



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES Caspp
MEDIANTE PCR SIMPLEX PARA LA CORRECTA IDENTIFICACIÓN
DE AISLADOS CLÍNICOS DEL GÉNERO *Candida***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CANO LÓPEZ CÁTERIN CRISTAL



CIUDAD DE MÉXICO

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Q.F.B.	Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL:	M. en C.	José Alexandro Bonifaz Trujillo
SECRETARIO:	DRA.	María Guadalupe Frías De León
1er. SUPLENTE:	DR.	Francisco Javier Plasencia de la Parra
2do. SUPLENTE:	DRA.	Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR, DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN, HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, S.S.A.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA GUADALUPE FRÍAS DE LEÓN

SUSTENTANTE:

CANO LÓPEZ CÁTERIN CRISTAL

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	4
Candidosis y candidosis invasiva.....	4
Etiología de la candidosis.....	5
Identificación de las especies de <i>Candida</i>	6
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Aislados clínicos.....	16
Cultivo y conservación de los cultivos de <i>Candida</i> spp.....	20
Extracción de DNA.....	20
Identificación molecular de los aislados clínicos de <i>Candida</i> spp.....	21
Purificados de los amplicones.....	22
Secuenciación de los amplicones y comparación de las secuencias en el GenBank.....	23
Evaluación de la sensibilidad de los marcadores Caspp.....	23
RESULTADOS.....	24
Extracción de DNA.....	24
Identificación de los aislados de <i>Candida</i> spp. mediante la amplificación de los marcadores Caspp.....	28
Purificación de los amplicones.....	33
Secuenciación de los amplicones y comparación de las secuencias en el GenBank.....	34
Evaluación de la sensibilidad de los marcadores Caspp.....	39
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
APÉNDICE.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Amplificación de los marcadores Caspp a partir del DNA de las ocho cepas de referencia de *Candida*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 28
- Figura 2.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de 36 aislados clínicos fenotipificados como *Candida albicans*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 29
- Figura 3.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de 28 aislados clínicos fenotipificados como *Candida glabrata*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 30
- Figura 4.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de doce aislados clínicos fenotipificados como *Candida parapsilosis*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 31
- Figura 5.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de siete aislados clínicos fenotipificados como *Candida tropicalis*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 31
- Figura 6.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de un aislado clínico fenotipificado como *Candida guilliermondii*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 32
- Figura 7.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de dos aislados clínicos fenotipificados como *Candida krusei*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 32
- Figura 8.** Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de 20 aislados clínicos de *Candida* sp. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 33
- Figura 9.** Purificación de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R, obtenido del aislado clínico 109 de *Candida albicans*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA..... 34

Figura 10. Electroferograma de la secuencia del amplicón de 1,086 pb, generado a partir del aislado clínico 100 de *Candida albicans*. La secuencia se obtuvo con el oligonucleótido Caspp-R..... 34

Figura 11. Alineamiento de la secuencia del aislado 100 con todas las depositadas en el GenBank. En el alineamiento se observa la cobertura, valor de expectación e identidad de la secuencia analizada..... 35

Figura 12. Sensibilidad de los marcadores Caspp utilizando el DNA de la cepa ATCC de *C. parapsilosis*. La cantidad mínima detectada fue de 1 pg/ μ L. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb..... 40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos convencionales para la identificación fenotípica de las especies de *Candida*..... 7

Tabla 2. Marcadores moleculares para la identificación de *Candida* spp. por PCR..... 13

Tabla 3. Aislados clínicos de *Candida* spp..... 16

Tabla 4. Cuantificación por espectrofotometría del DNA de los aislamientos clínicos y cepas de referencia de *Candida* spp..... 24

Tabla 5. Identificación de las ocho cepas de referencia y 105 aislados clínicos de *Candida* spp., por métodos fenotípicos, PCR simplex y secuenciación..... 36

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la incidencia de las micosis invasivas ha incrementado considerablemente, de estas micosis, la más frecuente es la candidosis invasiva (CI), que afecta a los pacientes inmunocomprometidos, como son los oncológicos, trasplantados, neonatos, y pacientes internados en las unidades de cuidados intensivos, quienes están propensos a la infección debido al uso de antibióticos de amplio espectro, catéteres venosos centrales, nutrición parenteral total, estancias intrahospitalarias prolongadas, además de la gravedad de la enfermedad de base (sepsis, shock séptico y disfunción multiorgánica) (Pfaller y Dikema, 2007; de Bedout y Gómez, 2010; Rodloff *et al.*, 2011; Cervera, 2012). La CI presenta una tasa de mortalidad cercana al 50%, debido a fallas en el diagnóstico y tratamiento (Zaoutis *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2012), por lo que esta micosis representa un problema de salud importante.

Está documentado que cerca del 90% de las CI son causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*; sin embargo, cada vez se aíslan con mayor frecuencia otras especies, entre ellas *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). Diferentes autores coinciden en constatar su peor pronóstico en infecciones causadas por especies no-*albicans* en comparación con las producidas por *C. albicans* (Ben Abraham *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2005), ya que algunas de las especies no-*albicans* presentan resistencia intrínseca (*C. krusei*) o reducida (*C. glabrata*) a los azoles o a las equinocandinas (*C. parapsilosis*) (Krcmery y Barnes, 2002). Por tal motivo, es necesario que en el diagnóstico de la CI se identifiquen las levaduras a nivel de especie, con el fin de dar un tratamiento adecuado. Es importante considerar que, actualmente, el número de especies causantes de CI es mayor, ya que se han descrito especies crípticas que forman parte del complejo *C. glabrata* (*C. nivariensis* y *C. bracariensis*) y *C. parapsilosis* (*C. metapsilosis* y *C.*

orthopsilosis), las cuales también pueden causar CI (González *et al.*, 2013; López-Soria *et al.*, 2013), lo que puede generar problemas en la identificación correcta de las levaduras.

En el diagnóstico de la CI, existen diversas pruebas de laboratorio (cultivo en diferentes medios, fermentación de carbohidratos, entre otras) para identificar a las diferentes especies de *Candida*, pero tienen la desventaja de que en muchas ocasiones no son determinantes, además de requerir el aislamiento de la levadura, el cual no siempre se logra, o se obtiene después de tiempos prolongados de incubación (Clancy y Nguyen, 2013). Estas desventajas dificultan el diagnóstico oportuno y promueven la administración de tratamientos empíricos basados únicamente en la evaluación clínica de los pacientes y los factores de riesgo (Colom *et al.*, 2006; León *et al.*, 2006).

Con el objetivo de lograr un diagnóstico más certero, se han desarrollado pruebas moleculares para la identificación de las levaduras directamente en muestras biológicas. Dentro de las pruebas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en sus diferentes modalidades, es la más empleada, por su sensibilidad y especificidad. De los ensayos de PCR reportados en la literatura para la identificación de *Candida* spp., destacan los que tienen como diana las regiones del DNA que codifican para los genes ribosomales y sus espaciadores intergénicos (DNAr-ITS). Los genes ribosomales tienen secuencias muy conservadas y estables para la hibridación de los oligonucleótidos, así como regiones con variabilidad intragénero, lo que permite la identificación de *Candida* a nivel de especie. Se estima que las levaduras poseen más de 150 copias de estos complejos génicos ribosomales a lo largo del genoma, lo que confiere gran sensibilidad a la PCR (Colom *et al.*, 2006; Xafranski *et al.*, 2013; Taira *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Recientemente, García-Salazar (2016) desarrolló marcadores Caspp para la identificación de *Candida* spp., los cuales corresponden a una región entre los espacios internos transcritos 1 (ITS1), 5.8S e ITS2 de los genes ribosomales. Estos marcadores identifican las especies de *Candida* de mayor

importancia clínica, mediante la amplificación de fragmentos especie-específicos *C. albicans* 850 pb, *C. glabrata* 1000 pb, *C. tropicalis* 790 pb, *C. parapsilosis* 731 pb, *C. krusei* 800 pb, *C. guilliermondii* 1100, *C. lusitaniae* 590 pb, *C. dubliniensis* 810 pb, *C. pseudotropicalis* 900 pb, *C. famata* 700 pb, *C. zeylanoides* 800 pb y *C. lipolytica* 790 pb, por PCR simplex con los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R. Otra ventaja de los marcadores Caspp es que fueron diseñados a partir de aislados autóctonos, esto es relevante debido a la significativa variabilidad genética que presenta el hongo, con respecto a su origen geográfico (Farkas *et al.*, 2009), además permiten diferenciar a *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* de sus respectivas especies crípticas, por lo que tienen un uso potencial en el diagnóstico de la CI en México. Sin embargo, antes de usar estos marcadores en la identificación del patógeno en muestras clínicas, es necesario evaluar su especificidad y sensibilidad para garantizar la confiabilidad de los resultados.

Por lo que en este trabajo se evaluó la especificidad y sensibilidad de los marcadores Caspp, utilizando DNA de cepas de referencia y de 105 aislados clínicos, previamente identificadas por métodos fenotípicos.

MARCO TEÓRICO

Generalidades del género *Candida*

El género *Candida* comprende alrededor de 200 especies de levaduras, unicelulares, alargadas o ligeramente redondas (2-6 x 3-9 μm), algunas de ellas tienen la habilidad de crecer en forma de pseudohifas o hifas, por ejemplo *C. albicans*. Las especies de *Candida* se encuentran en un rango diverso de nichos ambientales, algunas han sido útiles como controladores biológicos de fitopatógenos, así como en procesos de producción de alimentos, xilitol, etanol, ácido cítrico y enzimas, entre otras aplicaciones biotecnológicas (Canilha *et al.*, 2003; Obera, 2004). Por lo menos 20 especies de *Candida* han sido reconocidas como colonizadoras o causantes de infección en el humano (Brandt y Lockhart, 2012). Sin embargo, es importante mencionar que estas levaduras no son patógenos primarios, por lo que para poder proliferar abundantemente, colonizar tejidos y causar la enfermedad (endógena) se requiere de un compromiso del sistema inmunológico o un desequilibrio en la microbiota del hospedero. La infección exógena, es facilitada, además del inmunocompromiso, por el uso de soluciones de irrigación, nutrición parenteral, entre otras (Murray *et al.*, 2007).

Candidosis y candidosis invasiva

La candidosis es una infección aguda o crónica producida por diferentes especies del género *Candida*, generalmente limitada a la piel y membranas mucosas (candidosis superficial), pero también puede presentarse como una infección sistémica o invasiva (Dabas, 2013). La patogenicidad de las especies de *Candida* se atribuye a diversos factores de virulencia, tales como la capacidad de adherirse y formar biopelículas en el tejido del huésped o en dispositivos médicos, evadir las defensas del huésped, así como la producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas y hemolisinas) que dañan el tejido (Calderone, 2002).

La forma superficial de la candidosis es la más frecuente, mientras que la invasiva, aunque es menos frecuente, generalmente se presenta de forma severa. La CI es una patología importante en la población de pacientes críticos, dada su frecuencia,

elevada mortalidad y asociación a un incremento tanto en los costos como en la estancia hospitalaria. La CI se define como el aislamiento de alguna especie de *Candida* a partir de hemocultivos (candidemia) y/o cultivos de algún otro sitio estéril infectado por este patógeno (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Tobar *et al.*, 2011). La CI se manifiesta como un conjunto de síntomas y signos que no son suficientes para distinguirla fácilmente de otras infecciones, puede involucrar cualquier órgano, y por tanto, presentarse en una variedad amplia de manifestaciones clínicas que dependerán de la localización de la infección, incluyendo esofagitis, neumonitis, cistitis, pielonefritis, mediastinitis, empiema, peritonitis y endocarditis (Lionakis, 2014).

La mayoría de las candidosis se pueden originar de un foco endógeno, ya sea por un desequilibrio en la microbiota o por alteraciones en la respuesta inmune del huésped, o bien, por una fuente exógena (manos del personal sanitario, dispositivos médicos, tales como catéteres venosos, sondas de nutrición parenteral y respiradores). Tanto la infección endógena como exógena, son facilitadas por una depresión del estado inmunológico de los pacientes (Caballero-Trejo, 2014).

Etiología de la candidosis

De las cerca de 200 especies conocidas de *Candida*, aproximadamente 20 han sido asociadas a infección en humanos, de las que *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* son las más frecuentes tanto en la candidosis superficial como en la invasiva; sin embargo, se han aislado cada vez con mayor frecuencia a *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. famata*, *C. intermedia*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. lipolytica* y *C. kefyr* (Arenas, 2008; De Bedout, *et al.*, 2010; Ruhnke *et al.*, 2011; Bonifaz, 2012; Sardi *et al.*, 2013; Bassetti *et al.*, 2015; Caggiano *et al.*, 2015). Es importante destacar que algunas de estas especies presentan resistencia intrínseca (*C. krusei*) o reducida (*C. glabrata*) a los azoles o a las equinocandinas (*C. parapsilosis*) (Krcmery y Barnes, 2002).

Es importante destacar que el número de especies patógenas para el humano puede ser mayor, dado que *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*), *C. glabrata* (*C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracariensis*) y *C. guilliermondii* (*C. guilliermondii sensu stricto*, *C. fermentati*, *C. carpophila* y *C. xestobii*) tienen especies crípticas que también han sido aisladas de casos clínicos, y que son difíciles de identificar por métodos basados en el fenotipo y comúnmente empleados en los laboratorios clínicos (de Bedout y Gómez, 2010; González *et al.*, 2013). Por lo que la identificación de *Candida* a nivel de especie puede ser relevante en el diagnóstico y tratamiento de la micosis.

Identificación de las especies de *Candida*

Existe una variedad de métodos para identificar las levaduras de *Candida*, incluyendo los métodos tradicionales, como la prueba de tubo germinativo, estudio de la morfología y utilización de carbohidratos; pruebas enzimáticas y fluorogénicas y métodos moleculares.

Los métodos convencionales para la identificación de *Candida* spp. son procedimientos costo-efectivos y prácticos para la discriminación rutinaria de las levaduras en los laboratorios de microbiología clínica, están basados en sus características morfológicas y fisiológicas. Sin embargo, la identificación certera de los aislados clínicos es a veces compleja y requiere tiempo prolongado para obtener un resultado (Cardenes *et al.*, 2004). Por lo que se han desarrollado varios sistemas comerciales rápidos, manuales o automatizados, los cuales pueden tener diferente especificidad y sensibilidad en la identificación de las especies de *Candida* (Tabla 1).

Tabla1. Métodos convencionales para la identificación fenotípica de las especies de *Candida*

Autores	Sistema de identificación	Especies que identifica	Descripción de la técnica	Tipo de muestra	Ventajas	Desventajas	Sensibilidad / Especificidad
Métodos no disponibles comercialmente							
Guzel et al., 2011; Cardenes et al., 2004; Kim et al., 2002, 2010	Prueba de tubo germinativo	<i>C. albicans</i>	Incubación en suero a 37° C, 2-4 h	Cepa pura	Simple, económico y eficiente	Temperatura, concentración del inculo, composición del medio, pH contaminación bacteriana, otras especies pueden generar tubo germinativo o pseudohifas	98%/100%
Gutiérrez et al., 2002; Kim et al., 2002; Staib & Morschhauser, 2007	Formación de clamidoconidios	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	Depleción de nutrientes en el medio de cultivo (agar harina de maíz, caseína, tabaco o Staib)	Cepa pura	Simple, económico y eficiente	Dificultad para identificación la posición de los clamidoconidios	Alta/Alta
Campanha et al., 2005	Temperatura de crecimiento	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i> no crece a 42-45° C	Cepa pura	Simple, económico y eficiente	Temperatura, contaminación del medio	Baja/Baja
Neppelenbroek et al., 2014	Asimilación de carbono y nitrógeno	<i>Candida</i> spp.	Asimilación de nitrógeno utilizando un α naftilamina y reactivos de ácido sulfanílico. Asimilación de carbono utilizando batería de carbohidratos como única fuente de carbono.	Cepa pura	Simple, económico, disponibilidad de protocolos estandarizados	Tiempo prolongado de incubación y asimilación	Alta/Alta
Neppelenbroek et al., 2014	Fermentación de carbohidratos	<i>Candida</i> spp.	Producción de ácido y/o dióxido de carbono en medio líquido	Cepa pura	Simple, económico	Laboriosas y retardadas, no muy confiable	Baja/Baja
Sistemas comerciales rápidos							
Freydiere et	API 20C	<i>Candida</i> spp.	Incubación a 30 °C (24,	Cepa pura	Rápida, tasa de	Actualmente no	85%/

al., 2001; Tortorano et al., 2000; Liguori et al. 2009.	(bioMerieux Vitek)		48, y 72 h), se observa la turbidez de las cúpulas generando un número de perfil		identificación superior al 85%, exacta en la diferenciación de especies	utilizado por problemas con la identificación de <i>C. krusei</i> , precisión en normalización y siembra del inóculo	Baja
Cardenes et al., 2004; Pincus et al., 2007; Seyfarth et al., 2011; Pasligh et al., 2010	ID 32C (bioMerieux)	63 especies de <i>Candida</i>	48-72 h de incubación. Identificación por comparación con base de datos	Cepa pura	Sistema de referencia en Europa, determina también la susceptibilidad a antifúngicos	Baja precisión en comparación con otros sistemas	88.5%/92%
Neppelenbroek et al., 2014	API <i>Candida</i> (bioMerieux)	15 especies de <i>Candida</i>	Detección de reacciones enzimáticas y acidificación de azúcares en 12 pruebas de 18-24 h con incubación de 35° C	Cepa pura	Rápida (18-24 h), cambios de color espontáneos sin utilizar reactivos, fácil manejo e interpretación	Requiere pruebas adicionales para su interpretación	75.2-97.4%/91.4%
Neppelenbroek et al., 2014	API yeast (Analytab products)	<i>Candida</i> spp.	Tira que contiene 20 cúpulas con sustratos deshidratados, se lee visualmente el cambio de color por acción de enzimas en los componentes cromogénicos	Cepa pura	Económica y rápida	Dificultades en la interpretación	55-60%/Baja
Neppelenbroek et al., 2014	Microring YT (MYT; Medical Wire & Equipment Co.)	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Examina la capacidad de crecer en discos de papel filtro impregnado de sustancias químicas, como bromuro de etidio	Cepa pura	Económica y rápida	Solo identifica levaduras comunes	Baja/Baja
Horvath et al., 2003; Bauters et al., 2002; Campanha et al., 2005; Gutierrez et al., 2002.	CHROMagar <i>Candida</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. krusei</i>	24-48 h de incubación a 35° C, coloración en colonias por acción de enzimas de cada especie	Muestras diversas	Medio selectivo y diferencial, detección de mezclas de especies, adición de fluconazol	Se pueden perder características después del subcultivo o almacenamiento a -70° C	Alta/Media
Bauters et al.,	Método de	<i>C. albicans</i> ,	Formación de micro	Cepa pura	Mejora	Algunas cepas no	96-100%/

2003	filtración por membrana fluorogénica	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i>	colonias en filtro de membrana de nylon y ensayo de actividad enzimática utilizando sustratos fluorogénicos	o mezcla	sensibilidad y velocidad	producen fluorescencia, difícil observación, equivo de fluorescencia	Media
Letscher-Bru et al., 2002; Willinger et al., 2001	<i>Candida</i> ID (bioMeriux)	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitanae</i> , <i>C. kefyr</i> y <i>C. guilliermondii</i>	Hidrólisis de sustrato cromogénico indolil glucosaminida	Muestra diversa	Más rápido que CHROMagar, identifica mezclas de levaduras	Insuficientemente selectiva, contaminación bacteriana, diversidad de colores	97.7%/ Media
Romney et al., 2000	Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur)	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitanae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. lipolytica</i> y <i>C. inconspicua</i>	Prueba bioquímica colorimétrica, asimilación de carbohidratos, resistencia a actidiona y actividad fenol-oxidasa con incubación a 30° C por 24-72 h.	Cepa pura	Identificación bioquímica y morfológica (formación de micelios), reduce la necesidad de pruebas adicionales	Contaminación bacteriana, tiempo de incubación	91.2-94%/ Media
Neppelenbroek et al., 2014	Baxter MicroScan yeast identification (Baxter)	<i>Candida</i> spp.	Placa de micro dilución con 27 sustratos deshidratados, con 13 aminoácidos, β-naftilamidas, 9 carbohidratos vinculado a nitrofenilos, carbohidratos, urea y indoxil fosfato	Cepa pura	Identifica en 4 h, placas fáciles de inocular y de leer	Identificación lenta por contaminación con otras levaduras	82-94%/ Baja
	Uni-Yeast-Tek (Flow Laboratories, Inc.)	<i>Candida</i> spp.	Asimilación de sustratos en agar y caldos, determinación de formación de hifas y blastoconidos en agar harina de maíz 80	Cepa pura	Identifica 16 tipos de levaduras, rapidez, inoculación de varias placas en poco tiempo	Nivel preciso de turbidez, requiere control de crecimiento de hasta seis días	99-99.8%/
	RapID yeast plus system (Innovative Diagnostic)	<i>Candida</i> spp.	Utiliza 18 sustratos cromogénicos	Cepa pura	Identifica levaduras importantes, emergentes y	Reacciones de color ambiguos, dificultad para diferenciar colores	95.2%/ 97.8%

	Systems)				organismos levaduriformes, no utiliza pruebas adicionales		
	Fungichrom I, Fungifast I (International Microbio)	<i>Candida</i> spp.	Sistema con 16 pozos y 10 cúpulas de prueba con cambios de color con incubación de 24-48 h a 30° C	Cepa pura	Simple y buena tasa de identificación	El Fungifast no es objetivo ni rápido como el Fungichrom	85%/-
	Agar Biggy (Oxoid Company)	<i>Candida</i> spp.	Se visualiza el cambio de color por reducción extracelular de sulfito de bismuto a sulfuro de bismuto	Cepa pura	Identificación de diversas especies de <i>Candida</i> , identificación visual	Rango limitado de color, problemas para la correcta identificación de especies	87-100%/ 75.2-100%
Enfoques basados en instrumentos especializados							
Posteraro et al., 2015; Neppelenbroek et al., 2014	Vitek YBC (bioMeriux Vitek)	<i>Candida</i> spp.	Tarjeta con 26 pruebas bioquímicas convencionales y cuatro controles negativos con incubación de 22-24 h, identificación con ordenador programado	Muestras de orina y diversas	Identifica 27 especies de levaduras medicamente importantes, rápido, inoculación automatizada, eliminación de variabilidad	Desarrollado para identificación de bacterias, umbrales de reacción no visualmente discernible, vida útil corta de YBC, limitación de la base de datos	83-98%/ 94.1%
Graf et al., 2000; Cardenes-Perera et al., 2004; Massonet et al., 2004	Vitek 2 ID-YST (bioMeriux Vitek)	<i>Candida</i> spp.	Sistema de pruebas bioquímicas de 64 pozos con 47 pruebas fluorescentes, con pruebas para asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos, determinación de oxidasas con 4-metilumbeliferona, arilamididasas, amino-metilcumarinas	Cepa pura	Fluorescencia sensible	Resultados poco confiables en cultivos de más de 24 h	87.6-92.1%/ Alta
Abbott Laboratories 1987	Abbott Quantum II (Abbott Laboratories)	Bacilos aerobios Gram (-) y levaduras	Consiste en un perforador con doble longitud de onda que mide los	Cepa pura	Útil para laboratorios no experimentados	Sistema de identificación lento y manual, con lleva	92%/ 73%

			cambios colorimétricos y 20 cámaras que contienen liofilizado de medios bioquímicos			identificaciones erróneas	
Neppelenbroek et al., 2014	Sistema de identificación microbiana (MIS, Microbial ID)	Bacterias, micobacterias y hongos (<i>C. krusei</i> , <i>C. kefyr</i> y <i>C. guilliermondii</i>)	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama	Cepa pura	Identifica levaduras no comunes	Identificaciones erróneas debido a inadecuada base de datos	Baja/ 68-75%
Biotipificación							
Ghannoum, 2000; Slifkin, 2000; Dostal et al., 2003; Kumar et al., 2006	Prueba de opacidad en Tween 80	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	Detección de actividad lipolítica (esterasas y fosfolipasas) visualizando cristales insolubles por el complejo de calcio (2-3 d) y opacidad (10 d)	Cepa pura	Excelente para la identificación de dos especies similares	Tiempo prolongado para la identificación	Alta/ Medio
Nuevas herramientas de diagnóstico no invasivas							
Ahmad et al., 2012; Held et al., 2013	(1,3)-β-d-glucano	<i>Candida</i> spp.	Circulación de antígenos en suero	Suero	Diagnóstico de candidiasis invasiva y candidemia	Falsos positivos	77%/ 77%
Mikulska et al., 2012; Wingard, 2012; Jarque et al., 2003	Galactomanano	<i>Candida</i> spp.	Circulación del polisacárido en sangre	Sangre	Puede combinarse con (1,3)-β-d-glucano para excluir o confirmar infecciones invasivas	Falsos positivos	66.6%/ 96.6%

No obstante, dada la variabilidad en las características fenotípicas y otras irregularidades en la taxonomía del género *Candida*, la identificación basada en métodos tradicionales ha sido menos confiable (Costa *et al.*, 2010).

Para superar las limitaciones de los métodos convencionales, se han desarrollado las técnicas moleculares para identificar de manera rápida y certera a *Candida* spp. Las principales ventajas de los métodos moleculares son su alta precisión, sensibilidad (bajas tasas de falsos positivos) y especificidad (baja tasa de falsos negativos) en la identificación de las especies de *Candida*. Otra ventaja importante de estos métodos es que no requieren el aislamiento del hongo, sino que la identificación del patógeno puede llevarse a cabo directamente en muestras clínicas, lo que le confiere potencial como herramienta diagnóstica.

En los últimos 10 años, se han propuesto varios procedimientos para la identificación molecular de *Candida* spp., basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus diferentes modalidades, como simplex, multiplex, anidada, semianidada y en tiempo real (Tabla 2).

La mayoría de estos ensayos de PCR tienen como blanco de amplificación (marcador molecular) las regiones del DNA que codifican para los genes ribosomales y sus espaciadores internos (DNAr-ITS), ya que estas regiones poseen secuencias tanto conservadas como variables a nivel interespecie, lo que permite la identificación a nivel de especie de *Candida*. Además, se estima que las levaduras poseen más de 150 copias de estos complejos génicos ribosomales a lo largo de todo su genoma, lo que confiere gran sensibilidad (Colom *et al.*, 2006; Xafranski *et al.*, 2013; Ledesma *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Tabla 2. Marcadores moleculares para la identificación de *Candida* spp. por PCR

Autores	Blanco de amplificación	Modalidad de PCR	Especificidad	Sensibilidad
Chang et al., 2001	ITS1-5.8SrRNA-ITS2	PCR multiplex	<i>Candida</i> spp.	4 pg
Ahmad et al., 2002	5.8S-ITS2-28S rDNA	PCR semianidada	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>	20 fg
Beggs et al., 2004	Gen 18S rRNA, <i>ACT1</i> , <i>Bcl1</i> , <i>SAP2</i> , <i>ADH1</i> y <i>ADH2</i>	RT-PCR	<i>C. albicans</i>	10 ng cDNA
Maaroufi et al., 2004	5.8S-28S rDNA	qPCR	<i>Candida</i> spp.	100 fg
Sampaio et al., 2005	Microsatelites CAI, CAIII Y CAVI	PCR multiplex	<i>C. albicans</i>	40 ng
Metwally et al., 2007	Gen 18S rRNA	qPCR	<i>C. albicans</i>	10 µg
Ospina et al., 2010	ITS2	PCR semianidada	<i>Candida</i> spp.	1 célula/200µL de plasma
Estrada-Barraza et al., 2011	ITS1 y ITS2 o gen de la Topoisomerasa II	PCR simplex	<i>C. krusei</i> y <i>C. glabrata</i>	10 ng
Wang et al., 2014	18S rRNA	qPCR	<i>Candida</i> sp.	10 ³ -10 ⁴ UFC/mL
Taira et al., 2014	ITS	PCR multiplex-anidada	<i>Candida</i> spp.	150 fg
Makene et al., 2014	ITS1-5.8S-ITS2 rDNA región y D1/D2 del 26S	PCR multiplex	<i>Candida</i> spp.	100 ng
Ataides et al., 2015	Gen SADH	PCR simplex	<i>C. parapsilosis</i> complex	-
Mohammadi et al., 2015	ITS (ITS1-5.8SrDNA-ITS2)	PCR simplex	<i>Candida</i> sp. (<i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>)	25 ng
	ITS + Msp I	PCR-RFLP	<i>Candida</i> sp. (<i>C. guilliermondii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i>)	250 ng
	Gen SADH + Nla III	PCR-RFLP	<i>C. parapsilosis</i> complex	250 ng
Than et al., 2015	Gen ICL clonado en plásmido pGEMT	qPCR	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. utilis</i>	10 ³ copias de DNA
Bineshian et al., 2015	Gen MP65 de ratones BALB/C	qPCR	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	50 células
	Gen MP65 de ratones BALB/C	RT-PCR	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i>	1 µg
Merseguel et al.,	ITS(ITS1-ITS2-5.8SrDNA)	PCR simplex	<i>C. albicans</i>	40 ng

2015				
García-Salazar, 2016	ITS1-5.8S-ITS2 Rdna	Simplex	<i>C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. guilliermondii, C. lusitaniae, C. famata, C. dubliniensis, C. pseudotropicalis, C. zeylanoides</i> y <i>C. lipolytica</i>	10 pg
OTROS MARCADORES MOLECULARES				
Relloso et al., 2015	Proteínas	MALDI-TOF	<i>Candida</i> spp.	10 ⁴ UFC/mL
Spanu et al., 2012	Proteínas	MALDI-TOF	<i>C. albicans, C. famata, C. glabrata, C. guilliermondii, C. krusei, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. tropicalis</i>	10 ² UFC

ITS: Espaciador Transcrito Interno; cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario; rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribosomal; rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal; ACT: Actina; BCl: linfoma de células B; SAP: Proteína Secretora de Aspartato; ADH: Alcohol Deshidrogenasa; RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; PCR-RFLP: Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción; SADH: Alcohol Deshidrogenasa Secundario; ICL: Isocitrato Liasa; MALDI-TOF: Desorción-ionización mediante laser asistida por matriz acoplada a analizador TOF.

Otros métodos moleculares desarrollados para la identificación de *Candida* spp., son la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas de oligonucleótidos marcados con fluoresceína (PNA-FISH) (Alexander y Pfaller, 2006) y la ionización suave en espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz, acoplada a un analizador TOF), este último, ofrece resultados en tiempos considerablemente más cortos que la PCR y la identificación puede ser mucho más precisa, gracias a la existencia de una gran base de datos de los espectros proteínas de más de 110 especies de levaduras diferentes (Spanu *et al.*, 2012); sin embargo, el costo de su implementación es elevado.

No obstante que los métodos moleculares han demostrado mayor especificidad y sensibilidad en la detección e identificación de *Candida* spp., los procedimientos técnicos no han sido normalizados ampliamente, lo que ha limitado su uso en el diagnóstico de laboratorio. Los métodos basados en la PCR han sido los más estudiados; sin embargo, otra limitante importante en su uso confiable es que se ha reportado variabilidad genética entre los aislados de *Candida*, asociada a su origen geográfico, por lo que es deseable que los blancos de amplificación sean elegidos tomando en cuenta esta variabilidad para garantizar su especificidad. Al respecto, García-Salazar (2016) diseñó un par de oligonucleótidos (Caspp-F y Caspp-R) a partir de aislados autóctonos, los cuales amplifican por PCR simplex, marcadores moleculares específicos de las 12 especies de *Candida* más frecuentes (Tabla 2). Sin embargo, antes de utilizarse en el diagnóstico, se debe evaluar su especificidad y sensibilidad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los marcadores moleculares Caspp en la identificación de aislados clínicos de *Candida* spp., mediante PCR simplex.

Objetivos particulares

1. Extraer el DNA de 105 aislados clínicos de *Candida* spp., previamente identificados por métodos fenotípicos y de ocho cepas de referencia.
2. Cuantificar el DNA obtenido de cada uno de los aislados clínicos y cepas de *Candida* spp.
3. Identificar por PCR simplex los aislados clínicos de *Candida* spp. utilizando los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R.
4. Purificar y secuenciar los amplicones obtenidos de aquellos aislados en los que no hubo concordancia entre los resultados moleculares y fenotípicos.
5. Secuenciar los amplicones purificados y comparar las secuencias con todas las secuencias de la base de datos del GenBank.
6. Evaluar la sensibilidad de los marcadores moleculares Caspp.

METODOLOGÍA

Aislados clínicos

Se trabajaron 105 aislados clínicos de *Candida*, previamente fenotipificados y donados por diferentes instituciones de la Ciudad de México. Los 105 aislados clínicos correspondían a las especies: *C. albicans* (36), *C. glabrata* (28), *C. parapsilosis* (12), *C. tropicalis* (7), *C. krusei* (2), *C. guilliermondii* (1), y 19 aislados no identificados (*Candida* sp.). Se incluyeron, como controles positivos, ocho cepas de referencia, correspondientes a las especies de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. albicans* (Tabla 3).

Tabla 3. Aislados clínicos de *Candida* spp.

No. registro	Especie	Origen	Fuente
22019	<i>C. parapsilosis</i>	Desconocido	ATCC
750	<i>C. tropicalis</i>	Cultivo de expectoración	ATCC
6260	<i>C. guilliermondii</i>	Cultivo de expectoración	ATCC
634449	<i>C. lusitaniae</i>	Cultivo de piel de cerdo	ATCC

MYA-646	<i>C. dubliniensis</i>	Cultivo de cavidad oral	ATCC
2001	<i>C. glabrata</i>	Coprocultivo	ATCC
6258	<i>C. krusei</i>	Cultivo de expectoración	ATCC
38	<i>C. albicans</i>	Cultivo de biopsia de piel	ATCC
5	<i>C. albicans</i>	Cultivo vaginal	HRGIZ-ISSSTE
7	<i>Candida</i> sp.	Cultivo vaginal	HJM-SSA
8	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
10	<i>C. glabrata</i>	Desconocido	FM-UNAM
12	<i>C. tropicalis</i>	Desconocido	FM-UNAM
13	<i>C. albicans</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
14	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
15	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
16	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
17	<i>C. albicans</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
18	<i>C. tropicalis</i>	Desconocido	FM-UNAM
19	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
20	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de herida	HJM-SSA
22	<i>Candida</i> sp.	Hemocultivo	HJM-SSA
25	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
27	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
30	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
31	<i>C. albicans</i>	Desconocido	FM-UNAM
32	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
34	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HJM-SSA
39	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
42	<i>C. parapsilosis</i>	Desconocido	FM-UNAM
45	<i>C. glabrata</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
46	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
47	<i>C. albicans</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
48	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
49	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
50	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA

51	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
59	<i>C. glabrata</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
62	<i>C. guilliermondii</i>	Desconocido	FM-UNAM
68	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de biopsia	HRGIZ-ISSSTE
72	<i>Candida</i> sp.	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
73	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de secreción de herida	HRGIZ-ISSSTE
74	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de lavado de cavidad	HJM-SSA
75	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de Pen Rose	HJM-SSA
76	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HJM-SSA
77	<i>Candida</i> sp.	Hemocultivo	HJM-SSA
79	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HJM-SSA
80	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ-ISSSTE
81	<i>Candida</i> sp.	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
82	<i>C. albicans</i>	Cultivo de Pen Rose	HRGIZ-ISSSTE
83	<i>Candida</i> sp.	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
84	<i>C. tropicalis</i>	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
85	<i>Candida</i> sp.	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
86	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ-ISSSTE
87	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de expectoración	HRGIZ-ISSSTE
88	<i>C. parapsilosis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
89	<i>C. parapsilosis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
90	<i>C. albicans</i>	Cultivo de biopsia	HRGIZ-ISSSTE
91	<i>C. parapsilosis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
93	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
94	<i>C. albicans</i>	Cultivo de abscesos	HRGIZ-ISSSTE
95	<i>C. albicans</i>	Cultivo de abseso	HRGIZ-ISSSTE
96	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
97	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
98	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HJM-SSA
99	<i>C. glabrata</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
100	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
101	<i>C. tropicalis</i>	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE

103	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
104	<i>C. albicans</i>	Cultivo de abscesos	HRGIZ-ISSSTE
105	<i>C. albicans</i>	Cultivo de secreción de herida	HRGIZ-ISSSTE
106	<i>C. glabrata</i>	Cultivo de biopsia	HRGIZ-ISSSTE
107	<i>C. glabrata</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
108	<i>C. albicans</i>	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ-ISSSTE
109	<i>C. albicans</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
110	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
111	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de líquidos	HRGIZ-ISSSTE
112	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo de puntas de catéter	HRGIZ-ISSSTE
113	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo de expectoración	HRGIZ-ISSSTE
114	<i>C. krusei</i>	Cultivo de biopsia	HRGIZ-ISSSTE
115	<i>C. albicans</i>	Espermocultivo	HRGIZ-ISSSTE
116	<i>Candida</i> sp.	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
117	<i>C. albicans</i>	Cultivo de líquidos	HRGIZ-ISSSTE
118	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo de diálisis peritoneal	HRGIZ-ISSSTE
119	<i>C. parapsilosis</i>	Cultivo de abscesos	HRGIZ-ISSSTE
120	<i>C. parapsilosis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
121	<i>C. krusei</i>	Cultivo de biopsia	HRGIZ-ISSSTE
122	<i>C. parapsilosis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
123	<i>C. albicans</i>	Cultivo de aspirado bronquial	HRGIZ-ISSSTE
124	<i>C. albicans</i>	Cultivo de secreción de herida	HRGIZ-ISSSTE
125	<i>C. albicans</i>	Cultivo de cánula orotraqueal	HRGIZ-ISSSTE
126	<i>C. albicans</i>	Cultivo de expectoración	HRGIZ-ISSSTE
127	<i>C. albicans</i>	Cultivo de drenaje perianal	HRGIZ-ISSSTE
128	<i>C. albicans</i>	Cultivo de cánula orotraqueal	HRGIZ-ISSSTE
130	<i>C. albicans</i>	Cultivo de secreción de herida	HJM-SSA
131	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
132	<i>C. glabrata</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
133	<i>C. glabrata</i>	Hemocultivo	HRGIZ-ISSSTE
134	<i>C. albicans</i>	Cultivo de secreción de herida	HRGIZ-ISSSTE
137	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de expectoración	HRGIZ-ISSSTE

138	<i>Candida</i> sp.	Cultivo orotraqueal	HRGIZ-ISSSTE
140	<i>C. glabrata</i>	Espermocultivo	HRGIZ-ISSSTE
141	<i>C. albicans</i>	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
142	<i>C. albicans</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
144	<i>C. albicans</i>	Cultivo vaginal	HJM-SSA
145	<i>Candida</i> sp.	Cultivo faríngeo	HJM-SSA
147	<i>C. glabrata</i>	Cultivo de abscesos	HRGIZ-ISSSTE
148	<i>Candida</i> sp.	Cultivo de secreción de herida	HRGIZ-ISSSTE
150	<i>C. tropicalis</i>	Urocultivo	HRGIZ-ISSSTE
154	<i>C. albicans</i>	Cultivo de absceso cutáneo	HMGG-SSA
159	<i>C. glabrata</i>	Cultivo de absceso cutáneo	HMGG-SSA
233	<i>C. glabrata</i>	Urocultivo	HMGG-SSA
234	<i>C. glabrata</i>	Urocultivo	HMGG-SSA

ATCC: American Type Culture Collection; HRGIZ-ISSSTE: Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, Instituto de Seguridad y Servicio Social de Trabajadores del Estado; HJM-SSA: Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud; FM-UNAM: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; HMGG-SSA: Hospital Dr. Manuel Gea González, Secretaría de Salud

Cultivo y conservación de los cultivos de *Candida* spp.

A partir de una colonia aislada del primocultivo, se realizó una resiembra en agar dextrosa Sabouraud y se incubó a 28° C por 24 h. Las levaduras se conservaron en tubos de plástico de 2 mL, conteniendo 500 µL de solución salina isotónica (SSI) estéril y se almacenaron a temperatura ambiente.

Extracción de DNA

A partir de los cultivos en agar dextrosa Sabouraud (Bioxón, MX), se tomó una colonia aislada y se inoculó en tubos de ensayo de 16 x 150 mm que contenían 3 mL de medio YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 2%). Los cultivos se incubaron a 28° C por 24 h, con agitación orbital a 100 rpm. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante, las levaduras se lavaron con 500 µL de SSI estéril y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El lavado se realizó dos veces. Posteriormente, siguiendo el procedimiento del kit comercial Yeast DNA

Preparation (Jena Bioscience GmbH, GE), se agregaron 300 μL de la solución de resuspensión celular y 1 μL de liticasa (2.5 U/ μL), se mezcló por inversión 25 veces y se incubó a 37° C por 1 h. Después del periodo de incubación, se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 300 μL de solución de lisis celular, se añadieron 100 μL de solución de precipitación de proteínas, se agitó vigorosamente durante 20 s y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se colocó en un tubo de plástico limpio, de 1.5 mL, conteniendo 300 μL de isopropanol grado biología molecular, se agitó por inversión 50 veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante y el tubo con el sedimento de DNA se colocó sobre papel absorbente para eliminar los restos de alcohol. Se añadieron 500 μL de amortiguador de lavado y se mezcló por inversión varias veces para lavar el DNA. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min, descartando el sobrenadante y se dejó secar al aire a temperatura ambiente durante 15 min. Al sedimento de DNA se añadieron 50 μL de agua desionizada (Milli-Q[®], Merk Millipore Corporation, USA) y 1.5 μL de solución de RNAsa A (4 mg/mL), se incubó a 37° C por 30 min y posteriormente a 65° C por 1 h, para hidratar el DNA. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280 nm (DS 11 Spectrophotometer, DeNovix Inc., USA), y se hicieron diluciones para obtener una concentración final de 10 ng/ μL . Todas las muestras de DNA se conservaron a -20° C.

Identificación molecular de los aislados clínicos de *Candida* spp.

La amplificación de los marcadores Caspp se llevó a cabo con los oligonucleótidos Caspp-F (5'- AGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCC-3') y Caspp-R (5'- TTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCC-3'), de acuerdo con lo descrito por García-Salazar (2016). La mezcla de reacción consistió, en 10 ng de DNA de cada aislado o cepa de referencia, 50 μM de dNTP's (Jena Bioscience), 1.5 mM de MgCl_2 , 50 pmol de cada oligonucleótido (Caspp-F y Caspp-R) (Sigma-Aldrich, USA) y 1U de *Taq* DNA Polimerasa (Jena Bioscience), en amortiguador de PCR 1X y en un volumen final de 25 μL . Como controles positivos se utilizaron 10 ng de DNA de las cepas de referencia de *Candida* spp., y como control negativo se

utilizó agua desionizada (Milli-Q). El programa de amplificación fue: 1 ciclo de 3 min a 94° C; 33 ciclos de 30 s a 95° C, 30 s a 71° C, 1 min a 72° C y una extensión final de 5 min a 72° C. Al término de la reacción, 5 µL de los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, ES) al 1.5%, teñido con GelRed™ 3X (Biotium, USA) en amortiguador TBE 0.5X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8.3) a 70 v. El marcador de tamaño molecular utilizado fue el 100 pb DNA Ladder (Jena Bioscience). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Purificación de los amplicones

Los fragmentos amplificados que no correspondieron al tamaño esperado, de acuerdo con la especie identificada fenotípicamente, fueron purificados usando el Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience GmbH) y 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 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 µL 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.

Secuenciación de los amplicones y comparación de las secuencias en el Genbank

Los fragmentos de DNA purificados fueron enviados a secuenciar, en ambos sentidos con los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R, al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad-Cinvestav (Irapuato, Guanajuato, MX).

Los electroferogramas correspondientes a 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 que mostraron incongruencia entre la caracterización fenotípica y molecular.

Evaluación de la sensibilidad de los marcadores Caspp

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectada por PCR con los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R, se eligió un DNA de cada especie de *Candida* estudiada, se cuantificó por espectrofotometría a las longitudes de onda 260 y 280 nm y posteriormente se hicieron diluciones para obtener las concentraciones de 10 ng/ μ L hasta 1 ag/ μ L. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en agarosa al 1.5%, como se describió anteriormente.

RESULTADOS

Extracción de DNA

De acuerdo con el análisis espectrofotométrico, la cantidad e integridad de los DNAs obtenidos de los 105 aislados clínicos y cepas de referencia de *Candida* spp., fue adecuada para los ensayos de PCR. Las concentraciones estuvieron en el rango de 5.8 y 436.1 ng/μL, con valores de la relación de absorbancia a 260 y 280 nm entre 1.52 – 2.49, lo que indicó que la pureza de las muestras de DNA era adecuada (Tabla 4). Los DNAs se diluyeron a 10 ng/μL con agua desionizada, para los posteriores ensayos de PCR.

Tabla 4. Cuantificación, por espectrofotometría, del DNA de los aislamientos clínicos y cepas de referencia de *Candida* spp.

No. registro	Especie	Concentración de DNA (ng/μL)	A260/A280
22019	<i>C. parapsilosis</i>	10.0	1.97
750	<i>C. tropicalis</i>	10.0	2.02
6260	<i>C. guilliermondii</i>	10.0	2.18
634449	<i>C. lusitaniae</i>	10.0	1.89
MYA-646	<i>C. dubliniensis</i>	10.0	1.97
2001	<i>C. glabrata</i>	10.0	1.98
6258	<i>C. krusei</i>	10.0	1.98
38	<i>C. albicans</i>	53.3	2.20
5	<i>C. albicans</i>	53.3	1.68
7	<i>Candida</i> sp.	32.2	1.84
8	<i>C. glabrata</i>	99.0	1.72
10	<i>C. glabrata</i>	141.8	2.11
12	<i>C. tropicalis</i>	124.6	2.07
13	<i>C. albicans</i>	46.8	1.8
14	<i>C. glabrata</i>	20.2	1.55
15	<i>C. glabrata</i>	14.5	1.80
16	<i>C. glabrata</i>	32.3	2.17
17	<i>C. albicans</i>	60.7	1.69

18	<i>C. tropicalis</i>	392.4	2.39
19	<i>C. glabrata</i>	80.8	2.11
20	<i>Candida</i> sp.	37.5	2.37
22	<i>Candida</i> sp.	24.9	1.52
25	<i>C. glabrata</i>	18.4	1.64
27	<i>C. glabrata</i>	186.6	1.92
30	<i>C. glabrata</i>	62.9	2.22
31	<i>C. albicans</i>	102.8	1.81
32	<i>C. glabrata</i>	62.1	1.72
34	<i>C. albicans</i>	22.1	1.67
39	<i>C. glabrata</i>	95.1	2.2
42	<i>C. parapsilosis</i>	112.6	2.0
45	<i>C. glabrata</i>	74.8	1.94
46	<i>C. glabrata</i>	266.1	1.75
47	<i>C. albicans</i>	8.0	1.80
48	<i>C. glabrata</i>	24.3	1.61
49	<i>C. glabrata</i>	66.0	1.89
50	<i>C. glabrata</i>	36.9	1.95
51	<i>C. glabrata</i>	155.4	2.14
59	<i>C. glabrata</i>	72.5	2.08
62	<i>C. guilliermondii</i>	177.8	2.36
68	<i>Candida</i> sp.	17.2	1.56
72	<i>Candida</i> sp.	32.4	1.82
73	<i>Candida</i> sp.	29.7	1.77
74	<i>Candida</i> sp.	53.4	2.03
75	<i>Candida</i> sp.	186.8	1.94
76	<i>C. albicans</i>	18.9	1.68
77	<i>Candida</i> sp.	30.8	1.92
79	<i>C. albicans</i>	68.6	2.31
80	<i>C. parapsilosis</i>	16.9	1.52
81	<i>Candida</i> sp.	44.1	1.75
82	<i>C. albicans</i>	9.4	2.36

83	<i>Candida</i> sp.	61.2	1.62
84	<i>C. tropicalis</i>	107.1	2.05
85	<i>Candida</i> sp.	79.3	1.92
86	<i>C. parapsilosis</i>	31.7	1.66
87	<i>Candida</i> sp.	6.8	1.54
88	<i>C. parapsilosis</i>	31.5	1.93
89	<i>C. parapsilosis</i>	67.9	1.98
90	<i>C. albicans</i>	5.8	1.61
91	<i>C. parapsilosis</i>	237.8	2.24
93	<i>C. tropicalis</i>	436.1	2.49
94	<i>C. albicans</i>	302.9	2.32
95	<i>C. albicans</i>	16.9	1.61
96	<i>C. albicans</i>	14.2	1.58
97	<i>C. albicans</i>	18.5	1.62
98	<i>C. albicans</i>	8.6	1.64
99	<i>C. glabrata</i>	8.4	1.57
100	<i>C. albicans</i>	19.8	1.76
101	<i>C. tropicalis</i>	44.7	1.81
103	<i>C. albicans</i>	5.8	1.59
104	<i>C. albicans</i>	13.4	1.92
105	<i>C. albicans</i>	13.4	1.91
106	<i>C. glabrata</i>	13.1	1.87
107	<i>C. glabrata</i>	25.1	1.91
108	<i>C. albicans</i>	13.6	1.93
109	<i>C. albicans</i>	17.5	1.97
110	<i>C. albicans</i>	17.7	1.86
111	<i>Candida</i> sp.	521.8	2.31
112	<i>C. parapsilosis</i>	99.1	2.08
113	<i>C. parapsilosis</i>	35.1	1.74
114	<i>C. krusei</i>	384.2	2.37
115	<i>C. albicans</i>	157.5	2.23
116	<i>Candida</i> sp.	50.5	1.98

117	<i>C. albicans</i>	26.9	1.71
118	<i>C. parapsilosis</i>	67.0	1.54
119	<i>C. parapsilosis</i>	19.2	1.87
120	<i>C. parapsilosis</i>	70.6	1.65
121	<i>C. krusei</i>	81.9	1.83
122	<i>C. parapsilosis</i>	45.7	1.67
123	<i>C. albicans</i>	30.9	1.84
124	<i>C. albicans</i>	174.2	2.21
125	<i>C. albicans</i>	34.3	1.60
126	<i>C. albicans</i>	7.5	1.57
127	<i>C. albicans</i>	12.8	1.83
128	<i>C. albicans</i>	108.2	2.01
130	<i>C. albicans</i>	18.2	1.8
131	<i>C. tropicalis</i>	53.5	2.14
132	<i>C. glabrata</i>	137.3	1.97
133	<i>C. glabrata</i>	15.45	1.7
134	<i>C. albicans</i>	9.45	1.62
137	<i>Candida</i> sp.	19.6	2.4
138	<i>Candida</i> sp.	13.2	1.51
140	<i>C. glabrata</i>	18.3	1.63
141	<i>C. albicans</i>	16.4	1.61
142	<i>C. albicans</i>	12.0	1.11
144	<i>C. albicans</i>	9.4	1.33
145	<i>Candida</i> sp.	36.3	1.27
147	<i>C. glabrata</i>	69.2	1.83
148	<i>Candida</i> sp.	24.5	1.59
150	<i>C. tropicalis</i>	126.8	2.05
154	<i>C. albicans</i>	20.6	1.56
159	<i>C. glabrata</i>	61.9	1.72
233	<i>C. glabrata</i>	10.0	2.43
234	<i>C. glabrata</i>	10.0	1.76

260/A280: Relación de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm

Identificación de los aislados de *Candida* spp. mediante la amplificación de los marcadores Caspp

Inicialmente, se amplificaron los DNAs de las ocho cepas de referencia con los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R, con la finalidad de corroborar que los marcadores moleculares Caspp esperados fueran amplificados, de acuerdo con lo descrito por García-Salazar (2016). Como se puede observar en la figura 1, cada especie de *Candida* estudiada, mostró el amplicón del tamaño correspondiente: *C. albicans* 850 pb, *C. glabrata* 1000 pb, *C. tropicalis* 790 pb, *C. parapsilosis* 731 pb, *C. krusei* 800 pb, *C. guilliermondii* 1100, *C. lusitaniae* 590 pb, *C. dubliniensis* 810 pb.

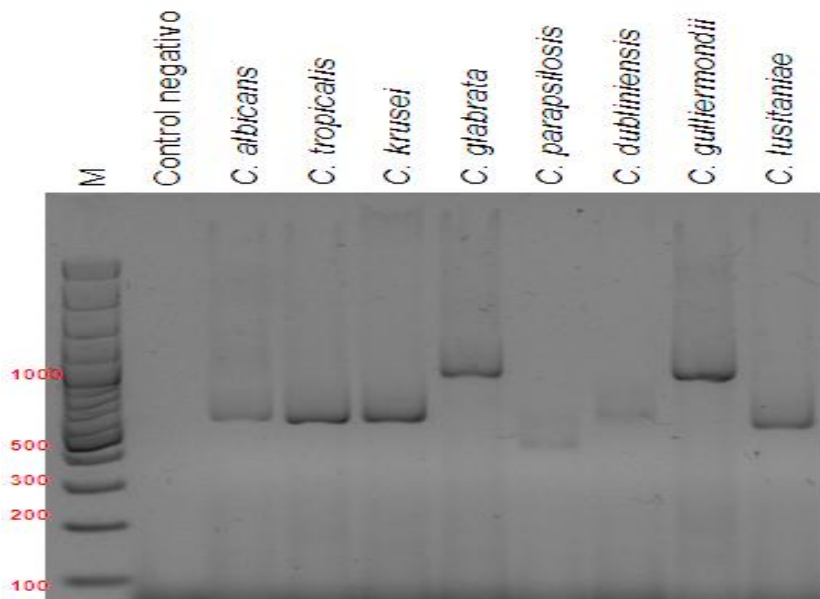


Figura 1. Amplificación de los marcadores Caspp a partir del DNA de ocho cepas de referencia de *Candida*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

Después de corroborar la amplificación de los marcadores Caspp en los DNAs de las cepas de referencia, se amplificaron los DNAs de los 105 aislados clínicos de *Candida* spp.

Cuando se amplificaron los 36 aislados de *C. albicans*, observamos que 28 aislados presentaron el amplicón del tamaño esperado de 850 pb, mientras que

tres de los aislados (13, 17 y 34) presentaron dos amplicones, el de 850 pb y otro de mayor tamaño, y cinco aislados amplificaron un fragmento mayor (1000 pb), el cual es más compatible con *C. glabrata* que con *C. albicans* (Figura 2).

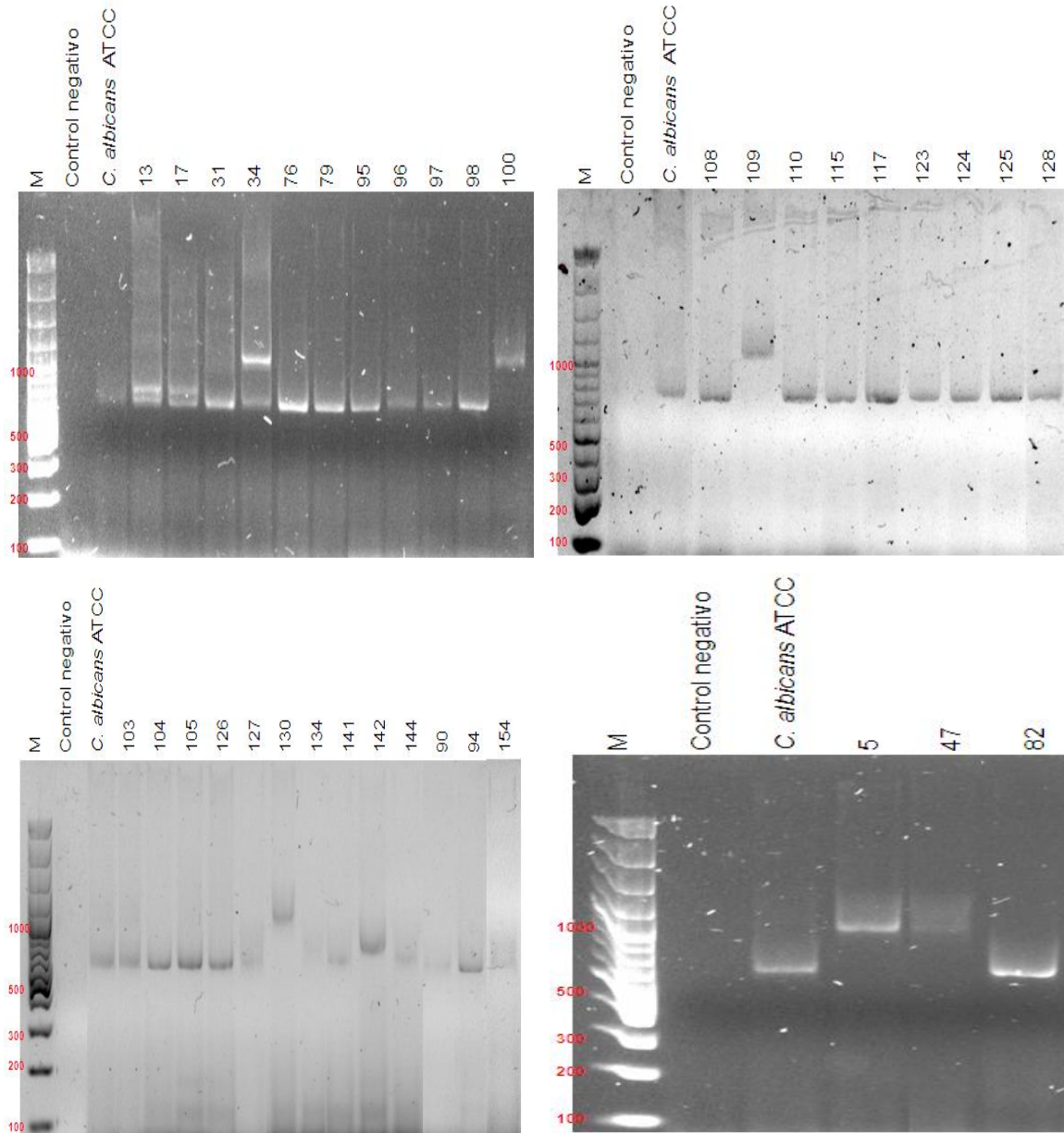


Figura 2. Amplificación de marcadores Casp a partir del DNA de 36 aislados clínicos fenotipificados como *Candida albicans*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

La amplificación del DNA de los 28 aislados clínicos de *C. glabrata* mostró el amplicón correspondiente de 1000 pb en 25 aislados, mientras que en tres

aislados (27, 51 y 107) el amplicón obtenido fue de menor tamaño, es decir que no correspondía a *C. glabrata* (Figura 3).

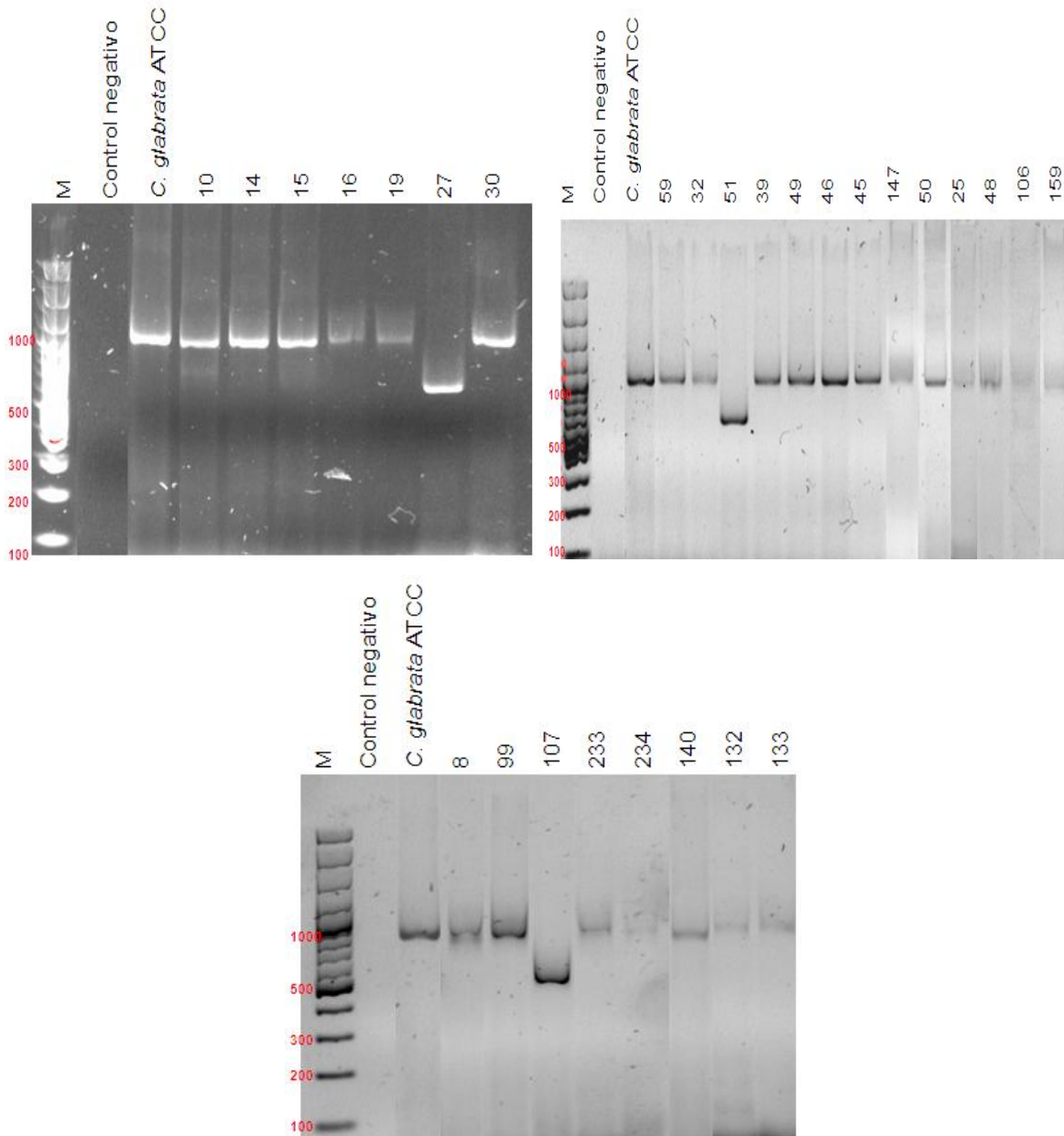


Figura 3. Amplificación de marcadores Casp a partir del DNA de 28 aislados clínicos fenotipificados como *Candida glabrata*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

De los 12 aislados clínicos de *C. parapsilosis*, 11 amplificaron el amplicón de 731 pb y solamente un aislado (42) mostró un producto de amplificación de aproximadamente 500 pb (Figura 4).

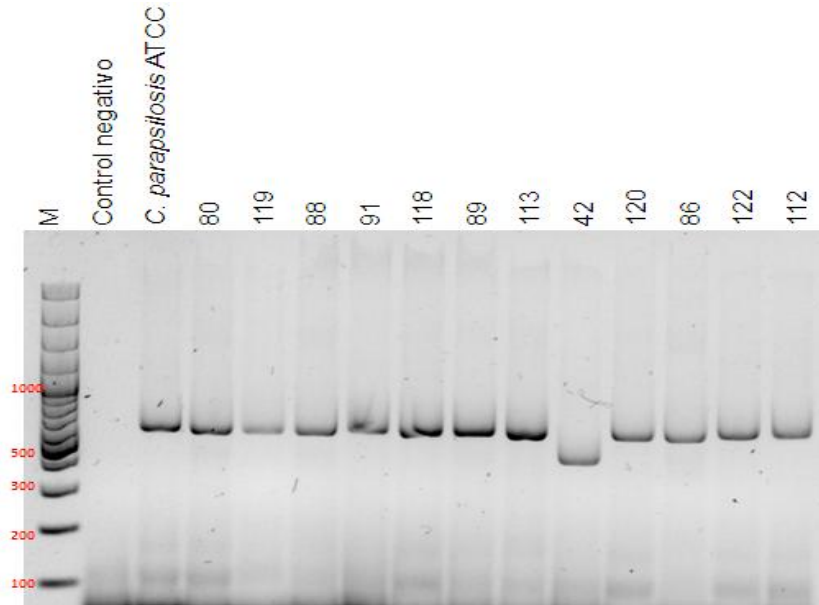


Figura 4. Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de doce aislados clínicos fenotipificados como *Candida parapsilosis*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

Los siete aislados clínicos de *C. tropicalis*, amplificaron los amplicones específicos de 790 pb (Figura 5).

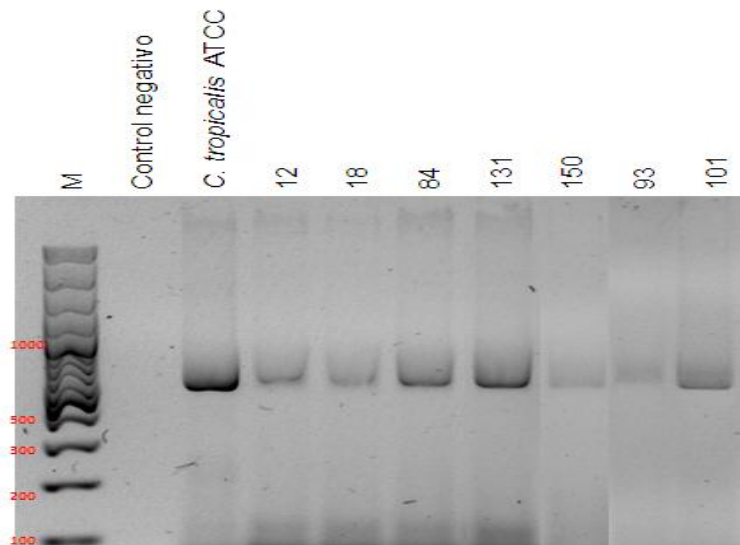


Figura 5. Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de siete aislados clínicos fenotipificados como *Candida tropicalis*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

El único aislado estudiado de *C. guilliermondii*, amplificó un fragmento de aproximadamente 700 pb, el cual no correspondió a la especie indicada con base en su fenotipo (Figura 6).

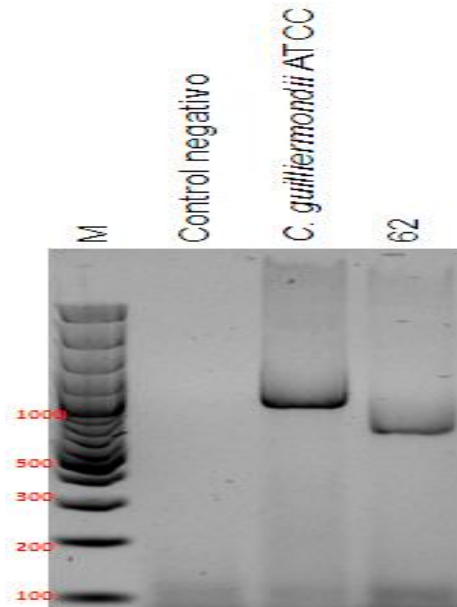


Figura 6. Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de un aislado clínico fenotipificado como *Candida guilliermondii*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

Los dos aislados clínicos de *C. krusei*, amplificaron los amplicones específicos de 800 pb (Figura 7).

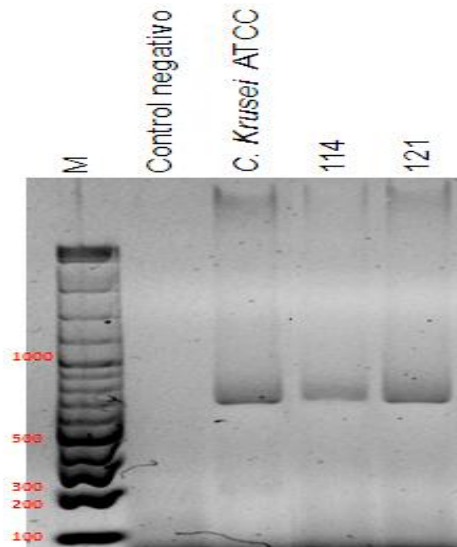


Figura 7. Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de dos aislados clínicos fenotipificados como *Candida krusei*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

Finalmente, cuando se amplificó el DNA de los 19 aislados de *Candida* sp., siete (7, 20, 22, 72, 73, 74 y 75) amplificaron un fragmento de aproximadamente 1000 pb, compatible con *C. glabrata*. Los doce aislados (68, 77, 81, 83, 85, 87, 111, 116, 137, 138, 145 y 148) restantes mostraron un amplicón de aproximadamente 850 pb, relacionado con *C. albicans*.

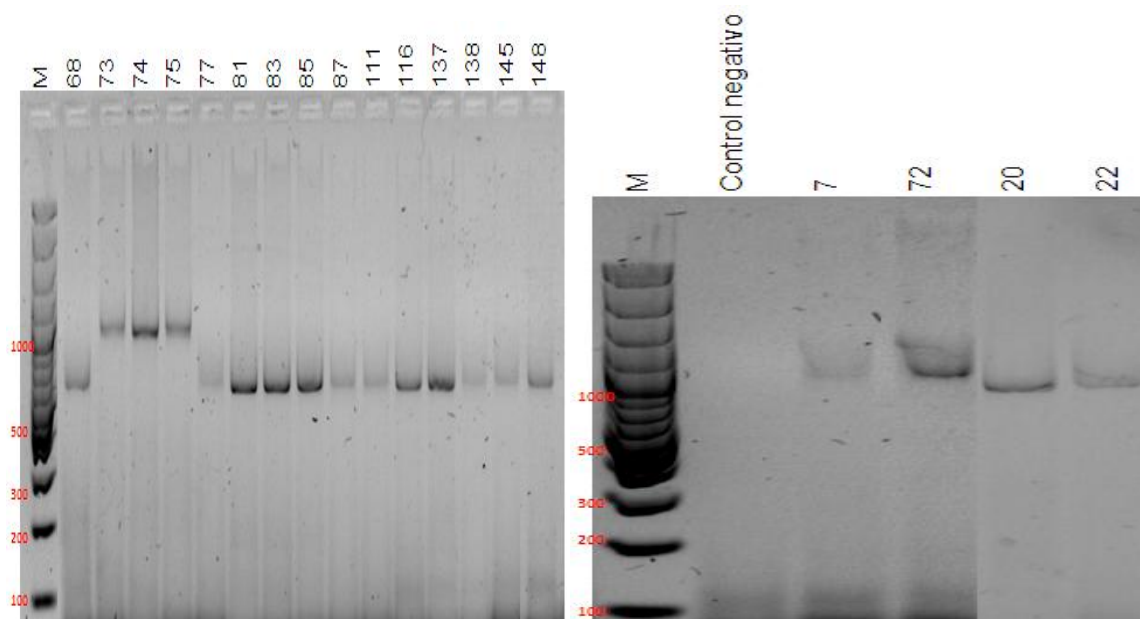


Figura 8. Amplificación de marcadores Caspp a partir del DNA de 20 aislados clínicos de *Candida* sp. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

Purificación de los amplicones

Los amplicones de los aislados en los que los resultados de la PCR no concordaron con la identificación fenotípica, así como los amplicones correspondientes a las ocho cepas de referencia y aislados no fenotipificados (*Candida* sp.) fueron purificados a partir del gel de agarosa y cuantificados, como se describe en la metodología. Los fragmentos purificados se obtuvieron en concentraciones de 40.5 a 76.3 ng/ μ L y con una pureza e integridad adecuadas (A260/A280 entre 1.7-2.0 y A260/A230 de 2.0) para su secuenciación (Figura 9).

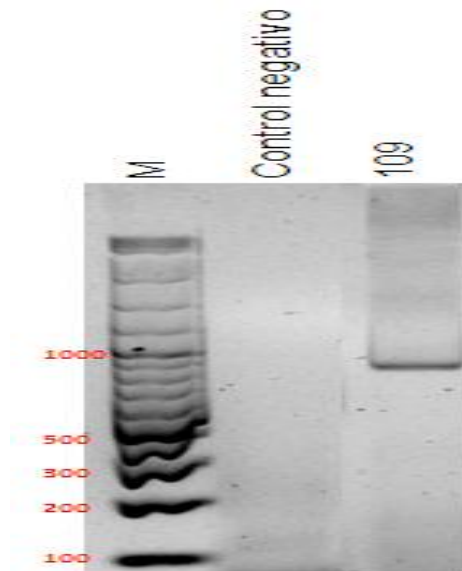


Figura 9. Purificación de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R, obtenido del aislado clínico 109 de *Candida albicans*. M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los números en rojo indican el tamaño molecular de los fragmentos de DNA.

Secuenciación de los amplicones y comparación de las secuencias en el GenBank

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

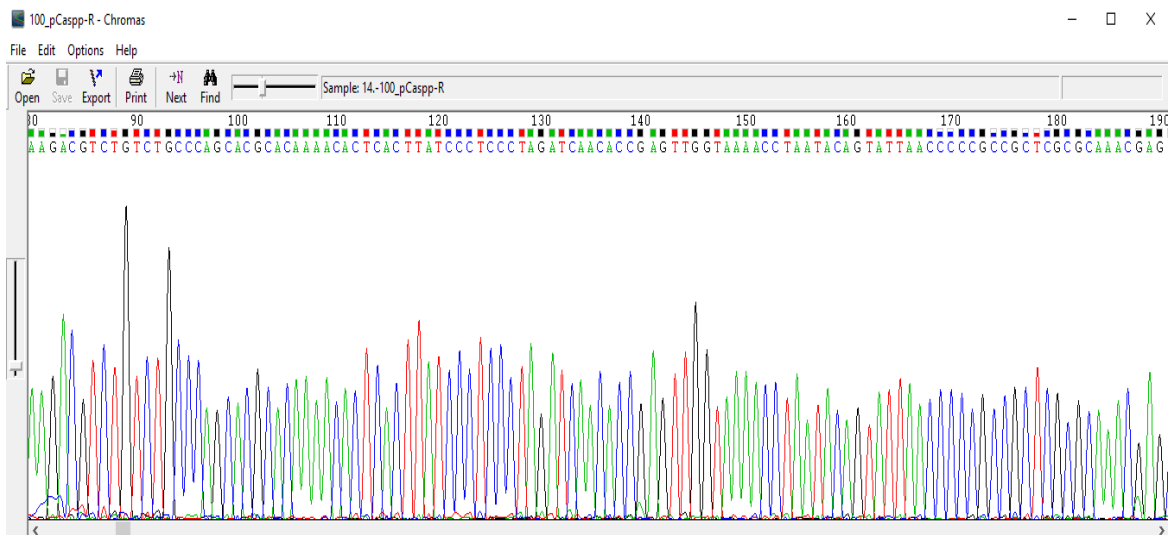


Figura 10. Electroferograma de la secuencia del amplicón de 1,086 pb, generado a partir del aislado clínico 100 de *Candida albicans*. La secuencia se obtuvo con el oligonucleótido Caspp-R.

El alineamiento de las secuencias de las cepas de referencia y los aislados de *Candida* spp. con las secuencias depositadas en el GenBank, mostró parámetros de similitud con secuencias parciales del gen 18S del RNA ribosomal (ITS1, 5.8S, ITS2), correspondientes a diferentes especies de *Candida* con una cobertura del 38-95%, valores de expectación cercanos a cero, y valores de identidad de 85-99%, con lo que la identidad de las cepas de referencia se corroboró y así mismo se determinó la de los aislados que presentaron amplicones incongruentes con la especie determinada fenotípicamente (Figura 11) (Tabla 5).

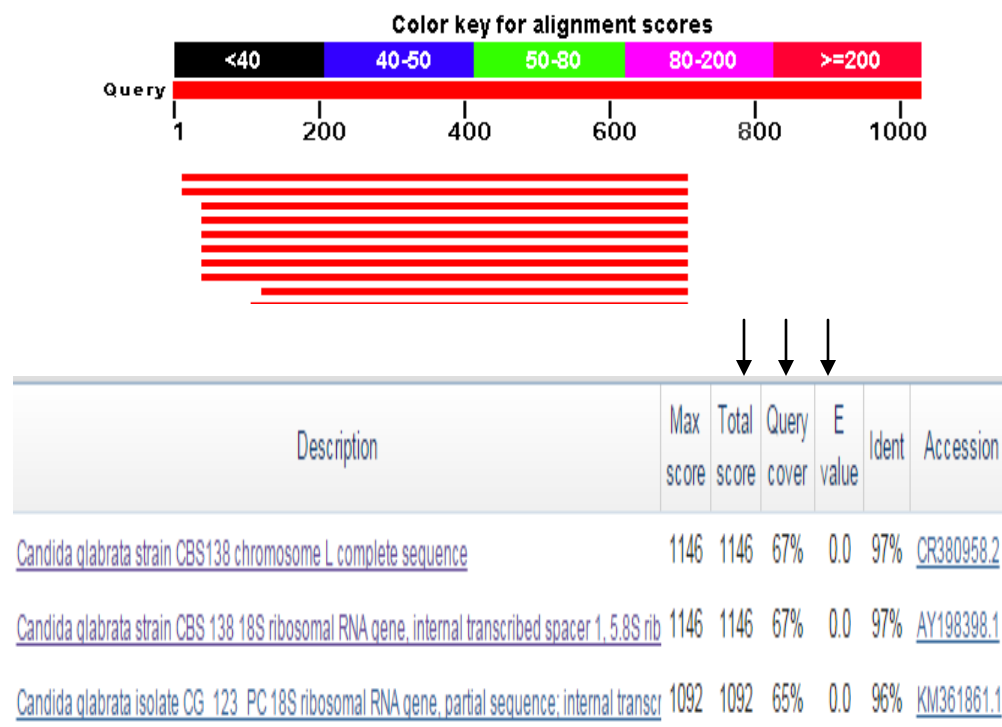


Figura 11. Alineamiento de la secuencia del aislado 100 con todas las depositadas en el GenBank. En el alineamiento se observa la cobertura, valor de expectación e identidad de la secuencia analizada.

Tabla 5. Identificación de las ocho cepas de referencia y 105 aislados clínicos de *Candida* spp., por métodos fenotípicos, PCR simplex y secuenciación

No. referencia	Especie por método fenotípico	Especie por PCR simplex	Especie por secuenciación
22019	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
750	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
6260	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
634449	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
MYA-646	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
2001	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
6258	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
38	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
5	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
7	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
8	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
12	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS
13	<i>C. albicans</i>	NI	<i>C. albicans</i>
14	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
15	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
16	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
17	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
18	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS
19	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
20	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
22	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
25	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
27	<i>C. glabrata</i>	NI	<i>C. glabrata</i>
30	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
31	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
32	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
34	<i>C. albicans</i>	NI	<i>C. albicans</i>

39	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
42	<i>C. parapsilosis</i>	NI	<i>C. parapsilosis</i>
45	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
46	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
47	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
48	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
49	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
50	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
51	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
59	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
62	<i>C. guilliermondii</i>	NI	<i>Meyerozyma caribbica</i>
68	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
72	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
73	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
74	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
75	<i>Candida</i> sp.	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
76	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
77	<i>Candida</i> sp.	NI	<i>C. albicans</i>
79	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
80	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
81	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
82	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
83	<i>Candida</i> sp.	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
84	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS
85	<i>Candida</i> sp.	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
86	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
87	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
88	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
89	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
90	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
91	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
93	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS

94	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
95	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
96	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
97	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
98	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
99	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
100	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
101	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS
103	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
104	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
105	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
106	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
107	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. glabrata</i>
108	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
109	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
110	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
111	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
112	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
113	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
114	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	NS
115	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
116	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
117	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
118	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
119	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
120	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
121	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	NS
122	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NS
123	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
124	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
125	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
126	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS

127	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
128	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
130	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
131	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS
132	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
133	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
134	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
137	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
138	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
140	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
141	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
142	<i>C. albicans</i>	NI	<i>C. albicans</i>
144	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
145	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
147	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
148	<i>Candida</i> sp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
150	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	NS
154	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	NS
159	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
233	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS
234	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	NS

NS: No secuenciada; NI: No identificada

Evaluación de la sensibilidad de los marcadores Caspp

Los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R amplificaron el DNA de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. krusei*, desde una concentración de 20 ng/μL hasta 10 pg/μL, por lo que la sensibilidad de los marcadores Caspp es de 10 pg/μL (Figura 12).

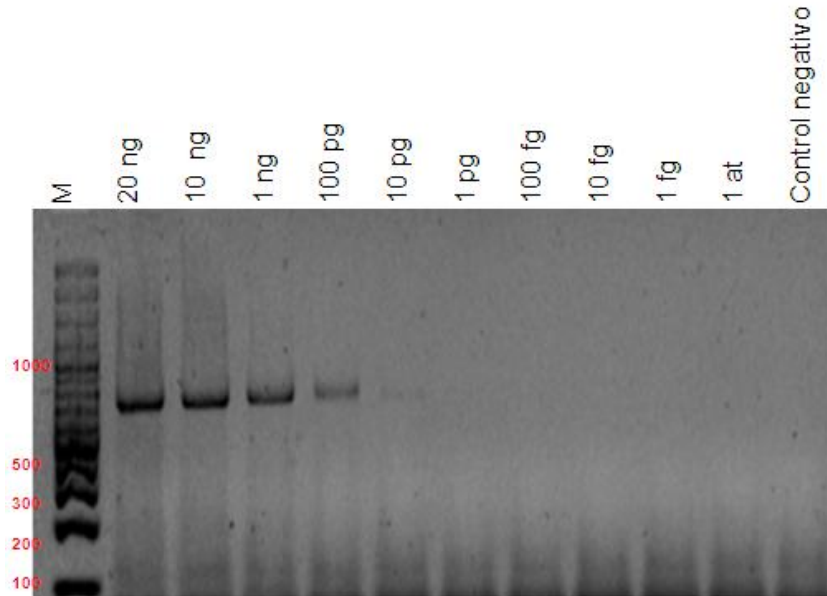


Figura 12. Sensibilidad de los marcadores Casp utilizando el DNA de la cepa ATCC de *C. parapsilosis*. La cantidad mínima detectada fue de 1 pg/ μ L. M: marcador de tamaño molecular de 100 pb.

DISCUSIÓN

La CI representa un problema de salud pública a nivel mundial debido a su mayor incidencia y mortalidad en la población de pacientes ingresados a las unidades de cuidados intensivos (Estrada-Barraza *et al.*, 2011). La mortalidad asociada a la CI está condicionada, en gran medida, por factores tanto diagnósticos como terapéuticos y se ha documentado que el diagnóstico oportuno y específico mejora el pronóstico considerablemente (Ahmad *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2011).

La etiología de la CI es variable, siendo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei* las especies más frecuentes, pero también se han reportado como causantes de esta infección a *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. famata*, *C. intermedia*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. lipolytica* y *C. kefir* (Arenas, 2008; De Bedout, *et al.*, 2010; Ruhnke *et al.*, 2011; Bonifaz, 2012; Sardi *et al.*, 2013; Bassetti *et al.*, 2015; Caggiano *et al.*, 2015), algunas de estas especies presentan resistencia a los antifúngicos más

empleados en el tratamiento (Krcmery y Barnes, 2002); por lo que los métodos de identificación deben ser lo suficientemente específicos, sensibles y rápidos para facilitar un diagnóstico oportuno y certero de la micosis, a partir de muestras clínicas. Para ello, se cuenta con diversos métodos de identificación fenotípica (Tabla 1), todos con ventajas y desventajas. Una de las desventajas más importantes es que para llevarse a cabo se requiere del aislado fúngico, lo cual no siempre se obtiene en los casos de CI, lo que limita el diagnóstico y promueve el uso de escalas, como el “*Candida score*” para predecir el riesgo de CI 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 CI 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 CI.

En los últimos años, se han desarrollado múltiples pruebas moleculares, basadas en la PCR, estas pruebas ofrecen varias ventajas: los resultados se obtienen en menor tiempo, son más específicos y su alta sensibilidad hace posible su aplicación directa sobre el DNA extraído de diversas muestras clínicas, sin necesidad de aislar primero al patógeno. Existen diversos ensayos de PCR en los que se han utilizado como blancos de amplificación las regiones del 18S y 28S, así como otras secuencias blanco, el uso de rDNA para la detección sensible de *Candida* se ha considerado el más adecuado, ya que está presente en múltiples copias, además, las regiones ITS entre las subunidades del rDNA son altamente conservadas y contienen secuencias únicas para cada una de las especies de *Candida*, por lo que la amplificación de estas regiones facilita su identificación (Colom *et al.*, 2006; Xafranski *et al.*, 2013; Taira *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). No obstante, estos ensayos moleculares también pueden presentar ciertas limitaciones, como es la escasa validación a nivel multicéntrico o multiregional para garantizar que no haya resultados falsos debido a la variabilidad genética entre los aislados procedentes de distintas regiones geográficas (Farkas *et al.*,

2009), por lo que es deseable que los marcadores moleculares que se amplifiquen sean elegidos a partir del análisis de aislados autóctonos. Al respecto, García-Salazar (2016) diseñó un par de oligonucleótidos (Caspp-F y Caspp-R) que por PCR simplex amplifican un marcador (Caspp) de tamaño específico, dentro de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S del rDNA, para cada especie: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. pseudotropicalis*, *C. zeylanoides* y *C. lipolytica*. Estos marcadores moleculares se diseñaron a partir del análisis del polimorfismo de aislados autóctonos de *Candida* spp. y se han propuesto para el diagnóstico de la CI; sin embargo, antes de utilizarse en muestras clínicas, en este trabajo evaluamos su especificidad y sensibilidad. Para ello, se amplificó el DNA de 105 aislados clínicos de *Candida* spp, previamente fenotipificados por cultivo en Chomagar Candida® (Becton, Dickinson and Company), API 20C (bioMerioux Vitek), sistemas automatizados Phoenix™ (Becton, Dickinson and Company, MD, US) y Vitek II (bioMerioux Vitek). Nuestros resultados mostraron que de los 105 aislados de *Candida* estudiados, en 70 hubo concordancia entre los resultados de identificación fenotípica y la amplificación de los marcadores moleculares Caspp, en estos aislados observamos claramente las bandas de tamaño esperado, con base en la identidad fenotípica de los aislados. Los resultados de 15 aislados mostraron amplicones de distinto tamaño al esperado de acuerdo con los datos fenotípicos, por lo que fue necesario secuenciar los amplicones para determinar su correcta identidad. De estos aislados, en ocho (5, 38, 47, 51, 62, 100, 109, 130) se comprobó, con base en la secuencia, que la especie determinada fenotípicamente era errónea; ya que de seis aislados fenotipificados como *C. albicans*, cinco eran *C. glabrata* y uno *C. tropicalis*; un aislado identificado como *C. glabrata* resultó ser *C. tropicalis*, y un aislado de *C. guilliermondii* fue molecularmente identificado como *Meyerozyma caribica*. En cuatro aislados (27, 38, 42 y 107) la secuencia del amplicón corroboró la identificación fenotípica, no obstante que el tamaño del amplicón observado en el gel indicaba incongruencia. Este problema en el corrimiento electroforético puede deberse a la concentración de DNA del amplicón, ya que se ha documentado que variaciones en la concentración de DNA puede

generar problemas de reproducibilidad en el corrimiento (Uribe-Echeverry *et al.*, 2013). En tres aislados (13, 17 y 34) fenotipificados como *C. albicans*, la amplificación mostró dos bandas, no obstante que se intentaron ajustar las condiciones de reacción para evitarlas, no fue posible. El análisis de las secuencias de ambas bandas corroboró la identidad de los aislados como *C. albicans*. Este resultado puede explicarse considerando la coexistencia de múltiples tipos de secuencias ITS en un solo genoma, lo que puede generar múltiples amplicones y problemas para definir la taxonomía molecular, como se ha reportado en otros hongos (Abe *et al.*, 2010).

Finalmente, con base en los marcadores Caspp amplificados, se logró determinar la identidad de los 19 aislados no identificados fenotípicamente, de éstos siete correspondieron a *C. glabrata* y 12 a *C. albicans*. La sensibilidad de la amplificación de los marcadores Caspp fue de 10 pg/μL de DNA, la cual es una sensibilidad mayor a la reportada por otros ensayos de PCR simplex (Estrada-Barraza *et al.*, 2011, Mohammadi *et al.*, 2015; Merseguel *et al.*, 2015).

Por lo que el método de PCR simplex basado en la amplificación de los marcadores Caspp presenta una especificidad del 100% y una alta sensibilidad que, aunado a la sencillez de la metodología, puede ser utilizado en combinación con alguna de las múltiples pruebas convencionales para proporcionar un diagnóstico más certero de la CI.

Es importante destacar que una ventaja más de los marcadores Caspp, es la habilidad para discriminar entre las especies que forman complejos, como se pudo observar en el caso del aislado 62, que fenotípicamente aparentaba ser *C. guilliermondii*; sin embargo, corresponde a *M. caribbica*, el anamorfo de *C. fermentati*, que forma complejo de especies con *C. guilliermondii sensu stricto* y *C. carpophila* (Romi *et al.*, 2014). En México esta sería la primera vez que se reporta *M. caribbica* como causante de infección.

CONCLUSIONES

La PCR simplex, utilizando los oligonucleótidos Caspp-F y Caspp-R, resultó específica y sensible para la identificación de ocho especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis*, por lo que puede ser empleada, en combinación con alguna de las pruebas convencionales, para el diagnóstico de la CI, después se validarla en muestras clínicas de pacientes con sospecha de CI y con la enfermedad confirmada.

BIBLIOGRAFÍA

Abe A, Asano K, Sone T. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2010; 74(4): 1325-1331.

Agarwal S, Manchanda V, Verma N, Bhalla P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2011; 29(2): 172-177.

Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan, ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(7): 2483-2489.

Ahmad S, Khan Z. Invasive candidiasis: a review of nonculture-based laboratory diagnostic methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2012; 30(3): 264-269.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*. 2002; 78(922): 455-459.

Alam M, Alam Q, Jiman-Fatani A, Kamal M, Abuzenadah A, Chaudhary A, Akram M, Haque A. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014; 30(5): 1437-1451

Alangaden G. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2011; 25(1): 201-225.

Arenas R. *Micología médica ilustrada*. México: McGraw-Hill Interamericana; 2012.

Ataides F, Costa C, Hasimoto e Souza L, Fernandez O, Jesuino R, Silva R. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* complex species isolated from culture collection of clinical samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48(4): 454-459.

Bassetti M, Merelli M, Ansaldi F, de Florentiis D, Sartor A, Scarparo C, Callegari A, Righi E. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. *PLoS ONE*. 2015; 10(5): e0127534.

Bauters T, Nelis H. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(5): 1838-1839.

Bauters T, Peleman R, Dhont M, Vanhaesebrouck P, Nelis H. Diferenciación enzimática de *Candida parapsilosis* de otros *Candida* spp. en una prueba de filtración de membrana. *Journal of Microbiology methods*. 2003; 53(1): 11-15.

Beggs K, Holmes A, Cannon R, Rich A. Detection of *Candida albicans* mRNA in archival histopathology samples by reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(5): 2275-2278.

Ben-Abraham R, Keller N, Teodorovitch N, Barzilai A, Harel R, Barzilay Z, Paret G. Predictors of adverse outcome from *Candida*. Infection in a tertiary care hospital. *The Journal of infection*. 2004; 49(4): 317-323.

Bineshian F, Yadegari MH, Sharifi Z, Eidgahi MA, Nasr R. Identification of *candida* species using *MP65* gene and evaluation of the *Candida albicans* *MP65* gene expression in BALB/C Mice. *Jundishapur Journal Microbiology*. 2015; 8(5): e18984.

Bitar I, Khalaf R, Harastani H, Tokajian S. Identification, typing, antifungal resistance profile, and biofilm formation of *candida albicans* isolates from Lebanese Hospital patients. *Biomed Research International*. 2014; 1-10.

Bonifaz A. *Micología médica básica*. Distrito Federal: McGraw-Hill Interamericana; 2012.

Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit A, Savelkoul P. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(4): 1357-1362.

Bougnoux M, Diogo D, Francois N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel J, Bouchier C, Van Kruiningen H, d'Enfert C, Poulain D. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(5): 1810-1820.

Bowman S, Free S. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 2006; 28(8): 799-808.

Brandt ME, Lockhart SR. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. *Current Fungal Infection Reports*. 2012; 6: 170-177

Caballero T, Aguirre C, González G, Cortés D, Miranda M. Colonization by *Candida* in a neonatal intensive care unit. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2014; 52(2): 16-23.

Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. *Candida* bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. *BioMed Research International*. 2015; 256580.

Calderone, RA. Introduction and historical perspectives. *Candida and candidiasis*. ASM Press. 2014.

Campbell C, Davey K, Holmes A, Szekely A, Warnock D. Comparison of the API *Candida* System with the AUXACOLOR System for identification of common yeast pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 37(3): 821-823.

Campbell NA. *Biología*. Madrid: Panamericana; 2007. 240-625 p.

Campanha N, Neppelenbroek K, Spolidorio D, Spolidorio L, Pavarina A. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral diseases*. 2005; 11(6): 392-398.

Canilha L, Almeida e Silva JE, Felipe M, Carvalho W. Batch xilitol production from wheat Straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. *Biotechnology Letters*. 2003; 25: 1811-1814.

Cárdenes C, Carrillo A, Arias A, Rodríguez C, Torres A, Sierra A, Arévalo M. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *Journal Microbiology Methods*. 2004; 59(2): 293-297.

Cárdenes-Perera C, Torres-Lana A, Alonso-Vargas R, Moragues-Tosantas M, Pontón-San Emeterio J, Quindós-Andrés G, Arévalo-Morales M. Evaluation of API ID 32C and VITEK-2 to identify *Candida dubliniensis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004; 50(3): 219-221.

Cervera C. Candidemia and invasive candidiasis in the adult: clinical forms and treatment. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*. 2012; 30(8): 483-491.

Chang H, Leaw S, Huang A, Wu T, Chang T. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a Multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(10): 3466-3471.

Clancy C, Nguyen M. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how non culture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical Infectious Diseases*. 2013; 59(9): 1284-1292.

Colom M, Jover A, Ferrer C. Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2006; 23(1): 26-28.

Costa AR, Silva F, Henriques M, Azeredo J. *Candida* clinical species identification: molecular and biochemical methods. *Ann Microbiology*. 2010; 60: 105-112.

Dabas PS. An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2013; 4(6): 63-74

De Bedout C, Gómez B. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio*. 2010; 14: 159-171.

De la Torre-Saldaña VA, Martínez-Velázquez M, Reséndiz-Sánchez J. Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. *Medicina Interna de México*. 2014; 30: 121-132.

Dostál J, Hamal P, Pavlíčková L, Souček M, Ruml T, Pichová I, Hrušková O. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(2): 712-716.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Múltiplex PCR: optimización y aplicación en virología de diagnóstico. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13(4): 559-570.

Estrada-Barraza D, Dávalos MA, Flores PL, Mendoza DR, Sánchez VL. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2011; 28(1): 36-42.

Farkas Z, Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Kucsera J, Varga J, Pfeiffer I. Genetic variability of *Candida albicans* isolates in a university hospital in Hungary. *Mycoses*. 2009; 52(4): 318-325.

Freydiere A, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology*. 2001; 39(1): 9-33.

García-Salazar E. *Obtención de marcadores moleculares para la identificación rápida y específica de Candida albicans, C. glabrata, C. tropicalis y C. parapsilosis sensu stricto*. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México; 2016.

Ghannoum M. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 13(1): 122-143.

González G, Treviño-Rangel J, Palma-Nicolas J, Martínez C, González J, Ayala J, Caballero A, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Velarde F, Ascencio E, Tinoco J, Vázquez J, Cano M, León-Sicarios N, González R, Rincón J, Elías M, Bonifaz A. Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 68(12): 2847-2851.

Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 38(5): 1782-1785.

Griffiths A. *Introduction to genetic analysis*. New York: W.H. Freeman and Co; 2005.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infection Diseases*. 2003; 37(9): 1172-1177.

Gutiérrez J, Morales P, González M, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *Journal of basic microbiology*. 2002; 42(3): 207-227.

Guilarte C, Pardi G. Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontologica Venezolana*. 2009; 47(3): 2-7

Guzel A, Ilkit A, Akar T, Burgut R, Demir S. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Medical Mycology*. 2011; 49(1): 16-25.

Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Häcker G. Comparison of (1→3)-β-d-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and cand-tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(4): 1158-1164.

Horvath L, Hospenthal D, Murray C, Dooley D. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(6): 2629-2632.

Jarque I, Andreu R, Salavert M, Gómez D, Pemán J, Gobernado M, Sanz M. Artículo especial Valor de la detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* en el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasora en pacientes hematológicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2003; 20: 116-118.

Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2009; 7(10): 1201-1221.

Kim D, Shin W, Lee K, Kim K, Young Park J, Koh C. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germtube formation at 39 degrees C. *Yeast*. 2002; 19(11): 957-962.

Kim T, Park B, Kim H, Lee M. *Candida dubliniensis* screening using the germ tube test in clinical yeast isolates and prevalence of *C. dubliniensis* in Korea. *Journal of Clinical laboratory analysis*. 2010; 24(3): 145-148.

Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *The official Journal of the Healthcare Infection Society*. 2002; 50(4): 243-260

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27(2-3): 95-125.

Kumar C, Menon T, Sundararajan T, Nalini S, Thirunarayan M, Rajasekaran S, Venkatadesikalu M. Esterasa actividad de las especies de *Candida* aisladas de huéspedes inmunocomprometidos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2006; 23(2): 101-103.

León C, Ruiz S, Saavedra P, Almirante B, Nolla J, Alvarez F, Garnacho-Montero J, León M. A bedside scoring system ("*Candida* score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Critical care medicine*. 2006; 34(3): 730-737.

Letscher V, Meyer M, Galois A, Waller J, Candolfi E. Prospective evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID, in comparison with candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(4): 1508-1510.

Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Gallé F, Signoriello G, Colella G, D'Amora M, Rossano F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiology and Immunology*. 2009; 24(1): 76-78.

Lim C, Rosli R, Seow H, Chong P. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious disease*. 2012; 31(1): 21-31.

Lionakis MS. New insights into innate immune control of systemic candidiasis. *Medical Mycology*. 2014; 52: 555-564.

López L, Bereciartua E, Santamaría M, Soria L, Hernández-Almaraz J, Mularoni A, Nieto J, Montejo M. First case report of catheter-related fungemia by *Candida nivariensis* in the Iberian Peninsula. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013; 30(1): 69-71.

Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(7): 3159-3163.

Makene VA. 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. *Scholars Academic Journal of Biosciences*. 2014; 2(2): 124-131.

Massonet C, Van Eldere J, Vaneechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(5): 2209-2211.

Merenstein D, Hu H, Wang C, Hamilton P, Blackmon M, Chen H, Li D. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and non infected women. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2013; 29(1): 30-34.

Merseguel K, Nishikaku A, Rodrigues A, Padovan A, e Ferreira R, Salles de Azevedo Melo A, Colombo A. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infectious Diseases*. 2015; 15: 57.

Metwally L, Fairley D, Coyle P, Hay R, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb C, Elbaz W, McMullan R. Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2008; 57(Pt3): 296-303.

Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola A, Ratto S, Bacigalupo A, Viscoli C. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012; 67(7): 1746-1748.

Mohammadi R, Badiee P, Badali H, Abastabar M, Safa AH, Hadipour M, Heshmat F. Use of restriction fragment length polymorphism to identify *Candida* species, related to onychomycosis. *Advanced Biomedical Research*. 2015; 4: 95.

Morgan J, Meltzer M, Plikaytis B, Sofair A, Huie S, Wilcox S, Harrison L, Seaberg E, Hajjeh R, Teutsch S. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case control study using data from population based candidemia surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2005; 26(6): 540-547.

Motukupally S, Nanapur V, Chathoth K, Murthy S, Pappuru R, Mallick A, Sharma S. Ocular infections caused by *Candida* species: Type of species, in vitro susceptibility and treatment outcome. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2005; 33(4): 538-546.

Murray P, Rosenthal S, Pfaüer M. *Microbiología médica*. Madrid: Elsevier; 2007.

Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU. Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *The Libyan Journal of Medicine*. 2010; 5: 10.3402/ljm.v5i0.2144.

Neppelenbroek K, Seó R, Urban V, Silva S, Dovigo L, Jorge J, Campanha, N. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral diseases*. 2014; 20(4): 329-344.

Nikitina TV, Nazarova N, Tishchenko LI, Tuohimaa P, Sedova VM. Use of real time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431. *Tsitologiya*. 2003; 45(4): 392-402.

Obera T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2004; 21: 15-19.

Ospina WP, Cortés JA. Diagnóstico molecular de candidemia mediante PCR semianidada en pacientes críticos. *Acta Medica Colombiana*. 2010; 36(3): 135-140.

Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M. Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Microbiology and Immunology*. 2010; 43(2): 147-154.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20(1): 133-163.

Pincus D, Orega S, Chatellier S. Yeast identification past, present, and future methods. *Medical Mycology*. 2007; 45(2): 97-121

Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, Amore R, Posteraro P, Ricciardi W, Sanquinetti M. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A Meta-Analysis of Their Accuracy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015; 53(8): 2439-2450.

Relloso MS, Nievas J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, Zarate MS, Smayevsky J. Evaluation of mass spectrometry: MALDI-TOF MS for fast and reliable yeast identification. *Revista Argentina de microbiología*. 2015; 47(2): 103-107.

Rodloff A, Koch D, Schaumann R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *European Journal of Medical Research*. 2011; 16(4): 187-195.

Rodriguez N, Barrios MA. Capitulo 85: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. *Dermatología Iberoamericana Online*. 2011.

Romi W, Keisam S, Ahmed G, Jeyaram K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*. 2014; 14: 52.

Romney M, Bryce E, Rennie R, Sand C. Rapid identification of clinical yeast isolates using the colorimetric AUXACOLOR system. *Diagnostic of Microbiology Infectious Diseases*. 2000; 36(2): 137-138.

Ruhnke M, Rickerts V, Cornely O, 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 A, German Speaking Mycological Society

y Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German speaking mycological society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses*. 2011; 54(4): 279-310.

Sampaio P, Gusmão L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina C, Amorim A, Pais C. New microsatellite Multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(8): 3869-3876.

Sardi J, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A, Mendes M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. 2013; 62(Pt1): 10-24.

Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P, Hipler U. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses*. 2012; 55(3): 276-280.

Singh S, Fatima Z, Hameed S. Predisposing factors endorsing *Candida* infections. *Le Infezioni in Medicina*. 2015; 3: 211-223.

Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(12), 4626-4628.

Spanu T, Posteraro B, Fiori B. Direct Maldi-Tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *Journal Clinical Microbiology*. 2012; 176-179.

Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses*. 2007; 50(1): 1-12.

Taira C, Okay T, Delgado A, Ceccon M, de Almeida M, Del Negro G. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infectious Diseases*. 2014; 14: 406.

Than L, Chong P, Ng K, Seow H. Detection of medically important *Candida* species by absolute quantitation Real-Time Polymerase chain reaction. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015; 8(1): e14940.

Tobar AE, Siva OF, Olivares CR, Gaete GP, Luppi NM. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Revista Chilena de Infectología*, 28(1), 41-49.

Tortorano A, Barchiesi F, Manso E, Montagna M, Farina C, Ferrari L, Raballo A, Grancini A, Lombardi G. Is a kit for identification of clinical yeasts correctly

evaluated when released onto the market? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious diseases*. 2000; 19(7): 567-569.

Uribe-Echevarry PT, Herrera Cañón JC, Orozco-Clavijo NJ, Betancur-Pérez JF. Uso alternativo del colorante GelRed en la tinción de ácidos nucleicos. *Archivos en Medicina*. 2013; 13(2): 160-166.

Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. Chapter, *Essentials of Clinical Mycology*. 2011; 167-206.

Wang H, Kim S, Kim H, Kim J, Kim Y, Park S, Lee H. Real-time PCR *TaqMan* assay for rapid screening of bloodstream infection. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2014; 13: 3.

White T, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, EUA. 1990; 315-322.

Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(10): 3793-3795.

Wingard JR. Have novel serum markers supplanted tissue diagnosis for invasive fungal infections in acute leukemia and transplantation? *Best Practice and Research. Clinical Haematology*. 2012; 25(4): 487-491.

Xafranski H, Melo A, Machado A, Briones M, Colombo A. A quick and low-cost PCR-based assay for *Candida* spp. identification in positive blood culture bottles. *BMC Infectious Diseases*. 2013; 13: 467.

Zaoutis T, Argon J, Chu J, Berlin J, Walsh T, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clinical infectious diseases*. 2005; 41(9): 1232-1239.

APÉNDICE

Medios de cultivo

Agar dextrosa Sabouraud

Fórmula por litro:

Dextrosa	40.0 g
Peptona de caseína	5.0 g
Peptona animal	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	c.b.p.
pH	5.6±0.2

Se agrega agua destilada a los ingredientes y se disuelve mediante calentamiento, posteriormente se esteriliza en autoclave y se vacía en cajas de Petri estériles.

YEPD

Fórmula por litro:

Extracto de levadura	10.0 g
Dextrosa	20.0 g
Peptona	20.0 g
Agua destilada	c.b.p.

Los ingredientes se disuelven en agua destilada, mediante calentamiento, se esteriliza en autoclave y se vacía en tubos de ensayo con tapa de rosca estériles.

Soluciones para electroforesis

Amortiguador TBE 5X

Fórmula por litro

TRIS base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA disódico 0.5 M	10 mL
Agua destilada	c.b.p.

Disolver en 250 mL de agua destilada el TRIS base y el ácido bórico, agregar el EDTA disódico a pH 8 y llevar a un volumen de 1000 mL.

Amortiguador TBE 0.5X

Diluir un volumen de buffer TBE 5X en 9 volúmenes de agua destilada.

Gel de agarosa al 1.5%

Agarosa	1.2 g
Amortiguador TBE 0.5X	80 mL
GelRed™ (30X)	0.2 µL

Disolver la agarosa en el amortiguador TBE 0.5X a través de calentamiento, agregar el GelRed, dejar enfriar un poco antes de vaciar a la cámara de electroforesis.