				
		ITC	0.25				
		VRC	0.03				
		POS	0.25				
		CAS	0.125				
		MFG	0.015				
		AFG	0.015				
5	Lavado broncoalveolar, hisopo vaginal	ANFB	0.03-0.125	India	Sharma <i>et al.</i> , 2013		
		FLU	0.5-16				
		ITC	0.03-0.5				
		VRC	0.03-0.5				

		POS	0.015-0.25
		ISA	0.015-0.25
		FC	0.125-2
		CAS	0.25-0.5
		MFG	0.015
		AFG	0.06-0.125

ANFB: anfotericina B; **FLU:** fluconazol; **ITC:** itraconazol; **VRC:** voriconazol; **POS:** posaconazol; **ISA:** isavuconazol; **FC:** 5-flucitosina; **CAS:** caspofungina; **MFG:** micafungina; **AFG:** anidulafungina; **MCZ:** miconazol. Tomada y modificada de Gorton *et al.* (2013).

Candida bracarensis

Tras un estudio epidemiológico sobre candidiasis en Braga, Portugal, se encontró que dos de los aislados clínicos recuperados, uno de hemocultivo en Reino Unido y otro de exudado vaginal en una paciente portuguesa con CVV, e identificados inicialmente como *C. glabrata* (Correia *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2010) tenía un patrón de impresión de huella (fingerprinting) diferente y único con el cebador T3B, por lo que se propuso aclarar su posición taxonómica realizando una secuenciación del DNA ribosomal. Dicha cepa compartió características moleculares con *C. glabrata* y con *Nakaseomyces delphensis*; sin embargo, la extensión de la divergencia de secuencia fue lo suficientemente grande como para proponer, en 2006, su primera descripción como una nueva especie: *C. bracarensis* (Correia *et al.*, 2006). Aunque se conoce poco sobre esta levadura, debido a que existen pocos reportes de su aparición en muestras clínicas (exudados vaginales, hemocultivos, esputo y excremento) (Warren *et al.*, 2010).

C. bracarensis es considerado un hongo comensal humano que puede convertirse en patógeno oportunista (Moreira *et al.*, 2015), capaz de causar CI en pacientes inmunocomprometidos (Warren *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Posee características fenotípicas poco distintivas, que además se superponen con las de *C. nivariensis* y *C. glabrata sensu stricto*, como es el desarrollo de colonias blancas en CHROMagar Candida (Bishop *et al.*, 2008a, b; Lockhart *et al.*, 2009), y resultados bioquímicos variables en función de la cepa (Bishop *et al.*, 2008a, b), por lo que su identificación absoluta, al igual que con las otras especies del complejo, sólo se logra a través de métodos moleculares (Aznar-Marin *et al.*, 2016).

Los estudios que se han realizado sobre factores de virulencia en *C. bracarensis* han arrojado datos muy interesantes. Un estudio demostró que esta levadura es capaz de sintetizar biopelículas, las cuales están constituidas por proteínas y carbohidratos en cantidades variables, dependiendo de la cepa y teniendo como referencia a *C. glabrata sensu stricto*, la cual obtuvo las cantidades más altas de carbohidratos. También se determinó que al menos una cepa de *C. bracarensis* pudo secretar proteasas al igual que *C. albicans* y *C. tropicalis*, pero ninguna cepa produjo fosfolipasas extracelulares, cosa que *C. glabrata sensu stricto* sí logró, así mismo se observó que todas las cepas sintetizaron proteinasas y expresaron actividad hemolítica total, al igual que muchas especies del género *Candida* (Aznar-Marin *et al.*, 2016).

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* de *C. bracarensis* son muy pocos, pero demuestran que *C. bracarensis* es un nuevo patógeno resistente a múltiples fármacos (Warren *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2015). En 2014, un aislado proveniente de una mujer embarazada, fue susceptible a nistatina y a los azoles (Li *et al.*, 2014), para después demostrar en 2015 que dicha cepa presentó un efecto paradójico definido como la capacidad de crecer a altas concentraciones de antifúngico, pero no a concentraciones intermedias, ya que 0.125 µg/mL de micafungina causó más letalidad que 0.5 µg/mL a las 24 h, además de haberse visto que una concentración de 0.06 µg/mL de anidulafungina mostró el punto final fungicida para dicha cepa, entre 13 y 26 h, mientras que a 0.125 µg/mL, lo fue en un aproximado de 22 h, afirmando que dicho fármaco fue el agente más activo contra *C. bracarensis* (Gil-Alonso *et al.*, 2015). Otro estudio se llevó a cabo en ese mismo año, donde se informó que una cepa resultó más resistente a anfotericina B, incluso que *C. albicans* y *C. glabrata sensu stricto*, mencionando también tres cepas susceptibles a fluconazol dependientes de la dosis (SDD), lo que implicó que dichas levaduras no poseían una resistencia intrínseca a dicho fármaco, informando, por último, que el efecto del fluconazol y de la anfotericina B fue menor en las biopelículas preformadas, siendo fluconazol el menos efectivo (Moreira *et al.*, 2015). Recientemente, se reportaron valores bajos de CMI para las equinocandinas (anidulafungina y caspofungina), cuyos resultados fueron de 0.03 a 0.06 µg/mL y de

0.015 a 0.06 µg/mL, respectivamente, demostrando que este podría ser el tratamiento más efectivo contra una infección por *C. braccarensis* (Morales-López *et al.* 2017).

A pesar de que *C. braccarensis* es una especie rara, se recomienda vigilancia debido a su propensión a la resistencia ante los antifúngicos más usados en la clínica, además de proyectar atributos de virulencia clásicos de un agente infeccioso de importancia (Moreira *et al.*, 2015).

Identificación de las especies de *Candida*

En la práctica clínica, las especies de *Candida* se identifican de manera relativamente fácil mediante los métodos fenotípicos convencionales, basados en una combinación de marcadores morfológicos macroscópicos y microscópicos, en reacciones bioquímicas que analizan la capacidad de cada levadura para fermentar azúcares (zimograma), o asimilar una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno (auxonograma), ya sea de forma manual o automatizada (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b; Cornet *et al.*, 2011; Aznar-Marin *et al.*, 2016; Fornari *et al.*, 2016). El cultivo en medios cromogénicos, que disciernen entre las especies comunes de *Candida* con base en el color que las colonias adquieren durante su crecimiento (Bishop *et al.*, 2008a), los cuales son relativamente específicos para *C. albicans* (verde claro), *C. dubliniensis* (verde oscuro), *C. tropicalis* (azul grisáceo), *C. krusei* (rosa pálido), *C. glabrata* (rosa intenso), *Candida* sp. (blanco) (Bishop *et al.*, 2008a; Bonifaz, 2012). No obstante que estos métodos fenotípicos tienen muchas ventajas, también tienen desventajas, pues no todas las especies son correctamente identificadas. Primeramente, las características micro y macroscópicas solamente son presuntivas del agente etiológico, mientras que en el caso de los análisis bioquímicos, se requiere un periodo relativamente largo de tiempo, de 3 a 10 días o más para arrojar resultados, que al final podrían traslaparse entre diversos perfiles de levaduras en una muestra, por variación en las cepas presentes, y finalmente, los medios cromogénicos que han sido formulados para diferenciar un número pequeño de especies, donde la falta de una amplia gama de colores limita la expansión de la

búsqueda de más géneros o especies en una misma muestra (Bishop *et al.*, 2008a; Cornet *et al.*, 2011; Aznar-Marin *et al.*, 2016; Fornari *et al.*, 2016).

Actualmente la identificación correcta de las especies del género *Candida* es un reto, particularmente debido a la presencia de complejos de especies como *C. glabrata* (*C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracariensis*), cuyas especies son morfológica y fisiológicamente indistinguibles, pero genéticamente son diferentes (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b; Cornet *et al.*, 2011; Reyes-Montes *et al.*, 2017). Diferenciar estas especies no sólo es relevante desde el punto de vista epidemiológico, sino también clínico, debido a la diferente sensibilidad a los antifúngicos que presentan y por su virulencia.

Desde que fueron descritas estas especies del complejo *C. glabrata*, varios investigadores han intentado diferenciarlas usando, inicialmente, metodologías de carácter fenotípico, las cuales rápidamente demostraron ser ineficaces, al no tener un porcentaje de especificidad adecuado, generando datos que se superponen entre sí (Cuenca-Estrella *et al.*, 2011; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Esposto *et al.*, 2012; Swoboda-Kope *et al.*, 2012; Dudiuk *et al.*, 2017). El uso de paneles bioquímicos automatizados (por ejemplo, VITEK 2, API) clasificaban erróneamente a *C. nivariensis* y *C. bracarensis* como *C. glabrata sensu stricto* (Cuenca-Estrella *et al.*, 2011; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Dudiuk *et al.*, 2017) debido a la reducida y poco conocida reactividad de estas especies crípticas, generando múltiples biocódigos y por tanto un traslape de microorganismos (Bishop *et al.*, 2008a, b). También se propuso la prueba rápida de fermentación de trehalosa, por medio del kit (GRABRATA RTT), pero requiere del uso de medios especiales, además de sistemas alternativos de identificación, los cuales tampoco brindan la confiabilidad requerida en el resultado (Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Esposto *et al.*, 2012; Fraser *et al.*, 2012; Aznar-Marin *et al.*, 2016). En medios cromogénicos cuando el CuSO_4 era parte de éste, las colonias desarrolladas por *C. glabrata* variaban de color blanco a marrón oscuro, mientras que al contener floxina B, variaban del blanco al rosa oscuro (Swoboda-Kope *et al.*, 2012). A partir de este hecho y de las observaciones de cultivos confirmados molecularmente como miembros del complejo *C. glabrata*, se encontró que *C. nivariensis* y *C. bracarensis* generaban colonias

blancas en cada caso reportado, de la misma forma que *C. glabrata sensu stricto*, además de sus variadas tonalidades de rosa o marrón (Figura 1), por lo que este sistema solamente quedó como un análisis presuntivo e insuficiente para dar un resultado definitivo (Bishop *et al.*, 2008a, b; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Esposto *et al.*, 2012; Swoboda-Kope *et al.*, 2012).

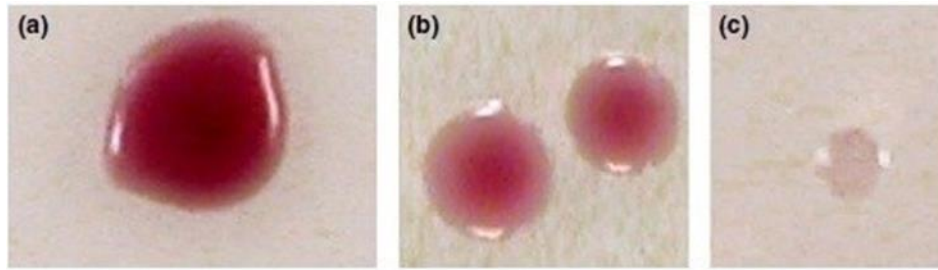


Figura 1. Características coloniales representativas de *C. glabrata* en medio CHROMagar Candida. **(a)** Rosa pálido, **(b)** Rosa claro, **(c)** Blanco. Tomada de Swoboda-Kope *et al.* (2012)

Por lo que, en los últimos años se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos basados en biología molecular (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b; Fujita *et al.*, 2007) para la detección e identificación de estos patógenos emergentes (Alcoba-Flórez *et al.*, 2005a, b).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es probablemente el método más utilizado. Esta reacción enzimática *in vitro* permite la amplificación exponencial de fragmentos específicos de DNA (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Desde su desarrollo en 1985, ha facilitado los estudios genéticos en todos los organismos debido a su especificidad, sensibilidad y velocidad, promoviendo la identificación y desarrollo de diversos marcadores genéticos. Las secuencias de rDNA son muy utilizadas, debido a su contenido de regiones variables y conservadas, lo que permite la discriminación y comparación de organismos de diferentes o iguales niveles taxonómicos. Este material genético en los hongos está organizado como una unidad de rDNA que se repite en tándem, donde una subunidad incluye tres genes (18S, 5.8S y 28S) altamente conservados, los cuales están separados entre sí por dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) que son las regiones no conservadas (Figura 2). En general, el diseño de diversos cebadores se basa en delimitar y

amplificar estas regiones para investigar características filogenéticas entre especies del mismo género (Mullis & Faloona, 1987; Romeo *et al.*, 2009; Mirhendi *et al.*, 2011).

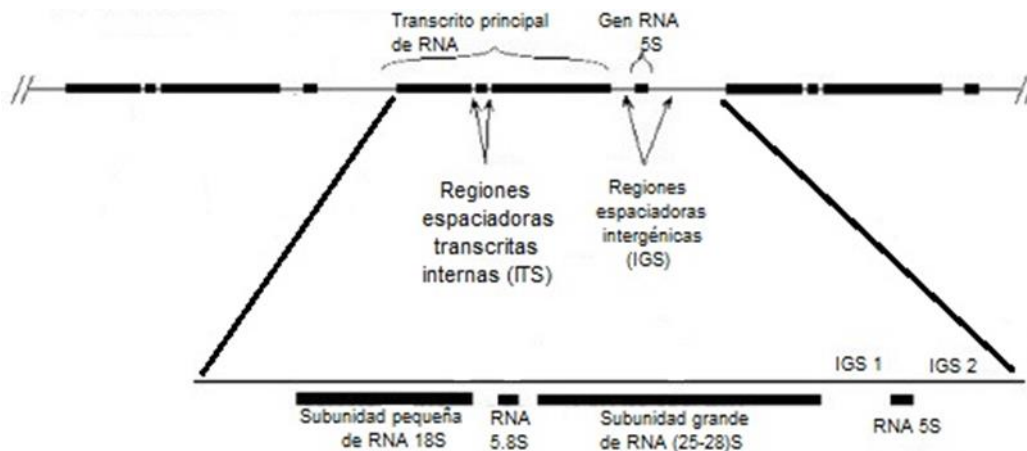


Figura 2. Ubicación de los Espaciadores Transcritos Internos en el complejo de genes ribosomales. Duke University (<http://home.psu.ac.th/~4823002/Molecular ITS.htm>)

La PCR, en sus modalidades simplex y multiplex, ha sido ampliamente usada con una variedad de cebadores especie-específicos para diferenciar entre las especies del complejo *C. glabrata* (Bishop *et al.*, 2008a, b; Romeo *et al.*, 2009; Cornet *et al.*, 2011; Enache-Angoulvant *et al.*, 2011; Esposto *et al.*, 2012; Swoboda-Kope *et al.*, 2012; Telleira *et al.*, 2012; Dudiuk *et al.*, 2017; Morales-López *et al.* 2017).

Otro método molecular que se ha utilizado para identificación de las especies de *Candida* es el Polimorfismo de Longitud en los fragmentos de Restricción (RFLP) del rDNA/rRNA, que consiste en la diferenciación de los mismos mediante el análisis de los patrones de corte que se generan en sitios específicos del genoma, cuando es reconocido por enzimas de restricción. En la PCR-RFLP, se amplifican fragmentos específicos de DNA por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener patrones específicos. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas entre las especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis (Ayatollahi *et al.*, 2007; Cornet *et al.*, 2011).

Recientemente se evaluó la capacidad de la espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF MS) para distinguir las especies del complejo

C. glabrata (Vella *et al.*, 2017). El procedimiento consiste en una ionización suave del analito para generar la vaporización de partículas intactas y termolábiles no volátiles (proteínas principalmente), en un rango de masa molecular baja (hasta 20 KDa). Es utilizado para obtener un espectro proteico propio de un organismo para identificarlo a nivel de género y especie (Singahal *et al.*, 2015); sin embargo, tiene la desventaja de que aún no se desarrolla una base de datos global para todos los patógenos comunes e infrecuentes (Aznar-Marin *et al.*, 2016; Vella *et al.*, 2017).

También se ha utilizado para identificar al complejo *C. glabrata* la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes de ácido peptidonucleico (PNA-FISH), basada en cebadores marcados con fluorocromos y dirigidos a secuencias específicas del rRNA de células individuales o agrupadas, muy útil para estudiar la conformación de las biopelículas que el género *Candida* forma frecuentemente (Stender, 2003; Bishop *et al.*, 2008a, b; Almeida *et al.*, 2011).

Al igual que los métodos fenotípicos, los moleculares también tienen ventajas y desventajas; no obstante, es necesario contar con ellos para lograr la identificación de las especies del complejo *C. glabrata*, en combinación con los métodos fenotípicos, para un diagnóstico certero y tratamiento adecuado de los pacientes infectados con dichas especies (Dudiuk *et al.*, 2017).

Epidemiología

A medida que los métodos de identificación molecular han sido implementados, varios centros de investigación han reexaminado sus colecciones de aislados, identificados fenotípicamente como *C. glabrata*, entre los cuales, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* han sido detectadas, aunque en general, estas especies presentan una baja prevalencia en comparación con la de *C. glabrata sensu stricto* (Lockhart *et al.*, 2009; Esposto *et al.*, 2012; Morales-López *et al.*, 2016). La Tabla 2 resume los aislamientos de *C. nivariensis* obtenidos a la fecha en diversos países, mientras que en la Tabla 3, se resumen los casos de varios países donde se aisló *C. bracarensis*, con un total de 12 hallazgos, lo cual posiciona a esta levadura como la más infrecuente de entre las tres que conforman el complejo.

El análisis más amplio realizado fue por parte del Programa de Vigilancia de Antimicóticos ARTEMIS, en Reino Unido, con 1598 aislados fenotípicamente identificados como *C. glabrata*, provenientes de 28 países en los seis continentes, de los cuales sólo se identificó un aislado de *C. nivariensis* y dos de *C. bracarensis* (Esposito *et al.*, 2012). Otro estudio relevante se realizó en Polonia, con 226 aislados de *C. glabrata* de los cuales, 13 resultaron ser *C. nivariensis* (prevalencia del 6%) mientras que ninguno fue caracterizado como *C. bracarensis*, lo cual indicó que su prevalencia podría ser mayor solo a escala local o regional (Swoboda-Kopec *et al.*, 2012).

Tabla 2. Revisión de reportes publicados de aislados de *Candida nivariensis*

Número de aislados	Fuente de aislamiento	País	Referencia
1	Sangre	España	Alcoba-Flórez <i>et al.</i> , 2005b
1	Sangre	Japón	Fujita <i>et al.</i> , 2007
16	Sangre, cavidad oral, absceso pélvico, líquido de ascitis, líquido peritoneal, biopsia de pulmón	Reino Unido	Borman <i>et al.</i> , 2008
1	Enjuague de cavidad oral	Indonesia	Wahyuningsih <i>et al.</i> , 2008
1	Líquido pleural	Australia	Lockhart <i>et al.</i> , 2008
2	Sangre, expectoración	India	Chowdhary <i>et al.</i> , 2010
1	Sangre	España	López-Soria <i>et al.</i> , 2013
5	Exudado vaginal, lavado broncoalveolar	India	Sharma <i>et al.</i> , 2013
1	Sangre	Francia	Parmeland <i>et al.</i> , 2013
1	Orina	Reino Unido	Gorton <i>et al.</i> , 2013
2	Sangre, exudado vaginal	Malasia	Tay <i>et al.</i> , 2014
13	Orina, aspirado traqueal, absceso,	Polonia	Swoboda-Kopec <i>et al.</i> , 2014
7	Exudado vaginal	China	Li <i>et al.</i> , 2014
1	Uñas de los pies	China	Feng <i>et al.</i> , 2015
4	Exudado vaginal	España	Aznar-Marin <i>et al.</i> , 2016
1	Secreción nasal	Brasil	Figueiredo-Carvalho <i>et al.</i> , 2016
8	Garganta, catéter renal, orina, bolsa de diálisis	Argentina	Morales-López <i>et al.</i> , 2016; 2017

Tomada y modificada de Aznar-Marin *et al.* (2016)

Tabla 3. Revisión de reportes publicados de aislados de *Candida bracarensis*

Número de aislados	Fuente de aislamiento	País	Referencia
2	Exudado vaginal, sangre	Portugal	Correia <i>et al.</i> , 2006
3	Absceso pélvico, garganta, excremento	EUA	Bishop <i>et al.</i> , 2008b
2	Sangre, expectoración	EUA	Lockhart <i>et al.</i> , 2009
1	Sangre	Canadá	Warren <i>et al.</i> , 2010
1	Exudado vaginal	China	Li <i>et al.</i> , 2014
3	Orina, garganta	Argentina	Morales-López <i>et al.</i> , 2017

EUA: Estados Unidos de América

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones producidas por el género *Candida* constituyen una causa importante de morbi-mortalidad, principalmente en infecciones nosocomiales (Fraser *et al.*, 2012; Parmeland *et al.*, 2013; Sony *et al.*, 2017), donde la incidencia de CNA, y en particular *C. glabrata*, ha aumentado progresivamente, posicionándola como la segunda o tercera causa más frecuente de CI, además de una marcada aparición en CVV recurrente y candidemia (Gil-Alonso *et al.*, 2015; Morales-López *et al.*, 2016). Dicho aumento conllevó a un mayor análisis sobre este hongo, utilizando metodologías basadas en ácidos nucleicos, con lo que se logró elucidar que *C. glabrata* se trataba de un complejo de especies filogenéticamente relacionadas, conformado por *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, siendo las dos últimas, más virulentas o resistentes a los antifúngicos (Lockhart *et al.*, 2009; Gabaldón *et al.*, 2013; Aznar-Marin *et al.*, 2016). Estas levaduras no pueden diferenciarse entre sí por métodos rutinarios, sólo mediante métodos moleculares (Dudiuk *et al.*, 2017), por lo que su prevalencia en muchos países, incluyendo México, es aún desconocida.

JUSTIFICACIÓN

En México no hay datos respecto a la prevalencia de las especies del complejo *C. glabrata*. Por ello, en el presente se evaluó, por PCR multiplex (Romeo *et al.*, 2009), una colección de aislados clínicos fenotipificados como complejo *C. glabrata*, con la finalidad de identificar la presencia de las especies crípticas de *C. glabrata* entre los aislados. El hallazgo de *C. bracarensis* o *C. nivariensis* entre los aislados aportará datos importantes a la etiología de la candidiasis en nuestro país y hará notar la necesidad de implementar metodologías basadas en la biología molecular para la identificación específica de las levaduras, lo que conllevará a un manejo terapéutico adecuado de los pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Identificar *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* por PCR multiplex, en aislados clínicos fenotipificados como complejo *C. glabrata*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Colectar aislados clínicos del complejo *C. glabrata* en hospitales de tercer nivel.
2. Cultivar los aislados clínicos del complejo *C. glabrata*.
3. Extraer y cuantificar el DNA de los aislados clínicos del complejo *C. glabrata*.
4. Realizar la PCR multiplex con los DNAs obtenidos de los aislados clínicos del complejo *C. glabrata*.
5. Identificar la especie de los aislados clínicos del complejo *C. glabrata*, con base en el tamaño del amplicón.
6. Purificar y secuenciar los amplicones obtenidos de aquellos aislados que no correspondieron a *C. glabrata sensu stricto*.
7. Comparar las secuencias con todas las secuencias de la base de datos del GenBank.

HIPÓTESIS

Entre los aislados estudiados, fenotipificados como complejo *C. glabrata*, se identificarán molecularmente las especies *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* o *C. nivariensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y origen de aislados clínicos del complejo *C. glabrata*

Un total de 77 aislados clínicos de levaduras del complejo *C. glabrata* fueron colectados en el laboratorio clínico del Hospital Regional “Gral. Ignacio Zaragoza”, ISSSTE, del Hospital Juárez de México y del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, durante el periodo de enero-mayo 2017 (Tabla 4). Los aislados fueron previamente caracterizadas como *C. glabrata* por medio del sistema automatizado VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Francia). Como referencia, se incluyó la cepa de *C. glabrata* 2001 del American Type Culture Collection (ATTC).

Tabla 4. Características de los aislados del complejo *Candida glabrata* incluidos en el estudio

Número de registro	Fuente de aislamiento	Identificación (VITEK® 2 Compact)	
		% Probabilidad	Nivel
2	Exudado vaginal	93	Muy bueno
3	Exudado vaginal	97	Excelente
6	Exudado vaginal	94	Muy bueno
8	Exudado vaginal	95	Muy bueno
10	Sangre	94	Muy bueno
14	Exudado vaginal	96	Excelente
15	Exudado vaginal	96	Excelente
16	Exudado vaginal	94	Muy bueno
19	Exudado vaginal	95	Muy bueno
21	Exudado vaginal	95	Muy bueno
25	Exudado vaginal	97	Excelente
26	Exudado vaginal	93	Muy bueno
27	Exudado vaginal	95	Muy bueno
28	Exudado vaginal	98	Excelente
30	Exudado vaginal	96	Excelente

32	Exudado vaginal	95	Muy bueno
33	Exudado vaginal	94	Muy bueno
37	Exudado vaginal	98	Excelente
39	Exudado vaginal	95	Muy bueno
40	Exudado vaginal	95	Muy bueno
46	Exudado vaginal	98	Excelente
48	Exudado vaginal	95	Muy bueno
49	Exudado vaginal	95	Muy bueno
50	Exudado vaginal	97	Excelente
51	Exudado vaginal	97	Excelente
54	Exudado vaginal	96	Excelente
56	Exudado vaginal	96	Excelente
57	Exudado vaginal	96	Excelente
58	Exudado vaginal	96	Excelente
59	Exudado vaginal	94	Muy bueno
61	Exudado vaginal	95	Muy bueno
65	Exudado vaginal	97	Excelente
69	Exudado vaginal	98	Excelente
70	Exudado vaginal	96	Excelente
71	Exudado vaginal	98	Excelente
99	Exudado vaginal	96	Excelente
106	Biopsia	96	Excelente
107	Sangre	95	Muy bueno
116	Sangre	95	Muy bueno
117	Sangre	95	Muy bueno
131	Absceso	96	Excelente
132	Sangre	96	Excelente
133	Sangre	96	Excelente
136	Diálisis peritoneal	97	Excelente
140	Semen	96	Excelente
147	Absceso	98	Excelente
150	Absceso	95	Muy bueno
151	Absceso	97	Excelente
153	Puntas de catéter	96	Excelente
159	Diálisis peritoneal	94	Muy bueno
166	Puntas de catéter	98	Excelente
222	Exudado Vaginal	96	Excelente
232	Exudado Vaginal	97	Excelente
233	Exudado Vaginal	95	Muy bueno
234	Exudado Vaginal	98	Excelente
237	Exudado Vaginal	96	Excelente
252	Exudado Vaginal	95	Muy bueno
255	Exudado Vaginal	97	Excelente
257	Exudado Vaginal	97	Excelente
267	Exudado Vaginal	96	Excelente
269	Exudado Vaginal	97	Excelente
276	Exudado Vaginal	95	Muy bueno
280	Exudado Vaginal	96	Excelente
3015	Exudado Vaginal	95	Muy bueno

3018	Exudado Vaginal	97	Excelente
3027	Exudado Vaginal	97	Excelente
3032	Exudado vaginal	96	Excelente
556-15	Sangre	96	Excelente
842-15	Sangre	96	Excelente
718-15	Sangre	95	Muy bueno
541-15	Sangre	97	Excelente
664-15	Sangre	95	Muy bueno
828-15	Sangre	95	Muy bueno
645-B-15	Sangre	98	Excelente
D-15	Sangre	97	Excelente
651-15	Sangre	95	Muy bueno
724-15	Sangre	95	Muy bueno

Cultivo

Los 77 aislados del complejo *C. glabrata* se cultivaron en cajas Petri con agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol a 28 °C durante 48 h y se conservaron a 4 °C.

Extracción de DNA

Una colonia de cada aislado del complejo *C. glabrata* se inoculó en tubos de ensaye conteniendo 3 mL de medio YPG (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) y se incubó a 28 °C con agitación orbital (100 rpm) durante toda una noche. Después se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500 µL de amortiguador fosfato salino pH 7,4 y se centrifugó a 10 000 rpm por 3 min para lavar el botón. El lavado se realizó dos veces y posteriormente se extrajo el DNA con el kit comercial Yeast DNA Preparation (Jena Bioscience, GE). Para ello, se transfirió 1 mL de cultivo celular de aislado a un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó a 15 000 rpm durante 1 min y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 300 µL de solución de suspensión celular para comenzar la lisis. Se agregó 1 µL de solución de la enzima liticosa (2.5 U/µL) y se mezcló por inversión 25 veces para después incubar el tubo a 37 °C durante un periodo de 30 a 60 min. Pasado este tiempo, se centrifugó a 15 000 rpm durante 1 min, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 300 µL de solución de suspensión celular, se adicionaron 100 µL de solución precipitadora de proteínas y se mezcló vigorosamente en vórtex durante 20 s, para

después centrifugar a 15 000 rpm durante 3 min. Se prosiguió a verter el sobrenadante en un microtubo de 1.5 mL, limpio, conteniendo 300 µL de isopropanol al 99%, se mezcló gentilmente por inversión 50 veces y se centrifugó a 15 000 rpm durante 1 min, pudiendo visualizar el DNA como un pequeño aglomerado blanco. Después se descartó el sobrenadante y se secó el tubo brevemente sobre papel absorbente, después se adicionaron 500 µL de solución amortiguadora de lavado, invirtiendo el tubo varias veces para lavar el DNA. Se centrifugó a 15 000 rpm durante 1 min, se descartó la solución de lavado y se dejó secar al aire, a temperatura ambiente durante 10 a 15 min. Por último, se adicionaron 50 µL de solución de hidratación al DNA seco y se agregaron 1.5 µL de solución de la enzima RNasa (50 mg/mL), se incubó a 37 °C durante 30 min. El DNA obtenido se mantuvo a 20 °C hasta su uso.

La cantidad y calidad de los DNAs se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (DeNovix, Inc., DS-11 Spectrophotometer, USA), tomando 1 µL de cada muestra y 1 µL de agua Milli Q como blanco de lectura.

Identificación molecular de las especies del complejo *C. glabrata*

Se llevó a cabo la PCR múltiplex descrita por Romeo *et al.* (2009), con las siguientes modificaciones: las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL conteniendo una solución amortiguadora de PCR 1X, 100 pmol/µL de cada cebador (UNI-5.8S, GLA-f, BRA-f, y NIV-f) (Sigma-Aldrich, USA) (Tabla 5), 200 µM de cada 2'-desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP) (Jena Bioscience), 2.5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* polimerasa (Jena Bioscience) y 10-15 ng de DNA genómico. Como control positivo se incluyó el DNA de *C. glabrata* 2001 ATTC, y agua desionizada como control negativo. Las reacciones se realizaron en un termociclador (Bio-Rad, Laboratories, Inc., USA), usando el siguiente programa de amplificación: una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 34 ciclos de 30 s a 94 °C, 40 s a 60 °C y 50 s a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C. El tamaño esperado de los amplicones fue de 397, 293 y 223 pb para *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, respectivamente.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la identificación de las especies del complejo *Candida glabrata* por PCR multiplex

Cebador	Secuencia (5´ → 3´)	Especie identificada	Tamaño del amplicón (pb)
UNI-5.8S	5´-ACCAGAGGGCGCAATGTG-3´		
GLA-f	5´-CGGTTGGTGGGTGTTCTGC-3´	<i>C. glabrata sensu stricto</i>	397
BRA-f	5´-GGGACGGTAAGTCTCCCG-3´	<i>C. braccarensis</i>	223
NIV-f	5´-AGGGAGGAGTTTGTATCTTTCAAC-3´	<i>C. nivariensis</i>	293

Análisis de productos de amplificación

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, ES) al 1,7%, teñidos con GelRed™ 3X (Biotium, USA) en amortiguador TBE 0.5X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8.3), bajo una FEM de 70 V y se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA (Jena Bioscience). Las imágenes de los geles fueron capturadas en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Purificación de los amplicones

Los fragmentos amplificados que, con base en el tamaño del amplicón, no correspondieron a *C. glabrata sensu stricto*, fueron purificados usando el kit comercial Agarose Gel Extraction (Jena Bioscience GmbH), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Para ello, los productos de amplificación se colocaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con GelRed™ 3X (Biotium). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5X. Una vez concluido el corrimiento, los geles se observaron a través de un transiluminador de luz UV, se cortaron con un bisturí los fragmentos que contenían los amplicones y se colocaron (100 – 300 mg, aproximadamente) en tubos de plástico de 1.5 mL, se añadieron 3 volúmenes de amortiguador de extracción y se incubó a 60 °C por 10 min, mezclando ocasionalmente para disolver el gel. Esta mezcla se colocó en una columna que contenía una membrana para purificar ácidos nucleicos (previamente activada con 100 µL de amortiguador de activación) y se centrifugó a 9 500 rpm por 30 s, se desechó el sobrenadante. Se agregaron 700 µL de amortiguador de lavado, se centrifugó a 9 500 rpm por 30 s y se descartó el sobrenadante. Este lavado se realizó dos veces. En el segundo lavado, se centrifugó

2 min más, bajo las mismas condiciones. Para eluir el DNA, la columna se colocó en un tubo de plástico de 1.5 mL, se añadieron 30 μ L de agua desionizada (Milli-Q) al centro de la membrana, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 9 500 rpm por 1 min. Este paso se repitió para obtener un volumen de 60 μ L de DNA purificado. El DNA de los amplicones purificados se ajustó a una concentración de 40 ng/ μ L para su secuenciación.

Secuenciación de los amplicones

Los fragmentos de DNA purificados (40 ng/ μ L) fueron enviados a secuenciar, en ambos sentidos con los oligonucleótidos correspondientes, al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad-Cinvestav (Irapuato, Guanajuato, MX).

Comparación de las secuencias en el Genbank

Los electroferogramas de las secuencias de los amplicones se visualizaron con el programa Chromas Lite 2.1.1 (<http://technelysium.com.au>) y se verificó visualmente que la calidad de la secuencia fuera adecuada (tamaño de los picos, tamaño de la secuencia). Posteriormente, las secuencias se compararon con todas las secuencias de hongos depositadas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Con base en los alineamientos más significativos (cobertura, expectación e identidad), se definió la identidad de los aislados.

RESULTADOS

Cultivo

En el cultivo de cada uno de los 77 aislados se observaron colonias con características típicas del complejo *C. glabrata* (Tabla 6) y absolutamente idénticas entre ellas (Figura 3).

Tabla 6. Resumen de las características generales evaluadas en los aislados clínicos

Característica colonial	Resultado
●Color	
-Anverso	Blanquecino/Amarillento
-Reverso	Amarillento
-Pigmento	Ausente
●Elevación	Convexa
●Borde	Entero
●Superficie	Lisa
●Aspecto	Húmedo
●Consistencia	Cremosa



Figura 3. Cultivo de aislados del complejo *Candida glabrata* en agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol, incubados a 28 °C

Extracción de DNA

La concentración de los DNAs obtenidos de los aislados del complejo *C. glabrata* estuvo en el rango de 10.03-28.86 ng/ μ L (Tabla 7), la cual fue una cantidad adecuada para llevar a cabo los ensayos de PCR.

Tabla 7. Concentraciones de DNA, así como de la relación de absorbencias que evalúa el grado de impurezas proteicas por muestra

Número de registro	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260 nm/280 nm
2	16.29	1.70
3	10.15	2.09
6	16.53	1.97
8	23.65	2.04
10	16.30	1.75
14	16.25	1.89
15	24.18	1.96
16	15.25	1.85
19	17.74	1.84
21	15.12	1.98
25	18.97	1.74
26	26.79	1.78
27	16.22	1.06
28	34.98	1.93
30	25.03	1.67
32	27.41	1.60
33	15.82	1.99
37	19.56	1.78
39	24.48	1.82
40	16.71	1.80
46	15.56	1.87
48	18.77	1.84
49	27.14	1.90
50	13.99	1.93
51	14.43	2.08
54	22.07	1.99
56	25.50	1.08
57	16.52	1.77
58	15.07	2.03
59	17.03	1.88
61	27.56	2.11
65	14.88	1.95
69	26.76	1.77
70	26.93	1.05
71	15.95	1.84
99	16.14	1.74

106	18.01	2.05
107	15.23	1.92
116	16.78	2.10
117	15.28	1.79
131	10.33	0.87
132	11.36	1.76
133	14.28	2.07
136	28.86	1.94
140	29.17	1.99
147	25.89	1.05
150	26.53	1.02
151	12.61	1.91
153	23.03	1.97
159	14.09	1.84
166	12.45	1.91
222	13.13	2.05
232	15.48	2.12
233	20.40	1.92
234	26.45	1.79
237	13.03	1.87
252	15.60	1.82
255	20.03	2.05
257	22.03	1.99
267	18.77	1.93
269	18.93	1.77
276	15.53	1.77
280	14.38	1.97
3015	10.77	1.80
3018	8.08	1.75
3027	10.48	1.84
3032	18.60	1.96
556-15	12.23	2.01
842-15	18.07	1.95
718-15	18.48	1.86
541-15	13.22	1.88
664-15	11.27	1.94
828-15	10.03	2.07
645-B-15	10.88	2.03
D-15	11.04	1.77
651-15	14.55	1.80
724-15	10.90	1.97

Identificación molecular de las especies del complejo *C. glabrata*

Como se observa en la Tabla 8, al realizar la amplificación del DNA obtenido de los 77 aislados estudiados, observamos que 73 DNAs, junto con el DNA de la cepa de referencia, mostraron un amplicón de aproximadamente 397 pb (Figuras 4-7). Sólo un aislado (276) amplificó un fragmento cercano a 223 pb (Figura 8). En tres aislados (3, 54 y 61) no se logró la amplificación (Figura 9), a pesar de haber realizado ensayos probando diferentes concentraciones de DNA.

Tabla 8. Identificación de aislados clínicos del complejo *C. glabrata* por PCR multiplex

Número de registro	Aprox. 397 pb <i>C. glabrata</i>	Aprox. 293 pb <i>C. nivariensis</i>	Aprox. 223 pb <i>C. bracarensis</i>	Negativo
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	+			
2	+			
3				+
6	+			
8	+			
10	+			
14	+			
15	+			
16	+			
19	+			
21	+			
25	+			
26	+			
27	+			
28	+			
30	+			
32	+			
33	+			
37	+			
39	+			
40	+			
46	+			
48	+			
49	+			
50	+			
51	+			
54				+
56	+			
57	+			
58	+			
59	+			
61				+

65	+			
69	+			
70	+			
71	+			
99	+			
106	+			
107	+			
116	+			
117	+			
131	+			
132	+			
133	+			
136	+			
140	+			
147	+			
150	+			
151	+			
153	+			
159	+			
166	+			
222	+			
232	+			
233	+			
234	+			
237	+			
252	+			
255	+			
257	+			
267	+			
269	+			
276			+	
280	+			
3015	+			
3018	+			
3027	+			
3032	+			
556-15	+			
842-15	+			
718-15	+			
541-15	+			
664-15	+			
828-15	+			
645-B-15	+			
D-15	+			
651-15	+			
724-15	+			
Total	73	0	1	3

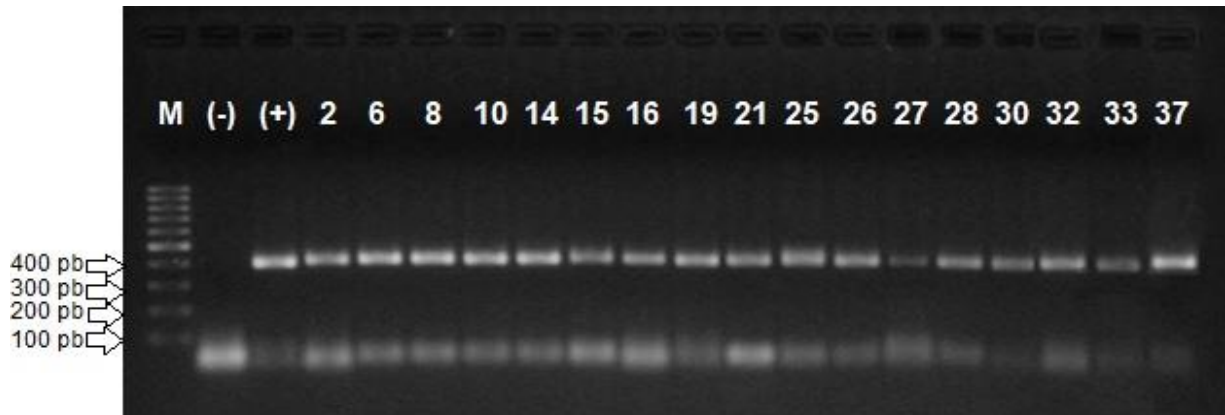


Figura 4. Gel de electroforesis revelado bajo luz UV, donde se muestra la amplificación, por PCR multiplex, del DNA de la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001(+) y de 17 aislados clínicos. M: marcador de tamaño molecular; (-): agua desionizada.

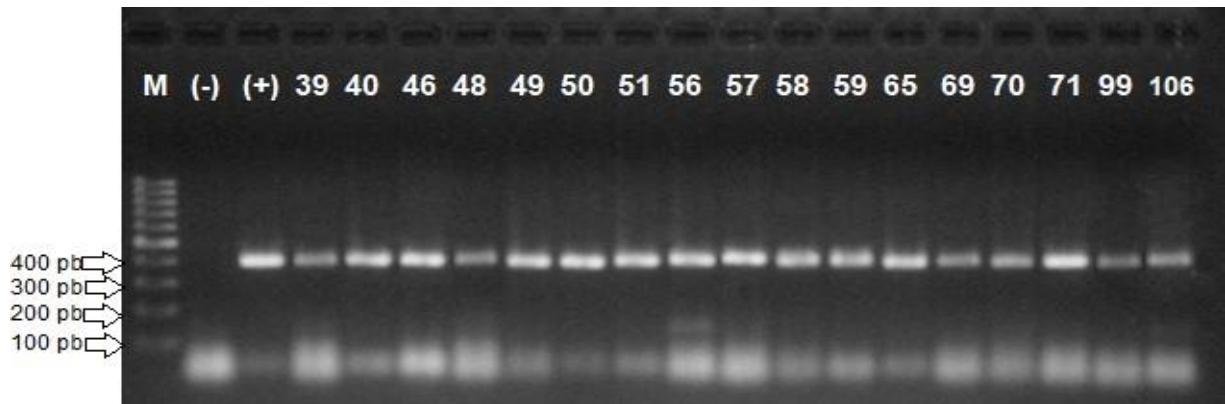


Figura 5. Gel de electroforesis revelado bajo luz UV, donde se muestra la amplificación, por PCR multiplex, del DNA de la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001(+) y de 17 aislados clínicos. M: marcador de tamaño molecular; (-): agua desionizada.

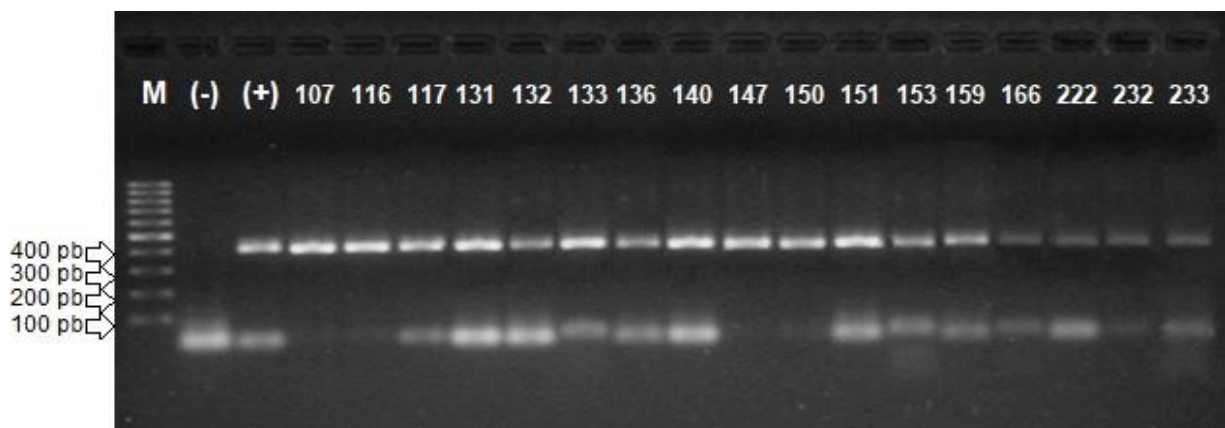


Figura 6. Gel de electroforesis revelado bajo luz UV, donde se muestra la amplificación, por PCR multiplex, del DNA de la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001(+) y de 17 aislados clínicos. M: marcador de tamaño molecular; (-): agua desionizada

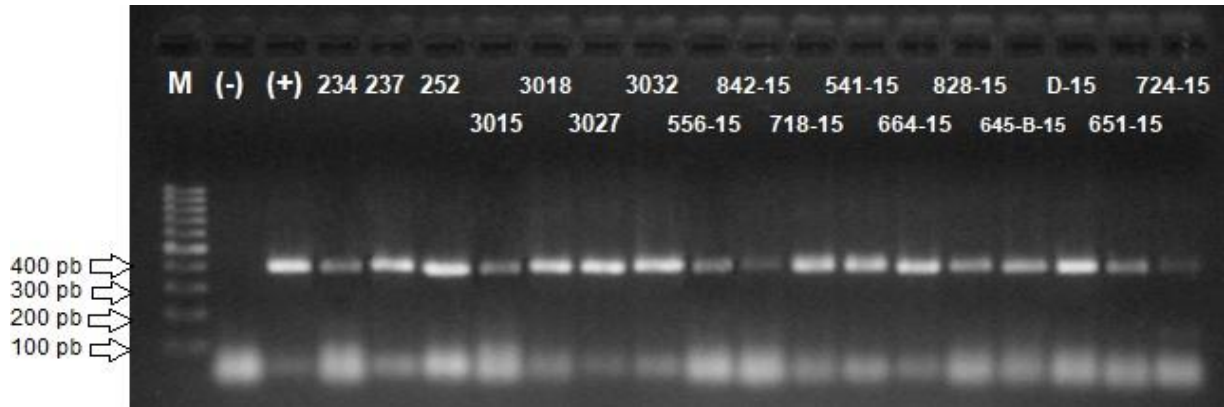


Figura 7. Gel de electroforesis revelado bajo luz UV, donde se muestra la amplificación, por PCR multiplex, de una cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001 (+) y de 17 aislados clínicos. M: marcador de tamaño molecular, (-): agua desionizada.

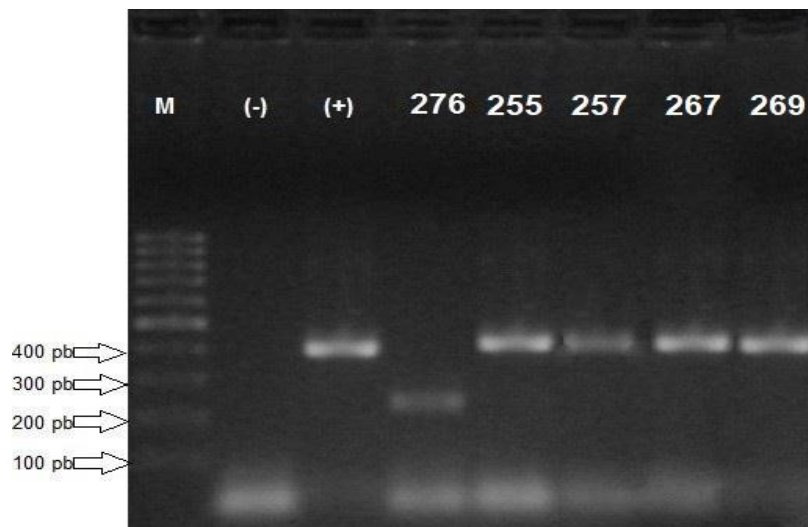


Figura 8. Gel de electroforesis revelado bajo luz UV, donde se muestra la amplificación, por PCR multiplex, del DNA de la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001 (+) y de cinco aislados clínicos. M: marcador de tamaño molecular, (-): agua desionizada.

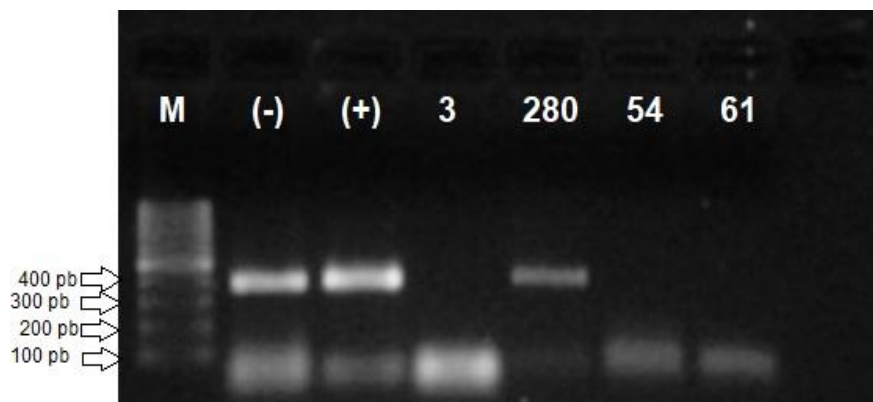


Figura 9. Gel de electroforesis revelado bajo luz UV, donde se muestra la amplificación, por PCR multiplex, del DNA de la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001(+) y de 4 aislados clínicos. M: marcador de tamaño molecular; (-): agua desionizada.

Purificación de los amplicones

El amplicón obtenido del aislado 276 fue el único purificado, ya que mostró un tamaño de 223 pb, indicativo de *C. bracarensis*. El fragmento purificado se obtuvo a una concentración de 76.3 ng/ μ L, con una pureza e integridad adecuadas (A260/A280 de 1.7 y A260/A230 de 2.0) para su secuenciación.

Secuenciación de los amplicones y comparación en el GenBank

La calidad de las secuencias obtenidas fue adecuada, ya que en el electroferograma se observaron picos altos y bien definidos (Figura 10).

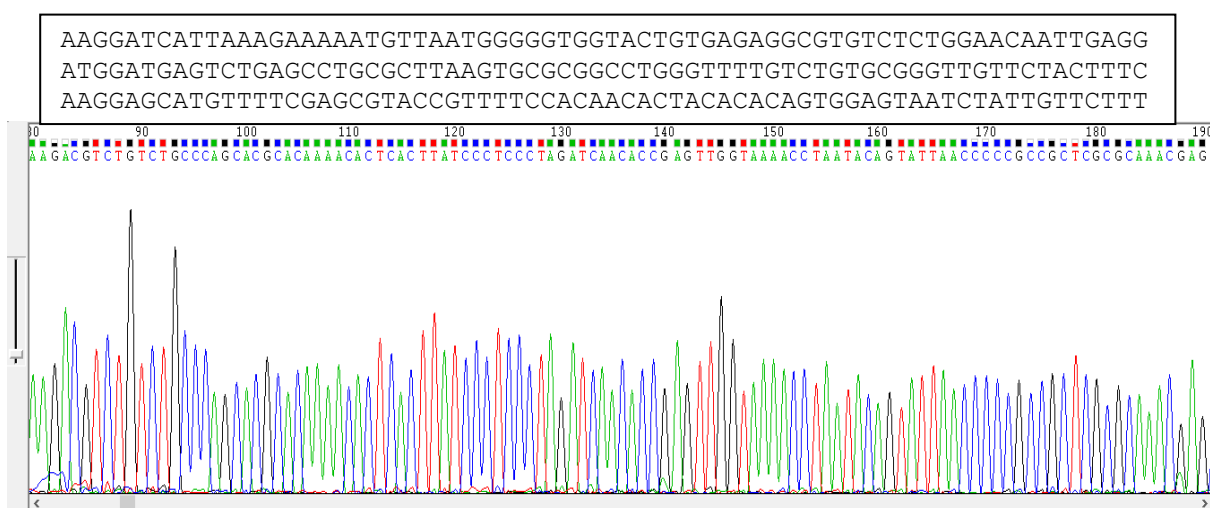


Figura 10. Electroferograma y secuencia del amplicón obtenido del aislado 276, correspondiente a *Candida bracarensis*.

El alineamiento de la secuencia del aislado 276 con las secuencias depositadas en el GenBank, mostró parámetros de similitud con las secuencias parciales del gen 18S del RNA ribosomal (ITS1, 5.8S, ITS2) de diferentes cepas de *C. bracarensis* con una cobertura del 93%, valor de expectación 4×10^{-83} , y valores de identidad de 94%, con lo que la identidad del aislado 276 se corroboró (Figura 11).

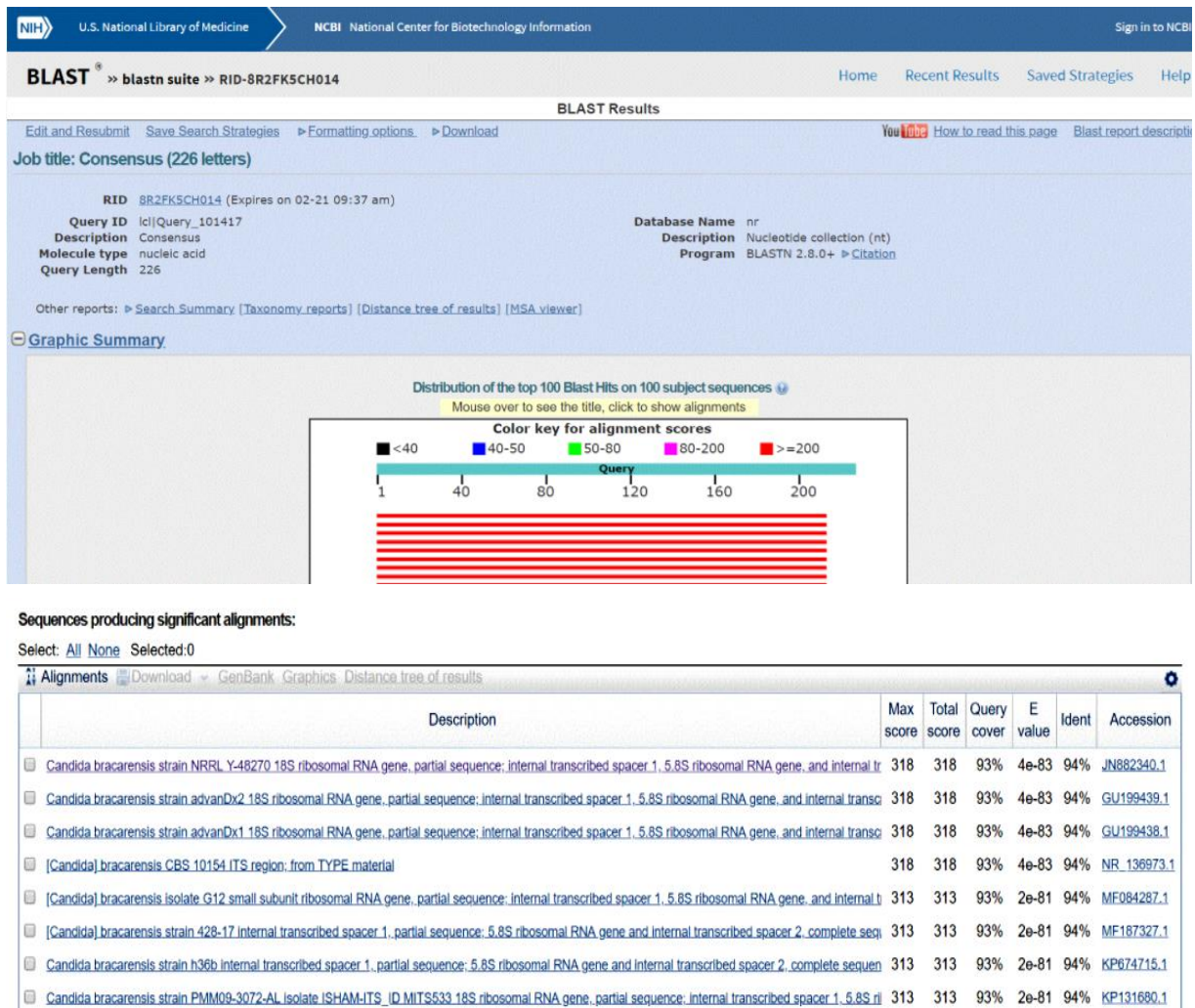


Figura 11. Alineamiento de la secuencia del aislado 276 con todas las depositadas en el GenBank. En el alineamiento se observa la cobertura, valor de expectación e identidad de la secuencia analizada.

DISCUSIÓN

En los últimos años, la incidencia de la candidiasis causada por CNA ha aumentado, siendo *C. glabrata* una de las especies que se aísla cada vez con mayor frecuencia. A partir de 2006, cuando *C. nivariensis* y *C. bracarensis* fueron descritas como especies estrechamente relacionadas con *C. glabrata*, la prevalencia de dichas especies ha sido analizada en varios países (Bishop *et al.*, 2008; Lockhart *et al.*, 2009; Cuenca-Estrella *et al.*, 2011; Esposto *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Morales-López *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2017), usando métodos moleculares debido a que fenotípicamente son indistinguibles. Sin embargo, en México no existen datos al respecto, por lo que en este trabajo se llevó a cabo la identificación molecular de 77 aislados clínicos de *C. glabrata*, previamente caracterizados por métodos fenotípicos. De 74 aislados que fueron identificados molecularmente, el 98.6% correspondió a *C. glabrata sensu stricto* y el 1.35% a *C. bracarensis*, mientras que *C. nivariensis* no fue identificada entre los aislados estudiados. La baja prevalencia encontrada de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* concuerda con lo reportado por otros autores. Bishop *et al.* (2008b) identificaron, mediante hibridación *in situ* de péptidos de ácido nucleico, 137 aislados clínicos de *C. glabrata* y encontraron que 2.2% pertenecía a *C. bracarensis*, pero ningún aislado fue identificado como *C. nivariensis*. Lockhart *et al.* (2009) analizaron 1598 aislados de *C. glabrata* y encontraron sólo 0.06% de *C. bracarensis* y 0.12% de *C. nivariensis*. Cuenca-Estrella *et al.* (2011) reportaron 2% de *C. bracarensis*, pero no encontraron *C. nivariensis*, mientras que Esposto *et al.* (2013) no encontraron ninguna de estas especies en 100 aislados estudiados de 14 regiones italianas. Li *et al.* (2014) analizaron siete aislados, de los cuales el 2.33% fue identificado como *C. nivariensis* y 0.33% como *C. bracarensis*. En Argentina, Morales-López *et al.* (2016) encontraron 2,56% de *C. nivariensis* en 117 aislados analizados. Finalmente, Hou *et al.*, 2017 analizaron 13 aislados y encontraron 92.3% de *C. nivariensis* y 7.69% de *C. bracarensis*. Estos reportes indican que la prevalencia de las especies filogenéticamente relacionadas con *C. glabrata* es baja. No obstante, su presencia entre aislados clínicos, aún en bajo

porcentaje, es relevante debido a su diferente virulencia y susceptibilidad antifúngica, además crea la necesidad de hacer uso de las técnicas moleculares para su correcta identificación, ya que los métodos convencionales, como el cultivo y los métodos bioquímicos no logran discriminar entre *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*.

Del total de los aislados estudiados, tres (3, 54 y 61) no fueron identificados molecularmente, no obstante que habían sido caracterizados como *C. glabrata* mediante el sistema Vitek® 2. Esto se debió probablemente a que los aislados no correspondían al complejo *C. glabrata*, sino a otra especie de *Candida* o a otro género de levaduras, ya que se ha reportado que el sistema Vitek® 2 presenta problemas particularmente para la identificación de *C. glabrata* (Massonet *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

Entre los 77 aislados del complejo *C. glabrata* analizados, se corroboró la especie en 73 aislados por PCR multiplex y un aislado fue identificado como *C. bracarensis*. No se encontraron aislados de *C. nivariensis*. Tres aislados no pudieron ser identificados molecularmente. Es importante destacar que este es el primer reporte de *C. bracarensis* en México.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcoba-Flórez J, Arévalo Mdel P, González-Paredes FJ, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, Méndez-Alvarez S. PCR Protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol.* 2005a; 43(12): 6194-6196.
2. Alcoba-Flórez J, Méndez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, del Pilar Arévalo M. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol.* 2005b; 43(8): 4107-4111.
3. Almeida C, Azevedo NF, Santos S, Keevil CW, Vieira MJ. Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH). *PLoS One.* 2011; 6(3): 14786.
4. Ayatollahi SA, Khalesi E, Shahidi GH, Aghighi S, Sharifi F, Aram F. Rapid molecular diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Biotechnology.* 2007; 6(4): 583-587.
5. Aznar-Marin P, Galan-Sanchez F, Marin-Casanova P, García-Martos P, Rodríguez-Iglesias M. *Candida nivariensis* as a new emergent agent of vulvovaginal candidiasis: description of cases and review of published studies. *Mycopathologia.* 2016; 181(5-6): 445-449.
6. Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. Production of white colonies on CHROMagar Candida medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *J Clin Microbiol.* 2008a; 46(10): 3498-3500.
7. Bishop JA, Chase N, Magill SS, Kurtzman CP, Fiandaca MJ, Merz WG. *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. *J Clin Microbiol.* 2008b; 46(2): 443-446.
8. Bonifaz JA. Candidosis. *En:* Bonifaz JA, editor. *Micología Médica Básica.* Cuarta edición. México. McGraw-Hill Interamericana Editores; 2012. p. 321-347.

9. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. J Clin Microbiol. 2008; 46(3): 933-938.
10. Chowdhary A, Randhawa HS, Khan ZU, Ahmad S, Juneja S, Sharma B, Roy P, Sundar G, Joseph L. First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen. Med Mycol. 2010; 48(2): 416-420.
11. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. J Mol Diagn. 2011; 13(1): 12-22.
12. Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56(1): 313-317.
13. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Isla G, Rodríguez d, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference center and from a population-based surveillance study of candidemia. Med Mycol. 2011; 49(5): 525-529.
14. Diaz MC, Camponovo R, Araya I, Cerda A, Santander MP, Carrillo-Muñoz AJ. Identificación y sensibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. Rev Esp Quimioter. 2016; 29(3): 151-154.
15. Dudiuk C, Morales-López SE, Podestac V, Macedo D, Leonardelli F, Vitale RG, Toselloc ME, Cabeza MS, Biasoli M, Gamarra S, Garcia-Effron G. Multiplex PCR designed to differentiate species within the *Candida glabrata* complex. Rev Iberoam Micol. 2017; 34(1): 43-45.
16. Enache-Angoulvant A, Guitard J, Grenouillet F, Martin T, Durrens P, Fairhead C, Hennequin C. Rapid Discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis*, and *Candida bracarensis* by Use of a Singleplex PCR. J Clin Microbiol. 2011; 49(9): 3375-3379.
17. Esposto MC, Prigitano A, Romeo O, Criseo G, Trovato L, Tullio V, Fadda ME, Tortorano AM. Looking for *Candida nivariensis* and *C. bracarensis* among a

- large Italian collection of *C. glabrata* isolates: results of the FIMUA working group. *Mycoses*. 2013; 56(3): 394-396.
18. Feng X, Ling B, Yang X, Liao W, Pan W, Yao Z. Molecular Identification of *Candida* Species Isolated from Onychomycosis in Shanghai, China. *Mycopathologia*. 2015; 180(5-6): 365-371.
 19. Figueiredo-Carvalho MH, Ramos L de S, Barbedo LS, Chaves AL, Muramoto IA, Santos AL, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. First description of *Candida nivariensis* in Brazil: antifungal susceptibility profile and potential virulence attributes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(1): 51-8.
 20. Fornari G, Vicente VA, Gomes RR, Muro MD, Pinheiro RL, Ferrari C, Herkert PF, Takimura M, Carvalho NS, Queiroz-Telles F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. *Braz J Microbiol*. 2016; 47(2): 373-380.
 21. Fraser M, Borman AM, Johnson EM. Evaluation of the commercial rapid trehalose test (GLABRATA RTT) for the point of isolation identification of *Candida glabrata* isolates in primary cultures. *Mycopathologia*. 2012; 173(4): 259-264.
 22. Fujita S, Senda Y, Okusi T, Ota Y, Takada H, Yamada K, Kawano M. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(10): 3459-3461.
 23. Gabaldón T, Martin T, Marcet-Houben M, Durrens P, Bolotin-Fukuhara M, Lespinet O, Arnais S, Boissard S, Aguilera G, Atanasova R, Bouchier C, Couloux A, Creno S, Almeida Cruz J, Devillers H, Enache-Angoulvant A, Guitard J, Jaouen L, Ma L, Marck C, Neuvéglise C, Pelletier E, Pinard A, Poulain J, Recoquillay J, Westhof E, Wincker P, Dujon B, Hennequin C, Fairhead C. Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*. 2013; 14: 623.
 24. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. *In vitro* fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by timekill studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(6): 3615-3618.

25. Gorton RL, Jones GL, Kibbler CC, Collier S. *Candida nivariensis* isolated from a renal transplant patient with persistent candiduria-molecular identification using ITS PCR and MALDI-TOF. *Med Mycol Case Rep.* 2013; 2: 156-158.
26. Hall D, Bonifas R, Stapert L, Thwaites M, Shinabarger DL, Pillar CM. *In vitro* potency and fungicidal activity of CD101, a novel echinocandin, against recent clinical isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 89(3): 205-211.
27. Hou X, Xiao M, Chen SCA, Wang H, Yu SY, Fan X, Kong F, Xu YC. Identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a multi-center chinese collection of yeasts. *Front Microbiol.* 2017; 8:5. doi: 10.3389/fmicb.2017.00005
28. Li J, Shan Y, Fan S, Liu X. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia.* 2014; 178(3-4): 279-283.
29. Liu WL, Lai CC, Li MC, Wu CJ, Ko WC, Hung YL, Tang HJ, Hsueh PR. Clinical manifestations of candidemia caused by uncommon *Candida* species and antifungal susceptibility of the isolates in a regional hospital in Taiwan, 2007-2014. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.007>
30. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, Diekema DJ. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4): 1216-1217.
31. López-Soria LM, Bereciartua E, Santamaría M, Soria LM, Hernández-Almaraz JL, Mularoni A, Nieto J, Montejo M. Primer caso de fungemia asociada a catéter por *Candida nivariensis* en la Península Ibérica. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 30(1): 69-71.
32. Massonet C, Van Eldere J, Vanechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5): 2209-2211.

33. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós G. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(10): 2315-2322.
34. Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30(11): 1409-1416.
35. Morales-López S, Dudiuk C, Vivot W, Szusz W, Córdoba SB, Garcia-Effron G. Phenotypic and molecular evaluation of echinocandin susceptibility of *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* strains isolated during 30 years in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(7): e00170-17.
36. Morales-López SE, Taverna CG, Bosco-Borgeat ME, Maldonado I, Vivot W, Szusz W, Garcia-Effron G, Córdoba SB. *Candida glabrata* species complex prevalence and antifungal susceptibility testing in a culture collection: First description of *Candida nivariensis* in Argentina. *Mycopathologia.* 2016; 181(11-12): 871-878.
37. Moreira A, Silva S, Botelho C, Sampaio P, Pais C, Henriques M. *Candida bracarensis*: Evaluation of virulence factors and its tolerance to amphotericin B and fluconazole. *Mycopathologia.* 2015; 180(5-6): 305-315.
38. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
39. Parmeland L, Gazon M, Guerin C, Argaud L, Lehot JJ, Bastien O, Allaouchiche B, Michallet M, Picot S, Bienvenu AL. *Candida albicans* and non-*Candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. *Med Mycol.* 2013; 51(1): 33-37.

40. Powell AM, Gracely E, Nyirjesy P. Non-*Candida albicans* vulvovaginitis: treatment experience at a tertiary care vaginitis center. *J Low Genit Tract Dis*. 2016; 20(1): 85-89.
41. Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2017; 34(4): 203-210.
42. Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods*. 2009; 79: 117–120.
43. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230: 1350-1354.
44. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62:10-24.
45. Sharma C, Wankhede S, Muralidhar S, Prakash A, Singh PK, Kathuria S, Kumar DA, Khan N, Randhawa HS, Meis JF, Chowdhary A. *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(1): 46-50.
46. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015; 6: 791.
47. Sony P, Kalyani M, Jeyakumari D, Kannan I, Sukumar RG. *In vitro* antifungal activity of *cassia fistula* extracts against fluconazole resistant strains of *Candida* species from HIV patients. *J Mycol Med*. 2017. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.07.010
48. Stender H. PNA-FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003; 3(5): 649-655.

49. Swoboda-Kope E, Sikora M, Golas M, Piskorska K, Gozdowski D, Netsvyetayeva I. *Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2014; 57(12): 747-753.
50. Tavanti A, Davidson A D, Gow N A, Maiden M C, Odds F C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 284-292.
51. Tay ST, Lotfalikhani A, Sabet NS, Ponnampalavanar S, Sulaiman S, Na SL, Ng KP. Occurrence and characterization of *Candida nivariensis* from a culture collection of *Candida glabrata* clinical isolates in Malaysia. *Mycopathologia*. 2014; 178(3-4): 307-314.
52. Telleria O, Ezpeleta G, Herrero O, Miranda-Zapico I, Quindós G, Cisterna R. Validation of the PCR–dHPLC method for rapid identification of *Candida glabrata* phylogenetically related species in different biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012; 893-894: 150-156.
53. Vella A, De Carolis E, Mello E, Perlin DS, Sanglard D, Sanguinetti M, Posteraro B. Potential use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen *Candida glabrata*. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 9099.
54. Vipulanandan G, Herrera M, Wiederhold NP, Li X, Mintz J, Wickes BL, Kadosh D. Dynamics of mixed–*Candida* species biofilms in response to antifungals. *J Dent Res*. 2018; 97(1): 91-98.
55. Wahyuningsih R, SahBandar IN, Theelen B, Hagen F, Poot G, Meis JF, Rozalyani A, Sjam R, Widodo D, Djauzi S, Boekhout T. *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus-infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(1): 388-391.
56. Warren TA, McTaggart L, Richardson SE, Zhang SX. *Candida bracarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(12): 4677-4679.