

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Detección molecular específica y oportuna de tres
especies de *Candida* comunes en infecciones humanas:
C. albicans, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.**

Tesis que presenta

Cesia Janell Hernández Howell

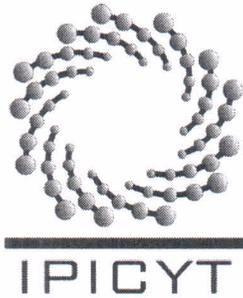
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2014



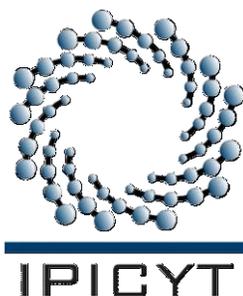
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Detección molecular específica y oportuna de tres especies de Candida comunes en infecciones humanas: C. albicans, C. tropicalis y C. parapsilosis***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Cesia Janell Hernández Howell** y aprobada el **cuatro de julio del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Director de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

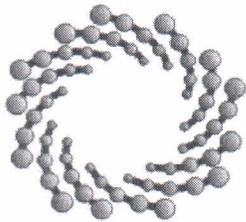
Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Irene Castaño Navarro, apoyada por el proyecto de los Fondos Sectoriales de Investigación en Salud 2011 No. 161971 y del proyecto Emprendedurismo 2013-IPICYT No. S3946.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 279071).



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 115 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de julio del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Cesia Janell Hernández Howell

sobre la Tesis intitulada:

Detección molecular específica y oportuna de tres especies de Candida comunes en infecciones humanas: C. albicans, C. tropicalis y C. parapsilosis

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

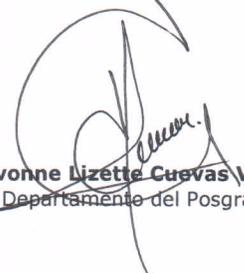
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de julio de 2014.


Dr. Marcial Bohillo Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicado a las personas que padecieron o padecen de candidiasis y/o candidemia. Dedicado al personal de salud que día a día luchan por salvar la vida de sus pacientes.

Agradecimientos

A México por darme la oportunidad de interactuar culturalmente y conocer y estudiar en este hermoso país, y de enriquecer mi conocimiento científico.

Al CONACyT por la beca 279071.

Al IPICYT por los recursos otorgados a I. Castaño y los recursos otorgados a la Lic. Hernández-Howell con el proyecto Emprendedurismo 2013-IPICYT No. S3946.

A mi tutora de tesis, Dra. Irene Castaño, agradezco su paciencia, dedicación, consejos y dirección en todo el desarrollo de este proyecto de tesis.

Al Dr. Alejandro de las Peñas por sus intervenciones y aportaciones oportunas para el desarrollo de esta investigación.

Al mis sinodales, Dr. J. Sergio Casas y al Dr. Ángel G. Alpuche, por su dedicación, consejos, correcciones y sugerencias en el desarrollo de esta tesis.

A MIIB. Norma García Calderón y MC. Daniel Barrón Pastor por su amistad y asesoría en materia de PI y negocios.

A los compañeros del laboratorio 6 por su amistad y ayuda durante el tiempo que pasamos juntos: Dra. María Guadalupe Gutiérrez, Mtra. Karina Robledo, Mtra. Paty Yáñez, Mtra. Gloria Alvarado, Mtra. Gehenna Lobo, Mtro. Israel Cañas, Dr. Emmanuel Orta Zavalza, Auxiliar de Laboratorio Gloria López.

A la Dra. Lina Riego, Mtra. Ivonne Cuevas y Lic. Edith Rodríguez por la dedicación y atenciones en materia administrativa y procesos de migración.

Al Dr. Octavio Sánchez por la instrucción y entrenamiento en el método bioquímico API.

Al Dr. Héctor Mora por el aporte de las tres especies del complejo *C. parapsilosis*.

Al personal de salud de los dos hospitales nacionales: El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) y El Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por la aportación de las muestras analizadas en este estudio.

A LANBAMA por facilitar sus instalaciones y quipo en el desarrollo de esta tesis.

Dr. Jorge Carrasco por los consejos e inspiración a continuar mis estudios en el área de biología molecular.

A Dios y a mi familia, por el apoyo incondicional que me han dado, y por estar siempre presentes aun a pesar de la distancia, los amo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista del material suplementario	x
Abreviaturas	xi
Glosario	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Datos generales	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	5
Resultados	9
Discusión	15
Agradecimientos	20
Referencias	21
Material suplementario	36

Lista de tablas

1. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	25
2. Oligonucleótidos seleccionados, sus condiciones óptimas para la PCR punto final y el tamaño del producto amplificado.	26
3. Número de aislados clínicos identificados por pareja de oligonucleótidos y su frecuencia en un total de 52 aislados analizados.	27
4. Comparación entre los resultados de la PCR y el método bioquímico VITEK-2.	28
5. Resultados discordantes de 10 aislados clínicos detectados por PCR y VITEK-2, y analizados con el método API ID32 C considerado el estándar de oro.	29

Lista de figuras

1. Selección de las parejas de oligonucleótidos específicos para la detección de la especie para la cual fueron diseñados. 30
2. Cantidad mínima de ADN genómico detectado por una pareja de oligonucleótidos para las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. 31
3. Mezcla de ADN de varias especies frente a cantidades decrecientes de ADN específico para la pareja de oligonucleótidos. 32
4. Detección molecular e identificación de tres especies de *Candida* en 52 aislados clínicos. 34
5. La PCR punto final presenta valores de sensibilidad y especificidad más altos que VITEK-2 al compararlos con la prueba de referencia API ID32 C. 35

Lista del Material Suplementario

Tabla S1. Temperatura óptima de alineación para cada pareja de oligonucleótidos determinado por medio de un gradiente de temperatura.	36
Tabla S2. Concentración óptima de oligonucleótidos para la PCR de cada pareja.	37
Figura S1. Gradiente de temperatura para la selección de la temperatura óptima de alineamiento de la pareja de oligonucleótidos.	38
Figura S2. Intervalo de concentraciones de oligonucleótidos evaluadas para cada pareja.	39
Figura S3. Cantidad mínima de ADN genómico detectado por una pareja de oligonucleótidos de cada especie (<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i>).	40
Figura S4. Mezcla de ADN de varias especies frente a cantidades decrecientes de ADN específico para la pareja de oligonucleótidos.	41

Abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μM	Micromolar
ng	Nanogramos
ADN	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato

Glosario

Oligonucleótidos. Secuencia corta, sintética de ADN que se utiliza como cebador en las reacciones de amplificación de secuencias de ADN.

Aislado clínico. Cepa aislada proveniente de una muestra clínica.

Muestras clínicas. Material biológico proveniente de las personas que permite el aislamiento y detección de microorganismos causantes de la infección.

Especificidad. ¹Capacidad de detectar específicamente una especie. ²Capacidad de una prueba clínica de dar un resultado negativo en ausencia de enfermedad (proporción de verdaderos negativos).

Sensibilidad. ¹Capacidad de detectar una especie aun en bajas concentraciones de ADN genómico del mismo. ²Capacidad de una prueba clínica de dar un resultado positivo en presencia de enfermedad (proporción de verdaderos positivos).

Resumen

Detección molecular específica y oportuna de tres especies de *Candida* comunes en infecciones humanas: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

Las infecciones causadas por algunas especies de *Candida* son la causa principal de las micosis oportunistas en humanos a nivel mundial. Dentro de las especies de mayor interés clínico están: *C. albicans*, la especie predominante; *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. El diagnóstico oportuno de estas especies es de vital importancia para la supervivencia de pacientes inmunosuprimidos pues varias especies pueden ser menos susceptibles a algunos antimicóticos. En el presente trabajo optimizamos un método de PCR punto final para 8 parejas de oligonucleótidos que de manera especie-específica permiten la detección de tres especies frecuentes en infecciones humanas causadas por *Candida*. Tres parejas detectaron a *C. albicans*, tres a *C. tropicalis* y dos a *C. parapsilosis*. Este método detecta bajas concentraciones de ADN genómico y la detección no se ve afectada aún en presencia de altas concentraciones de ADN de otras especies relacionadas. Las ocho parejas son altamente específicas para la secuencia para la cual fueron diseñadas. Analizamos 52 aislados clínicos provenientes de dos hospitales nacionales, *C. albicans* fue la especie más frecuente (38.5%), seguida por *C. tropicalis* (34.6%) y *C. parapsilosis* (5.8%). Al comparar los resultados de PCR punto final con los resultados de VITEK-2 (BioMeriux) encontramos que 81% de los resultados concuerdan entre ambos métodos. El 90% de todas las muestras, incluyendo todas las que no concordaron, se compararon con el método considerado “estándar de oro” API ID32C (BioMeriux). El 98% de los resultados obtenidos con API ID32C (51 de 52), coinciden con nuestros resultados por PCR.

Palabras clave: PCR, Diagnóstico molecular, levaduras, *Candida*.

Abstract

Specific and fast molecular detection of three common *Candida* species in human infections: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*.

Hospital acquired infections caused by *Candida* species are the main cause of fungal opportunistic infections worldwide. The most important species in the clinic are: *Candida albicans*, the most frequent species, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*. Prompt diagnosis of the species causing the infection is of the utmost importance for the survival of immunocompromised patients since some species are less susceptible to antifungal agents. In this work we optimized a PCR based method for 8 pairs of oligonucleotides that specifically detect three of these frequent species of *Candida* in a species-specific manner. Three pairs of oligonucleotides detect *C. albicans*, three others detect *C. tropicalis* and two detect *C. parapsilosis*. This method can detect low genomic DNA concentrations and it is not affected by the presence of high concentrations of DNA from other related species. The eight pairs are highly specific for detection of the species against which they were designed. We analyzed 52 clinical isolates from two hospitals in Mexico: *C. albicans* was the most common species (38.5%), followed by *C. tropicalis* (34.6%) and *C. parapsilosis* (5.8%). Comparison of our PCR results with those obtained by VITEK-2 (BioMeriux) showed that 81% of the results agree in both methods. 91% of all the samples, including those that were different between these two methods were compared to a third one considered the gold standard, API ID32C (BioMereux). 98% of the isolates analyzed with API ID32C (51/52) coincided with the results obtained by our PCR method.

KEY WORDS: PCR, molecular diagnosis, yeasts, *Candida*.

1 **Detección molecular específica y oportuna de tres especies de *Candida***
2 **comunes en infecciones humanas: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C.***
3 ***parapsilosis*.**

4

5

6 Cesia Hernández-Howell, Alba Saucedo Fuentes, Rosario Baltazar-Lara, Grecia
7 Hernández-Hernández, Alejandro De Las Peñas e Irene Castaño.

8

9 Laboratorio de Microbiología molecular, División de Biología Molecular, Instituto
10 Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí México.

11

12 Running Title: Specific molecular identification of *Candida albicans*, *Candida*
13 *tropicalis* and *Candida parapsilosis*.

14

15 #Enviar correspondencia a: Dra. Irene Castaño, icastano@ipicyt.edu.mx

16 Dirección actual:

17 IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

18 Camino a la Presa San José 2055

19 Col. Lomas 4 sección

20 CP. 78216

21 San Luis Potosí, SLP, México

22 Teléfono: (444) 8342040

23 **INTRODUCCIÓN**

24 Se reportan alrededor de 200 especies pertenecientes al género *Candida*
25 de los cuales aproximadamente 18 especies son consideradas patógenos de
26 humanos (1). En las personas sanas, forman parte de la microbiota normal de la
27 piel y las mucosas, pero cuando el equilibrio microbiota–hospedero se rompe por
28 diversos factores (como tratamientos prolongados con antibióticos, cirugías,
29 neutropenia, inmunosupresión, malnutrición, VIH/SIDA, quimioterapia, entre otros),
30 se favorece el crecimiento desmedido de estas levaduras oportunistas, lo que
31 causa enfermedades que pueden poner en riesgo la vida de los que la padecen
32 (2).

33 Las especies de mayor interés clínico y las responsables del 95 al 97% de
34 las infecciones en los seres humanos son: *Candida albicans*, la especie
35 predominante; *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. El 3 a 5% restante
36 corresponde a otras especies como *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C.*
37 *rugosa*, entre otras. La frecuencia de aislamiento de éstas varía de acuerdo con la
38 edad de los pacientes, la localización geográfica, el sitio anatómico del cual se
39 aisló, la enfermedad o la condición base del paciente, las estancias prolongadas
40 de hospitalización, la unidad de hospitalización en la que se encuentran, el uso de
41 “vehículos” invasivos que pueden introducirlas en el hospedero (catéteres,
42 soluciones de irrigación contaminadas, válvulas cardíacas, ventilación mecánica,
43 alimentación parenteral) y de los cuidados sanitarios tomados por el personal de
44 salud que entra en contacto con el paciente hospitalizado (lavado de manos) (2-4).

45 Las infecciones causadas por *Candida* spp. pueden adquirirse en la
46 comunidad, así como en los hospitales (infecciones nosocomiales) y van desde

47 infecciones superficiales de las mucosas y los tejidos cutáneos en personas
48 inmunocompetentes (Candidiasis) hasta infecciones invasivas (Candidiasis
49 invasiva). En estudios realizados en Estados Unidos de América, se ha
50 encontrado que las infecciones invasivas presentan una incidencia de 22 a 29
51 casos por cada 100,000 de población (2). Las septicemias (diseminación
52 sanguínea) causadas por las diversas especies de *Candida* (candidemia)
53 representan la principal infección fúngica invasiva a nivel mundial (4, 5). En las
54 últimas décadas, las infecciones causadas por las especies más comunes han ido
55 en aumento (de un 8% a un 12% de incidencia) (6) y se han convertido en un
56 importante problema de salud pública que afecta a personas de todas las edades
57 en todas partes del mundo.

58 Aunque existe una alta incidencia de candidiasis superficiales entre
59 personas inmunocompetentes, las septicemias presentadas en pacientes
60 inmunosuprimidos han tomado mayor interés en los últimos años ya que están
61 asociadas con altos grados de mortalidad (28 a 71% de mortalidad) (1, 6). Esto en
62 parte se debe a que algunas especies presentan menor susceptibilidad innata (7,
63 8) a los tratamientos de primera elección (ejemplo: *C. glabrata* y *C. krusei*), a la
64 demora en el tiempo de diagnóstico y a la carencia de un resultado clínico positivo
65 y preciso; esto se debe a que los métodos convencionales actuales son poco
66 específicos y sensibles, por lo que en algunos casos no se detecta o se detecta de
67 manera incorrecta la especie causante de la infección.

68 Dada la alta incidencia y mortalidad de las infecciones (2), la detección
69 oportuna y específica de estas especies de *Candida*, es de suma importancia
70 clínica, ya que un resultado rápido y preciso puede ayudar al médico tratante a

71 instaurar o modificar el tratamiento de manera rápida y evitar la muerte al
72 paciente. Actualmente existen numerosos métodos para realizar el diagnóstico
73 (morfológicos, fisiológicos, cromogénicos, bioquímicos, entre otros), sin embargo,
74 en general presentan varias desventajas, entre ellas resaltan que son poco
75 específicos y tienen baja sensibilidad ya que dependen en su mayoría de la
76 experiencia e interpretación del laboratorista, y requieren de un largo período de
77 tiempo para dar un resultado (48 a 120 horas) (9-12).

78 Por otro lado, los métodos moleculares basados en la PCR son altamente
79 específicos y más rápidos que los métodos convencionales, pero en general
80 requieren de equipo, material costoso y personal altamente capacitado para poder
81 realizar los procedimientos.

82 La mayoría de estos métodos se basan en la amplificación de las
83 secuencias que codifican para los RNAs ribosomales. Aunque se realizan
84 esfuerzos por diseñar oligonucleótidos para secuencias específicas sobre esta
85 región, en la mayoría de los casos, los tamaños de los amplicones son muy
86 parecidos para varias especies, por lo que no se puede distinguir entre especies y
87 se requiere de pasos subsecuentes para poder identificar la especie, lo que
88 aumenta el tiempo y el costo del método (9, 13-15). También, recientemente se
89 desarrolló un método de PCR en tiempo real que permite discernir entre especies
90 de *Candida* basado en las diferentes temperaturas de fusión de los amplicones.
91 Sin embargo, esta técnica es muy costosa y requiere de técnicos altamente
92 especializados (16).

93 En diversos hospitales de México se utiliza un método automatizado para
94 realizar la identificación de las especies de *Candida* de aislados provenientes de

95 muestras clínicas. Este método es el VITEK-2 (Biomereux), da sus resultados en
96 aproximadamente 24 horas, y basa sus análisis de acuerdo a un perfil bioquímico
97 a partir de colonias aisladas. Otro método bioquímico poco utilizado en los
98 laboratorios clínicos de México es el API ID32 C (Biomereux), este no es
99 automatizado y consiste también en determinar la especie mediante un perfil
100 bioquímico a partir de la asimilación de 32 sustratos carbonados y se obtienen
101 resultados entre las 24-48 horas a partir de colonias aisladas.

102 En el presente trabajo estandarizamos un método de PCR punto final para
103 la detección de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Este método
104 es menos costoso que otras técnicas moleculares, es más rápido, más sensible y
105 específico que los métodos convencionales, y tiene el potencial poder ser
106 implementado en el sistema de salud para proveer resultados de mayor calidad y
107 en menor tiempo.

108 **MATERIALES Y MÉTODOS**

109 **Cepas.** Las cepas de referencia utilizadas en este estudio: *C. albicans* (cepa
110 secuenciada SC5314), *C. glabrata* [BG14, (17)], *C. tropicalis* (aislado clínico Ct18),
111 *C. parapsilosis* (aislado clínico Cp20), *C. krusei* (aislado clínico Ck26), *C.*
112 *guilliermondii* (aislado clínico Cgu17), *C. bracarensis* (cepa de referencia, UK,
113 NCYC3133), *Saccharomyces cerevisiae* (cepa secuenciada S288C), *C.*
114 *dublinskiensis* (cepa secuenciada CD36), *C. metapsilosis* (aislado clínico Cm27) y
115 *C. orthopsilosis* (aislado clínico Co28).

116 **Aislados clínicos.** Se utilizaron 52 aislados clínicos que provienen de dos
117 instituciones nacionales: El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la

118 Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) y el Instituto Nacional de Cancerología
119 (INCAN), de pacientes hospitalizados con candidiasis o candidemia.

120 **Extracción de ADN genómico de Aislados clínicos.** La extracción de ADN
121 genómico se realizó por el método de extracción con fenol y precipitación con
122 etanol descrito previamente por David Moore y Dennis Dowhan (18). El ADN
123 genómico se resuspendió en un volumen final de 250 μ L de TER (TE: Tris 10 mM,
124 EDTA 0.1 mM; RNase Cocktail - RNase A a 500 U/mL, RNase T1 a 20,000 U/mL-
125 1 μ L/mL de TE).

126 **Diseño de oligonucleótidos.** Por métodos bioinformáticos se identificaron
127 primero secuencias genómicas específicas de cada una de las especies *C.*
128 *albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Una vez identificadas estas secuencias, se
129 diseñaron 19 parejas de oligonucleótidos que alínean con estas secuencias. Los
130 oligonucleótidos tienen longitudes entre los 18 pares de bases (pb) y 22 pb. En
131 total se diseñaron 6 parejas de oligonucleótidos dirigidos contra tres secuencias
132 específicas de *C. albicans*, 11 parejas diseñadas contra 5 secuencias específicas
133 de *C. tropicalis* y 2 parejas contra 2 secuencias específicas de *C. parapsilosis*.

134 **Amplificación por PCR.** Las condiciones de amplificación por PCR punto final
135 varían de acuerdo con la pareja de oligonucleótidos utilizada, se utilizaron las
136 condiciones óptimas por pareja descritas en la Tabla 2. Utilizamos en forma
137 general una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 15 segundos y
138 una temperatura de extensión de 72 °C durante 20 segundos.

139 La concentración de los componentes de la PCR utilizada en un tubo de reacción
140 para un volumen final de 30 μ L son: Buffer de ADN polimerasa 1X; $MgCl_2$ 1.5 mM
141 (con excepción de la pareja Cp2 donde se utilizó 3.0 mM); desoxirribonucleótidos
142 trifosfato (dNTPs) 50 μ M; 2U de la enzima Amplificasa (BioTecMol, México D.F.).

143 **Temperatura de alineamiento.** Para determinar la temperatura óptima de
144 alineamiento se realizó un gradiente de temperatura para cada pareja de
145 oligonucleótidos seleccionada. Las temperaturas intermedias fueron asignadas por
146 un algoritmo determinado por el termociclador (Bio-Rad C1000 Touch). La
147 temperatura máxima asignada para todas las parejas fue de 68 °C, excepto para
148 Cp2, donde la máxima fue de 72 °C. La temperatura mínima varió para cada una
149 de las parejas en un intervalo de 55-62 °C.

150 **Concentración de oligonucleótidos.** Se analizaron 8 concentraciones de
151 oligonucleótidos por PCR punto final para cada pareja: 100 nM, 200 nM, 400 nM,
152 500 nM, 600 nM, 800 nM, 1000 nM y 1200 nM. Además de estas
153 concentraciones, la pareja Ca6 también se probó a 300 nM.

154 **Concentración de desoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs).** Se analizaron 7
155 concentraciones de dNTPs por PCR punto final para cada pareja de
156 oligonucleótidos: 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M y 50 μ M.

157 **Cantidad de ADN detectado por PCR.** Se determinó la cantidad de ADN
158 genómico que puede ser detectado por cada una de las ocho parejas de
159 oligonucleótidos utilizando las siguientes cantidades de ADN genómico de la
160 especie detectada: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.1 ng, 0.05 ng, 0.02 ng y sin ADN.

161 **Especificidad de los oligonucleótidos.** ADN con mezcla de otras especies: se
162 probó por PCR punto final una mezcla de ADN genómico de 10 especies de
163 *Candida* (50 ng de cada especie) a la cual se agregó diferentes concentraciones
164 de la especie detectada por cada una de las parejas de oligonucleótidos. Las 10
165 especies de *Candida* utilizadas en este ensayo son: *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C.*
166 *bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *S.*
167 *cerevisiae* además de 2 de las 3 especies estudiadas en este trabajo (*C. tropicalis*,
168 *C. albicans* y *C. parapsilosis*). El ADN de la especie contra la cual están dirigidos
169 los oligonucleótidos se agregó a la mezcla en diferentes cantidades: 100 ng, 10
170 ng, 1 ng, y sin ADN.

171 **Electroforesis en gel de agarosa.** Los productos de PCR tiempo real se corrieron
172 en geles de agarosa al 2%, por 60 minutos a 130 voltios. El ADN amplificado se
173 tiñó con Bromuro de Etidio (0.0375 µL/mL de TAE 1X) y se visualizó bajo luz UV
174 utilizando un equipo Gel Doc System (BioRad). En todos los casos (excepto donde
175 se menciona expresamente), se corrió un 1/15 del volumen total de la reacción de
176 PCR (2µL de 30µL totales).

177 **Evaluación de asimilación de carbohidratos.** Se evaluó la asimilación de
178 carbohidratos de las cepas de *Candida* por medio de dos métodos bioquímicos:
179 VITEK-2 (realizado en el hospital de donde provienen los aislados clínicos) y API
180 ID32 C (ambos de BioMerieux® SA). Cada método se realizó siguiendo las
181 instrucciones del fabricante.

182 **RESULTADOS**

183 **Diseño y selección de oligonucleótidos.**

184 Por métodos bioinformáticos diseñamos un total de 19 parejas de
185 oligonucleótidos específicos de especie para la detección molecular de tres
186 especies principales de *Candida* causantes de enfermedades en humanos, en
187 total fueron 6 parejas para la detección de *C. albicans*, 11 para *C. tropicalis* y 2
188 para *C. parapsilosis* (Tabla 1).

189 Para seleccionar las parejas de nucleótidos más específicas para cada
190 especie (que amplifiquen la secuencia deseada), probamos por medio de PCR
191 punto final, cada pareja utilizando ADN de especies de *Candida* diferentes a la
192 especie hacia la cual van dirigidas las parejas de oligonucleótidos (*C. glabrata*, *C.*
193 *dublinsiensis*, *C. bracarensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*), así como ADN de la
194 especie que detectan como control positivo. De esta manera seleccionamos las
195 parejas de oligonucleótidos que mostraron ser más específicos para cada especie,
196 3 parejas para *C. albicans* (Ca2, Ca5, Ca6), 3 parejas para *C. tropicalis* (Ct1, Ct3,
197 Ct5) y 2 parejas para *C. parapsilosis* (Cp1 y Cp2) (Tabla 2 y Fig. 1).

198 Posterior a la selección, estandarizamos las condiciones óptimas de la
199 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cada pareja de oligonucleótidos:

200 **Temperatura de óptima de alineamiento para PCR punto final.**

201 Por medio de un gradiente de temperatura determinamos la temperatura
202 óptima de alineamiento para la PCR de cada pareja de oligonucleótidos. Los
203 valores obtenidos fueron: 67.6 °C para la pareja Ca2; 63.5 °C para Ca5; 60.8 °C

204 para Ca6; 64.4 °C para Ct1; 60.1 °C para Ct3; 65.5 °C para Ct5; 61.9 °C para Cp1
205 y 68.4 °C para Cp2 (Tabla 2, Tabla S1 y Fig. S1).

206 **Concentración de oligonucleótidos óptima para PCR punto final.**

207 Determinamos la concentración de oligonucleótidos óptima para cada
208 pareja de oligonucleótidos, es decir, seleccionamos la concentración mínima que
209 proporcionó cualitativamente la mayor cantidad de producto de PCR, por medio de
210 una electroforesis en gel de agarosa. Las concentraciones óptimas para cada
211 pareja son las siguientes: Ca2 200nM, Ca5 200nM, Ca6 300nM, Ct1 100nM, Ct3
212 100nM, Ct5 200nM, Cp1 200nM, Cp2 600nM (Tabla 2, Tabla S2 y Fig. S2).

213 **Concentración de dNTPs óptima para PCR punto final**

214 Determinamos la concentración óptima de dNTPs para cada pareja de
215 oligonucleótidos, seleccionamos la concentración a la cual obtuvimos la mayor
216 cantidad (cualitativamente) de producto de PCR, por medio de electroforesis en
217 gel de agarosa. La concentración óptima para cada pareja fue de 50 µM.

218 **Los oligonucleótidos diseñados detectan cantidades pequeñas de ADN** 219 **específico por PCR punto final**

220 Utilizando cantidades decrecientes de ADN específico para cada pareja de
221 oligonucleótidos, determinamos por PCR punto final la cantidad mínima de ADN
222 genómico que pueden detectar de manera específica. Los productos de PCR los
223 visualizamos por medio de electroforesis en geles de agarosa utilizando un
224 quinceavo del volumen total de la reacción. Encontramos que para las pareja
225 utilizadas para la detección de *C. albicans* Ca2 y Ca5 se puede detectar hasta 1

226 ng y Ca6 puede detectar 0.1 ng. La pareja Cp1 utilizada para la detección de *C.*
227 *parapsilosis* detecta también una concentración mínima de 0.1 ng; la pareja Cp2 y
228 las parejas utilizadas para la detección de *C. tropicalis*, Ct1 y Ct5 detectan una
229 concentración mínima de 10 ng y Ct3 detecta 0.5 ng (Fig. 2 y Fig. S3).

230 **Cada pareja de oligonucleótidos es específica para su especie aún en**
231 **presencia de ADN genómico de otras especies de *Candida*.**

232 Para demostrar la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos
233 realizamos reacciones de PCR punto final con mezclas de ADN genómico de 10
234 especies de *Candida* filogenéticamente relacionadas, pero diferentes a la especie
235 que detecta cada pareja. A esta mezcla se añadieron concentraciones
236 decrecientes del ADN genómico específico de cada pareja de la siguiente manera.
237 Analizamos por PCR punto final diluciones de ADN genómico de *C. albicans*, *C.*
238 *tropicalis* y *C. parapsilosis* (100 ng, 10 ng y 1 ng). Cada una de las diluciones de
239 estas especies se retó con una mezcla de 500 ng totales de ADN genómico de 10
240 especies de *Candida* diferentes (50 ng de cada una). Cada pareja de
241 oligonucleótidos detectan la secuencia específica de la especie para la cual fueron
242 diseñados, aún en presencia de ADN genómico en exceso de otras especies
243 relacionadas. La cantidad de ADN genómico que detectamos por cada pareja de
244 oligonucleótidos en presencia de estas otras especies son: para las parejas Ca6,
245 Ct3 y Cp1 es de 1 ng; para las parejas Ca2 y Ca5 es de 10 ng; y para las parejas
246 Ct1, Ct5 y Cp2 detectan una concentración mínima de 100 ng (Fig. 3 y Fig. S4).
247 En este experimento no podemos determinar la cantidad mínima de ADN
248 genómico que podemos detectar para cada una de las 3 especies pues la cantidad

249 mínima de ADN que utilizamos fue de 1 ng y aún se pueden observar con claridad
250 los productos de amplificación (Fig. 3).

251 **Las parejas de oligonucleótidos seleccionadas detectan e identifican**
252 **correctamente las tres especies de *Candida* en aislados clínicos.**

253 Para evaluar la especificidad y sensibilidad de las 8 parejas de
254 oligonucleótidos seleccionadas, extrajimos ADN genómico de 52 aislados clínicos
255 para probarlos con cada una de las parejas. Los aislados clínicos provienen de
256 pacientes hospitalizados con diversas enfermedades clínicas. Inicialmente
257 evaluamos la pureza y calidad del ADN genómico extraído de cada aislado por
258 medio de amplificación de la región ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal con
259 oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (19) (Fig. 4A). Posteriormente
260 utilizamos los oligonucleótidos específicos en sus condiciones óptimas para la
261 detección e identificación de tres de las especies de *Candida* causantes de
262 infección por PCR punto final (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) (Fig. 4B).

263 Las parejas de oligonucleótidos Ca2 y Ca5 identificaron positivamente para
264 *C. albicans* los mismos 20 aislados clínicos, la pareja Ca6 identificó 19 de los 20
265 aislados para la misma especie. La pareja Ct3 identificó positivamente para *C.*
266 *tropicalis* 18 aislados clínicos, las parejas Ct1 y Ct5 solo identificaron 17 de los 18
267 aislados clínicos para *C. tropicalis*. Las dos parejas utilizadas para la detección de
268 *C. parapsilosis*, Cp1 y Cp2, identificaron las mismas 3 muestras positivas cada
269 una (Tabla 3).

270 De los 52 aislados clínicos se pudieron identificar alguna de las tres
271 especies en el 78.9% (41/52) de los aislados. Para la frecuencia de estas tres

272 especies, se encontró a *C. albicans* como la principal especie en un 38.5% (20/52)
273 de los aislados, a *C. tropicalis* en 34.6% (18/52), a *C. parapsilosis* en 5.8% (3/52) y
274 un 21.1% (11/52) de las muestras fueron negativas para los oligonucleótidos
275 diseñados, lo que sugiere que se trata de especies distintas a las tres especies de
276 *Candida* evaluadas en este estudio (Tabla 3).

277 **Las parejas de oligonucleótidos seleccionadas tienen una alta especificidad**
278 **y sensibilidad cuando se comparan con el método considerado el estándar**
279 **de oro, API ID32 C.**

280 Los resultados por PCR punto final se compararon con los resultados
281 obtenidos de los Hospitales de donde provienen los aislados clínicos, donde
282 realizaron la detección de la especie de *Candida* utilizando el método VITEK-2
283 (BioMerieux® SA).

284 De un total de 52 aislados clínicos, el 81% (42/52) de los resultados de
285 ambos métodos (PCR/VITEK-2) concuerdan, el 19% (10/52) de los resultados
286 entre ambos no concuerdan. Los aislados que no concuerdan (y otros 37 para un
287 total de 47), fueron analizados por un tercer método, API ID32 C (BioMerieux®
288 SA), y los resultados de éste método apoyaron los resultados obtenidos por PCR
289 punto final, con excepción del aislado AN27 que no fue detectado por PCR punto
290 final con ninguna de las dos parejas diseñadas para la detección de *C.*
291 *parapsilosis* pero por API ID32 C y por VITEK-2 se identificó como *C. parapsilosis*
292 (Tabla 4).

293 Para los 10 aislados clínicos cuya identificación por PCR no concuerda con
294 la obtenida por VITEK-2, encontramos los siguientes resultados: dos aislados

295 clínicos, AN43 y AN47, fueron identificados como *C. albicans* por VITEK-2, pero el
296 AN43 se identificó como *C. tropicalis* por las tres parejas de oligonucleótidos y el
297 aislado AN47 no es positivo con ninguna de las 8 parejas de oligonucleótidos, lo
298 que sugiere que se trata de una especie diferente a las tres especies analizadas
299 en este estudio. Cinco aislados clínicos, AN7, AN35 y AN42 se identificaron por
300 VITEK-2 como *C. tropicalis*. Sin embargo, por PCR dos de estos aislados los
301 identificamos como especies diferentes a *C. tropicalis*, AN7: *C. parapsilosis*, AN35
302 y AN42: *C. albicans*; los otros dos aislados, AN33 y AN41, no fueron identificados
303 por ninguna de las 8 parejas de oligonucleótidos, lo que sugiere que se trata de
304 especies diferentes a las tres especies detectadas por nuestras 8 parejas de
305 oligonucleótidos.

306 El aislado clínico AN27 se identificó por VITEK-2 como *C. parapsilosis*, pero
307 por PCR es negativo tanto con las dos parejas de oligonucleótidos para *C.*
308 *parapsilosis* como las otras parejas de las otras especies estudiadas lo que
309 sugiere que se trata de otra especie diferente a las tres evaluadas en este estudio.
310 Dos aislados clínicos identificados por VITEK-2 como otra especie diferente a las
311 evaluadas en este estudio (AN13: *C. lipolytica*; AN52: *C. glabrata*), no concuerdan
312 con los resultados de PCR. Ambos aislados son identificados por PCR, por 3
313 parejas de oligonucleótidos, como *C. tropicalis* (Tabla 5).

314 Al comparar los resultados de la PCR punto final con los de la prueba de
315 referencia API ID32 C realizada con un total de 47 aislados clínicos, encontramos
316 que, todos los resultados coinciden excepto uno (aislado AN27). Estos resultados
317 incluyen los aislados con los cuales no obtuvimos producto de amplificación con
318 ninguna pareja de oligonucleótidos, ya que resultaron ser otras especies distintas

319 a las 3 utilizadas en este trabajo. Al comparar los resultados de VITEK-2 con los
320 de la prueba de referencia API ID32 C realizada también los mismos 47 aislados
321 clínicos, encontramos que 10 resultados no coinciden (AN7, AN13, AN30, AN33,
322 AN35, AN41, AN42, AN43, AN47 y AN52).

323 Utilizando estos datos se determinó la sensibilidad y especificidad de cada
324 prueba. La sensibilidad y especificidad de la PCR punto final es de 98% y 100%,
325 respectivamente. La sensibilidad y especificidad de VITEK-2 es de 85% y 33%,
326 respectivamente.

327 **DISCUSIÓN**

328 En el presente trabajo, diseñamos oligonucleótidos específicos para la
329 detección de tres especies importantes de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C.*
330 *parapsilosis*, especies que se han reportado son las más frecuentes entre las
331 infecciones causadas por *Candida* (2). En trabajos anteriores se han reportado
332 secuencias específicas de especie, en su mayoría, secuencias en genes que
333 codifican para el ARN ribosomal (9, 13-15). Nuestras parejas de oligonucleótidos,
334 no descritas anteriormente, están diseñadas sobre secuencias específicas del
335 genoma de cada una de las tres especies, y estas no se encuentran en otras
336 especies de *Candida* ni en otros organismos.

337 Las condiciones para una reacción de PCR varían de acuerdo a la pareja de
338 oligonucleótidos utilizada. Determinar la temperatura óptima de hibridación,
339 concentración de oligonucleótidos y concentración de dNTPs, nos permiten
340 optimizar la amplificación única del producto deseado, demostrando así la
341 especificidad del método y da como resultado un producto que puede ser

342 visualizado fácilmente en un gel de agarosa, utilizando únicamente una mínima
343 cantidad del volumen total (un quinceavo). La mayoría de nuestros
344 oligonucleótidos detectan cantidades pequeñas de ADN genómico (> 0.5 ng), esto
345 aumenta la sensibilidad del método, por lo que nuestro método permite amplificar
346 la secuencia del ADN deseado a partir de pequeñas cantidades de ADN.
347 Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de ADN de otras especies
348 afecta ligeramente la eficiencia de la amplificación del producto deseado. Cabe
349 aclarar que estas condiciones son extremas y es poco probable encontrar en
350 muestras clínicas infecciones donde haya 100 a 500 veces mayor cantidad de
351 ADN de otras especies que podrían interferir con la detección de ADN por nuestro
352 método. Sin embargo, el hecho de que en presencia de una mezcla de ADN de
353 otras especies, nuestras parejas de oligonucleótidos amplifican específicamente (y
354 muy eficientemente) las secuencias de la especie sobre la cual fueron diseñados,
355 y no amplifican secuencias inespecíficas de otras especies, indica que los
356 oligonucleótidos son específicos para su especie. Es importante hacer notar que
357 no se obtiene producto de amplificación cuando el ADN para el cual fueron
358 diseñados los oligonucleótidos no se encuentra presente; y la cantidad del
359 amplicón específico obtenido en estas mezclas, depende de la concentración de
360 ADN molde de la especie que se desea detectar, lo que apoya fuertemente la idea
361 de que las parejas de oligonucleótidos son específicos.

362 De un total de 52 aislados clínicos provenientes de pacientes hospitalizados de
363 dos hospitales nacionales, se encontró a *C. albicans* como la especie más
364 frecuente, seguido por *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Con nuestro método

365 identificamos el 78.9% de los aislados clínicos. El porcentaje restante 21.1% no
366 pudo ser detectado por nuestras parejas de oligonucleótidos, lo que sugiere que
367 se trata de especies diferentes a las tres especies analizadas en este estudio. Al
368 analizar estos aislados clínicos que no pudieron ser identificados, con parejas de
369 oligonucleótidos diseñados específicamente para *C. glabrata* (Hernández-Howell
370 *et al.* manuscrito en preparación) 7.8% de estos aislados corresponde a *C.*
371 *glabrata*.

372 Al comparar todos los resultados que obtuvimos con este método de PCR punto
373 final con los resultados obtenidos por VITEK-2, el 81% de los resultados
374 concuerdan entre ambos métodos. El 19% restante, es discordante entre los dos
375 métodos, esto corresponde a 10 aislados clínicos. Estas muestras discordantes
376 las comparamos con el método bioquímico API (API ID32 C-Biomeriux)
377 considerado como “estándar de oro” (20). Los resultados de este tercer método
378 apoyan todos los resultados que obtuvimos por nuestro método PCR punto final,
379 con excepción de uno. Es decir nuestro método y el estándar de oro coinciden en
380 un 98% de las muestras probadas con ambos métodos (51/52).

381 El único caso discordante, es identificado por API ID32 C como la especie *C.*
382 *parapsilosis*. En estudios moleculares, realizados en la última década, han
383 reportado que hay otras dos especies genéticamente diferentes que se identifican
384 como *C. parapsilosis* por métodos tradicionales. Inicialmente se reportaron como
385 subgrupos (grupos II y III), pertenecientes al complejo *C. parapsilosis* (21) .
386 Actualmente se proponen como dos nuevas especies: *C. orthopsilosis* y *C.*
387 *metapsilosis* (22). Estas especies no han podido diferenciarse por métodos de
388 diagnóstico tradicionales, pero con las dos parejas de oligonucleótidos diseñados

389 en este estudio para *C. parapsilosis*, si podemos distinguir entre *C. parapsilosis* y
390 estas dos especies, ya que las 2 parejas solo identifican a la especie *C.*
391 *parapsilosis* cuando se prueban con estas tres especies. Basados en esto,
392 podemos sugerir que este aislado clínico se trata de una de estas dos especies,
393 que no puede ser diferenciada por API ID32 C o VITEK-2. Para confirmarlo,
394 planeamos amplificar los genes que codifican para el RNA ribosomal utilizando
395 oligonucleótidos universales y se secuenciará.

396 Al comparar los resultados de nuestro PCR y los de VITEK-2 realizado en los
397 laboratorios clínicos de cada hospital con los resultados de API ID32 C
398 determinamos la validez de nuestro método como prueba diagnóstica. La PCR
399 presenta una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica que VITEK-2, (99%
400 comparado con 85% y 100% comparado con 33% respectivamente (Fig. 5), por lo
401 que los resultados positivos por PCR punto final, individualmente para las tres
402 especies (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*), muy probablemente
403 corresponden con toda certeza a la especie identificada; y los resultados negativos
404 para estas tres especies, en todos los casos correspondieron efectivamente a
405 otras especies diferentes de las utilizadas en este estudio.

406 Tenemos planeado secuenciar los productos de PCR amplificados con nuestras
407 parejas de oligonucleótidos para asegurarnos de que cada producto amplificado
408 corresponde a la región del genoma correspondiente de cada una de las tres
409 especies.

410 Una gran ventaja de nuestro método de PCR punto final, es que podemos detectar
411 infecciones múltiples por estas tres especies (varias especies a la vez). A
412 diferencia de métodos bioquímicos como el API o VITEK, nuestro método de PCR

413 punto final es capaz de identificar cada una de las especies de manera específica
414 en una misma muestra cuando se utilizan las 8 parejas de oligonucleótidos (B. E.
415 González-Gómez e I. Castaño datos no publicados).

416 Los métodos convencionales toman varios días (48-120 horas) para dar un
417 resultado desde el primer aislamiento hasta su caracterización bioquímica; con
418 nuestro método podemos obtener resultados en aproximadamente 6 horas a partir
419 de un aislado clínico, tiempo que podría disminuir al analizar muestras clínicas
420 (orina o sangre) directamente por nuestro método y al optimizar un PCR-multiplex
421 que lleve a detectar varias especies en una sola reacción de PCR.

422 Utilizar una PCR punto final es mucho más barato y accesible que otros métodos
423 igualmente sensibles, por ejemplo el PCR en tiempo real, la secuenciación de
424 productos de amplificación de los genes de RNA ribosomal, ensayos de restricción
425 a partir de productos de PCR, necesitan de equipo y material más costoso y
426 personal altamente entrenado. Utilizar un PCR punto final elimina los errores
427 producidos en la interpretación y subjetividad de los métodos convencionales
428 como lo son la microscopía, los métodos cromogénicos y los métodos
429 bioquímicos.

430 Basado en los resultados obtenidos, podemos afirmar que nuestro método, PCR
431 punto final, es un método altamente sensible y específico, rápido y accesible, que
432 puede ser implementado en los laboratorios del sistema de salud para proveer
433 resultados en un menor tiempo y de mayor calidad, para proteger la vida de los
434 pacientes que padecen infecciones causadas por estas tres especies principales
435 de *Candida*.

436 **AGRADECIMIENTOS**

437 Al CONACyT por la beca otorgada (279071). Al IPICYT. Este proyecto fue
438 financiado con recursos otorgados a I. Castaño con el proyecto de Fondos
439 Sectoriales de Investigación en Salud (2011) No. 161971 y recursos otorgados a la
440 Lic. Hernández-Howell con el proyecto Emprendedurismo 2013-IPICYT No. S3946.

441 **REFERECIAS**

- 442 1. **Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei**
443 **AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM.** 2009. Epidemiology
444 and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective
445 antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis **48**:1695-1703. URL
446 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19441981>
- 447 2. **Pfaller MA, Diekema DJ.** 2010. Epidemiology of Invasive Mycoses in North
448 America. Critical Reviews in Microbiology **36**:1-53. URL
449 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20088682>
- 450 3. **Pappas PG.** 2006. Invasive candidiasis. Infectious disease clinics of North
451 America **20**:485-506. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984866>
- 452 4. **Peman J, Salavert M.** 2012. [General epidemiology of invasive fungal
453 disease]. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica **30**:90-98. URL
454 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079232>
- 455 5. **Pfaller M, Pappas, P.G., Wingard, J.R.** 2006. Invasive fungal pathogens:
456 current epidemiological trends. Clinical Infectious Diseases **43**:3-14. URL
457 http://cid.oxfordjournals.org/content/43/Supplement_1/S3.full
- 458 6. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond**
459 **MB.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of
460 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect
461 Dis **39**:309-317. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306996>
- 462 7. **Pfaller MA, Diekema DJ.** 2002. Role of sentinel surveillance of candidemia:
463 trends in species distribution and antifungal susceptibility. J Clin Microbiol
464 **40**:3551-3557. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130894/>

- 465 8. **Pfaller MA, Diekema DJ.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal
466 pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and
467 *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:4419-4431. URL
468 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC522363/>
- 469 9. **Ahmad S, Khan Z.** 2012. Invasive candidiasis: a review of nonculture-
470 based laboratory diagnostic methods. *Indian journal of medical microbiology*
471 **30**:264-269. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885190>
- 472 10. **Cortes A, Aguilar, A., Carrera, O., Juarez, S., Bazan, E. and Castanon,**
473 **L.** 2010. Sensibilidad y especificidad entre dos medios cromogenicos para
474 la identificacion de *Candida* spp. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia*
475 **30**:78-82. URL http://www.amimc.org.mx/revista/2010/30_3/sensibilidad.pdf
- 476 11. **Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D,**
477 **Lardy B, Lebeau B, Freney J, Ambroise-Thomas P, Grillot R.** 1996.
478 Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for
479 identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* **34**:1846-
480 1848. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229134/>
- 481 12. **Peman J, Zaragoza R.** 2010. Current diagnostic approaches to invasive
482 candidiasis in critical care settings. *Mycoses* **53**:424-433. URL
483 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627506>
- 484 13. **Luo G, Mitchell TG.** 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly
485 from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**:2860-2865. URL
486 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120665/>
- 487 14. **Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G.** 1997.
488 Identification of various medically important *Candida* species in clinical

- 489 specimens by PCR-restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol **35**:667-
490 672. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041409>
- 491 15. **Vijayakumar R, Giri S, Kindo AJ.** 2012. Molecular species identification of
492 Candida from blood samples of intensive care unit patients by polymerase
493 chain reaction - restricted fragment length polymorphism. Journal of
494 laboratory physicians **4**:1-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923914>
- 495 16. **Foongladda S, Mongkol N, Petlum P, Chayakulkeeree M.** 2014. Multi-
496 probe Real-Time PCR Identification of Four Common Candida Species in
497 Blood Culture Broth. Mycopathologia **177**:251-261. URL
498 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740169>
- 499 17. **Cormack BP, Falkow S.** 1999. Efficient homologous and illegitimate
500 recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*.
501 Genetics **151**:979-987. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049916>
- 502 18. **Ausubel F, R. Brent, R. E. Kingston, d. D. Moore, J. G. Seidman, J. A.**
503 **Smith, and K. Struhl.** (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. John
504 Wiley & Sons, Inc., ringbou edition, ISBN: 047150338X, NY., New York.
- 505 19. **White TJ, Bruns, T., Lee, S. and Taylor J.** 1990. Amplification and direct
506 sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322.
507 Academic Press, Inc, San Diego, USA. URL
508 <http://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- 509 20. **Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH.** 2006. Comparative study
510 of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older
511 fluorometric card and of CHROMagar Candida as a source medium with the

- 512 new card. J Clin Microbiol **44**:227-228. URL
513 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16390976>
- 514 21. **Lehmann PF, Lin D, Lasker BA.** 1992. Genotypic identification and
515 characterization of species and strains within the genus *Candida* by using
516 random amplified polymorphic DNA. J Clin Microbiol **30**:3249-3254. URL
517 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1452710>
- 518 22. **Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC.** 2005. *Candida*
519 *orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida*
520 *parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol **43**:284-292. URL
521 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC540126/>
522

523 **Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

No.	Nombre	Especie	Específico	Seleccionado
1401/1060	Ca1	<i>C. albicans</i>	-	No
1061/1062	Ca2	<i>C. albicans</i>	+	Sí
1287/1288	Ca3	<i>C. albicans</i>	-	No
1289/1290	Ca4	<i>C. albicans</i>	-	No
1291/1292	Ca5	<i>C. albicans</i>	+	Sí
1293/1403	Ca6	<i>C. albicans</i>	+	Sí
1063/1064	Ct1	<i>C. tropicalis</i>	+	Sí
1236/1237	Ct2	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1295/1402	Ct3	<i>C. tropicalis</i>	+	Sí
1297/1231	Ct4	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1230/1231	Ct5	<i>C. tropicalis</i>	+	Sí
1298/1231	Ct6	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1299/1300	Ct7	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1232/1233	Ct8	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1232/1301	Ct9	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1232/1302	Ct10	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1232/1304	Ct11	<i>C. tropicalis</i>	-	No
1283/1284	Cp1	<i>C. parapsilosis</i>	+	Sí
1285/1286	Cp2	<i>C. parapsilosis</i>	+	Sí

524 **Tabla 2. Oligonucleótidos seleccionados, sus condiciones óptimas para la**
 525 **PCR punto final y tamaño del producto amplificado.**

Espece de Candida	Pareja de Oligonucleótidos	Temperatura óptima de alineamiento (°C)	Concentración de oligonucleótidos óptima (nM)	Concentración de dNTPs (µM)	Tiempo de Extensión (segundos)	Tamaño del producto (pb)
<i>Candida albicans</i>	Ca2	67.6	200	50	15	202
	Ca5	63.5	200	50	15	203
	Ca6	60.8	300	50	11	173
<i>Candida tropicalis</i>	Ct1	64.4	100	50	15	217
	Ct3	60.1	100	50	15	224
	Ct5	65.5	200	50	17	254
<i>Candida parapsilosis</i>	Cp1	62	200	50	20	311
	Cp2	68.4	600	50	11	174

526 **Tabla 3. Número de aislados clínicos identificados por pareja de**
 527 **oligonucleótidos y su frecuencia un total de 52 aislados analizados.**

Especie	Pareja de oligonucleótido								Frecuencia
	Ca2	Ca5	Ca6	Cat1	Ct3	Ct5	Cp1	Cp2	
<i>C. albicans</i>	20	20	19						38.5%
<i>C. tropicalis</i>				17	18	17			34.6%
<i>C. parapsilosis</i>							3	3	5.8%
Otras especies*									21.1%

528 *Especies diferentes a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* no detectados
 529 por la PCR punto final por las ocho parejas de oligonucleótidos.

530 **Tabla 4. Comparación entre los resultados de la PCR y el método bioquímico**
531 **VITEK-2.**

Resultados entre PCR/VITEK-2	% correlación	Número de aislados clínicos
Concuerda ^a	81%	42/52
No concuerda	19%	10/52
	100%	52/52

532 ^a Incluye aislados identificados como positivos o negativos por ambos métodos
533 para las tres especies evaluadas en este estudio.

534 **Tabla 5. Resultados discordantes de 10 aislados clínicos detectados por**
 535 **PCR y VITEK-2, y analizados con el método API ID32 C considerado el**
 536 **estándar de oro.**

Aislado clínico	Identificado por:		
	PCR	API ID 32 C ^a	VITEK-2
AN7	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN13	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lipolytica</i>
AN27	Negativo ^{b, c}	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
AN33	Negativo ^b	<i>Geotrichum capitatum</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN35	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN41	Negativo ^b	<i>C. kefyri</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN42	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN43	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
AN47	Negativo ^b	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>C. albicans</i>
AN52	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>

537 ^a Lectura a las 24 y 48 horas.

538 ^b Negativo – No se pudo amplificar ningún producto al utilizar cada una de las ocho
 539 parejas de oligonucleótidos para la detección de las tres especies analizadas por
 540 PCR en este estudio (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*), por lo que
 541 decimos “negativo por PCR”.

542 ^c Especie *C. parapsilosis* no detectada con ninguna de las dos parejas de
 543 oligonucleótidos diseñadas para la detección de *C. parapsilosis*.

544

545

546

547

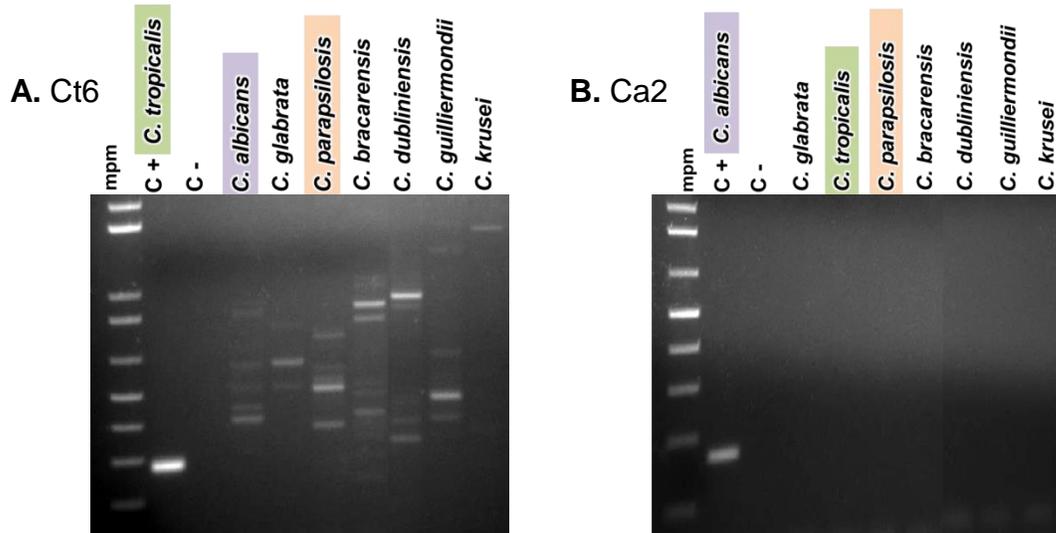
548

549

550

551

552



553

Fig. 1. Selección de las parejas de oligonucleótidos más específicos para la detección de la especie para la cual fueron diseñados.

554

555

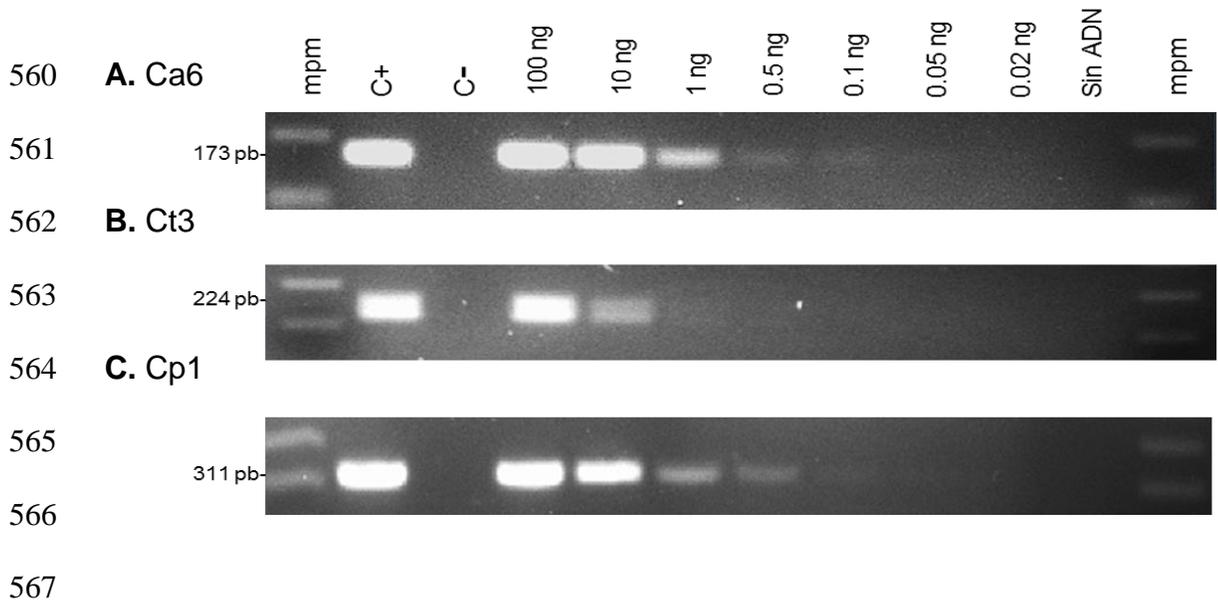
A. La pareja de oligonucleótidos Ct6 no fue seleccionada debido que mostró ser inespecífica al producir bandas de amplificación no deseada cuando se utilizó con otras especies diferentes a la que se desea detectar. **B.** La pareja de oligonucleótidos Ca2 sí se seleccionó debido a que demostró ser específica para la especie que se quería detectar con respecto a las demás especies.

556

557

558

559



568 **Fig. 2. Cantidad mínima de ADN genómico detectado por una pareja de**
 569 **oligonucleótidos de cada especie (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C.***
 570 ***parapsilosis*).**

571 **A.** La pareja de oligonucleótidos Ca6 para la detección de *C. albicans* detecta un
 572 mínimo de 0.1 ng de ADN genómico. **B.** La pareja de oligonucleótidos Ct3 para la
 573 detección de *C. tropicalis* detecta un mínimo de 0.5 ng de ADN genómico. **C.** La
 574 pareja Cp1 para la detección de *C. parapsilosis* detecta un mínimo de 0.1 ng de
 575 ADN genómico.

576

577

578

579

580

581

582

583

584

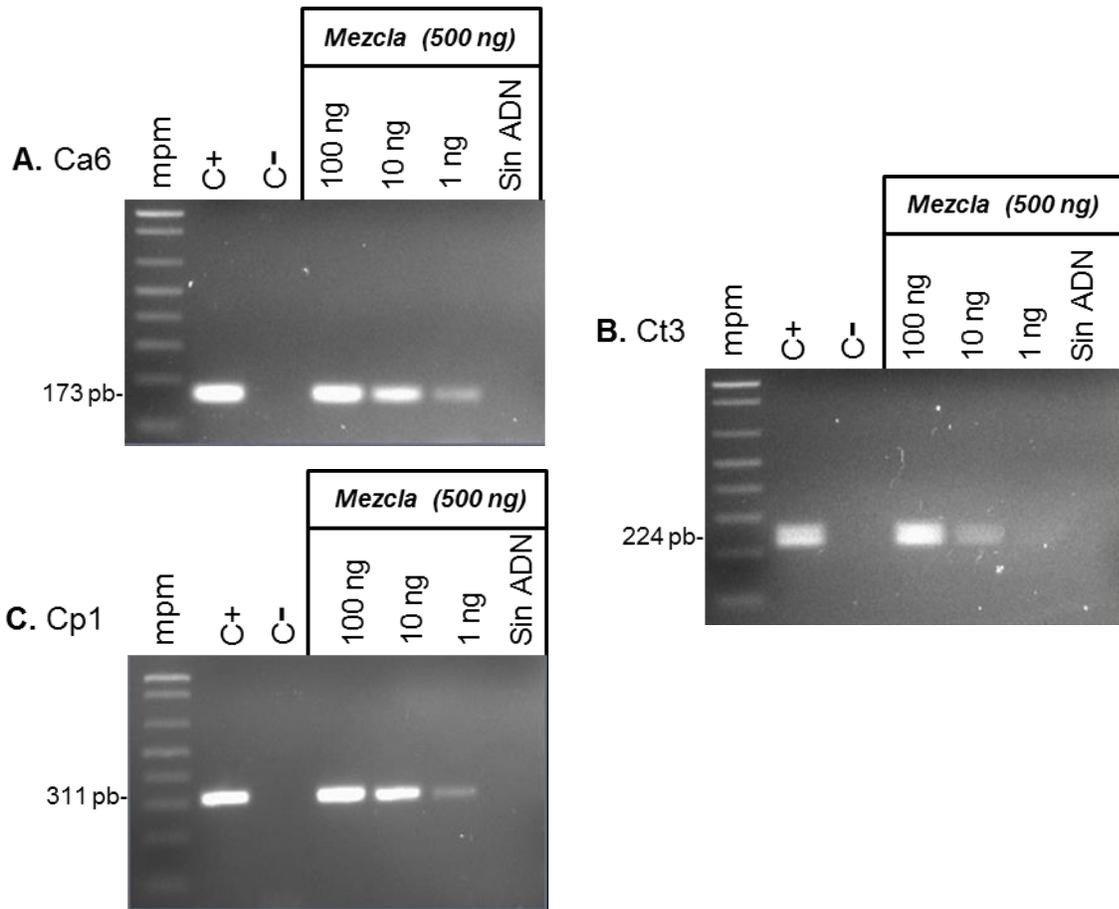
585

586

587

588

589



590

591

592

593

594

595

596

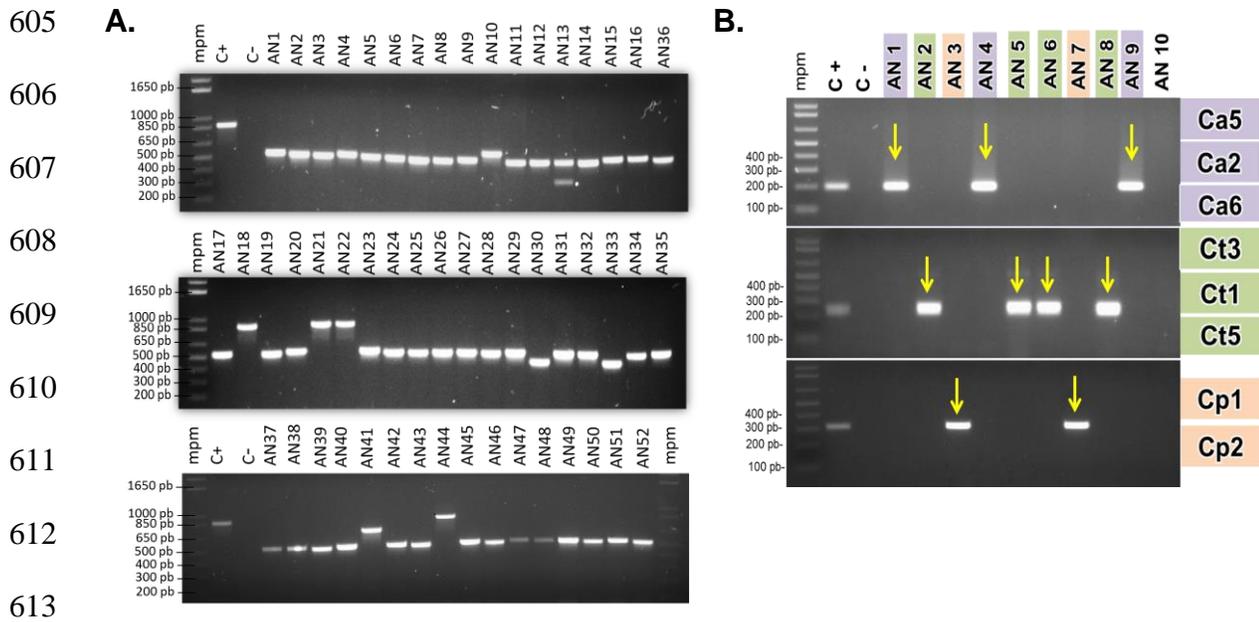
597

598

599

Fig. 3. Mezcla de ADN de varias especies frente a cantidades decrecientes de ADN específico para la pareja de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos especie-específicos seleccionados muestran especificidad aún en presencia de exceso de ADN de 10 especies de *Candida* relacionadas (50 ng de cada una). **A.** La pareja de oligonucleótidos Ca6 detecta al menos 1 ng de ADN genómico de *C. albicans* en presencia de una mezcla de 500 ng de ADN de otras especies. En ausencia de ADN genómico de *C. albicans* los oligonucleótidos no reconocen secuencias de ADN de otras especies. **B.** La pareja Ct3 detecta 1 ng del ADN genómico específico de *C. tropicalis* en presencia de una mezcla de 500 ng de ADN de otras especies. En ausencia de ADN genómico de *C. tropicalis* los

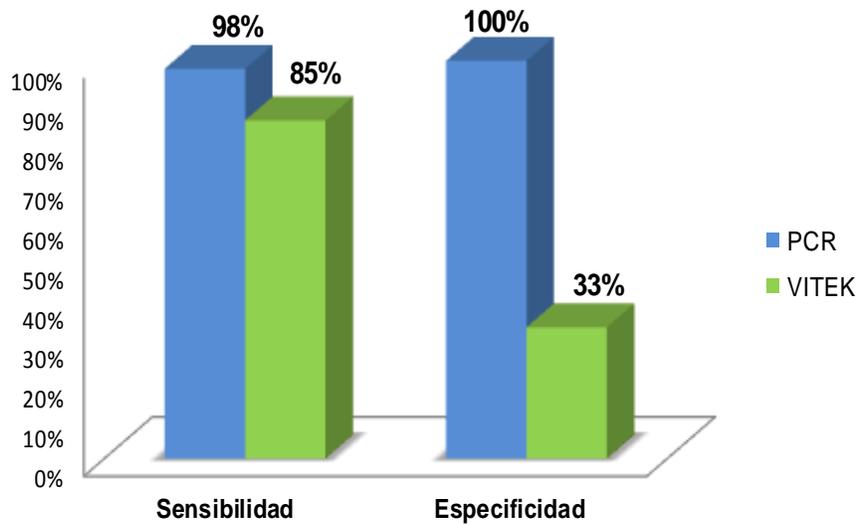
600 oligonucleótidos no reconocen secuencias de ADN de otras especies. **C.** La pareja
601 Cp1 detecta al menos 1 ng del ADN genómico específico de *C. parapsilosis* en
602 presencia de una mezcla de 500 ng de ADN de otras especies. En ausencia de
603 ADN genómico de *C. parapsilosis* los oligonucleótidos no reconocen secuencias
604 de ADN de otras especies.



614 **Fig. 4. Detección molecular e identificación de tres especies de *Candida* en**
 615 **52 aislados clínicos.**

616 **A.** Amplificación de las regiones ITS1 y ITS2 del ADN ribosomal de 52 aislados
 617 clínicos con oligonucleótidos universales para hongos ITS1 e ITS4. Se utilizó como
 618 control positivo a *C. glabrata* (BG14). **B.** Ejemplo de 10 de los 52 aislados clínicos,
 619 que fueron identificados para una de las tres especies de *Candida* para la cual se
 620 diseñaron los oligonucleótidos. En general, todas las parejas específicas de
 621 especie detectan las mismas muestras positivas. Los aislados clínicos AN1, AN4 y
 622 AN9 fueron identificados como *C. albicans*; los aislados AN2, AN5, AN6 y AN8
 623 fueron identificados como *C. tropicalis*; y los aislados AN3, AN7 fueron
 624 identificados como *C. parapsilosis*. El aislado AN10 no pudo ser detectado con
 625 ninguna de las 8 parejas de oligonucleótidos. Al utilizar VITEK-2 y API ID32 C
 626 (estándar de oro) indica que AN10 es un aislado de *C. guilliermondii*, por lo que no
 627 esperábamos amplificación de ningún producto con nuestros juegos de
 628 oligonucleótidos y la no amplificación es correcta.

629
630
631
632
633
634
635
636
637



638 **Figura 5. La PCR punto final presenta valores de sensibilidad y especificidad**
639 **más altos que VITEK-2 al compararlos con la prueba de referencia API ID32**
640 **C.**

641 La columna azul representa los valores de sensibilidad y especificidad para la
642 PCR punto final, 98% y 100% respectivamente, para la detección de las 3
643 especies analizadas en este estudio. Las columnas color verde representan los
644 valores de sensibilidad y especificidad para la prueba VITEK, 85% y 33%
645 respectivamente, para la detección de las 3 especies analizadas en este estudio.

646

Material Suplementario

647 **Tabla S1. Temperatura óptima de alineación para cada pareja de**
 648 **oligonucleótidos determinado por medio de un gradiente de temperatura.**

Especie de <i>Candida</i>	Pareja de Oligonucleótidos	Gradiente de Temperatura (°C)							
		Mínima ^a							Máxima
<i>Candida albicans</i>	Ca2	61	61.7	62.6	63.8	65.4	66.7	67.6^b	68
	Ca5	56	57.1	58.8	60.8	63.5^b	65.7	67.2	68
	Ca6	56	57.1	58.8	60.8^b	63.5	65.7	67.2	68
<i>Candida tropicalis</i>	Ct1	62	62.6	63.4	64.4^b	65.8	66.9	67.6	68
	Ct3	55	56.2	58	60.1^b	63.1	65.5	67.1	68
	Ct5	55	56.2	58	60.1	63.1	65.5^b	67.1	68
<i>Candida parapsilosis</i>	Cp1	60	60.8	61.9^b	63.2	65	66.5	67.5	68
	Cp2	56	57.1	58.8	60.8	63.5	65.7	67.2	68
		68	68.4^b	69	69.6	70.5	71.3	71.8	72

649 ^a Se seleccionó la temperatura mínima de alineamiento de los oligonucleótidos a la
 650 cual se observa una banda intensa en el gel cuando se carga un quinceavo del
 651 volumen total de la reacción (2 µL de 30 µL totales)

^b Temperatura seleccionada.

652 **Tabla S1. Concentración óptima de oligonucleótidos para PCR de cada pareja.**

653

Espece de <i>Candida</i>	Pareja de Oligonucleótidos	Concentración de oligonucleótidos evaluadas (nM)									Concentración óptima*
<i>Candida albicans</i>	Ca2	100	200	400	500	600	800	1000	1200	200 nM	
	Ca5	100	200	400	500	600	800	1000	1200	200 nM	
	Ca6	100	200	300	400	500	600	800	1000	1200	300 nM
<i>Candida tropicalis</i>	Ct1	100	200	400	500	600	800	1000	1200	100 nM	
	Ct3	100	200	400	500	600	800	1000	1200	100 nM	
	Ct5	100	200	400	500	600	800	1000	1200	200 nM	
<i>Candida parapsilosis</i>	Cp1	100	200	400	500	600	800	1000	1200	200 nM	
	Cp2	100	200	400	500	600	800	1000	1200	600 nM	

654 * Se seleccionó la concentración mínima de oligonucleótidos a la cual se observa
 655 una banda intensa en el gel cuando se carga un quinceavo del volumen total de la
 656 reacción (2 µL de 30 µL totales)

657

658

659

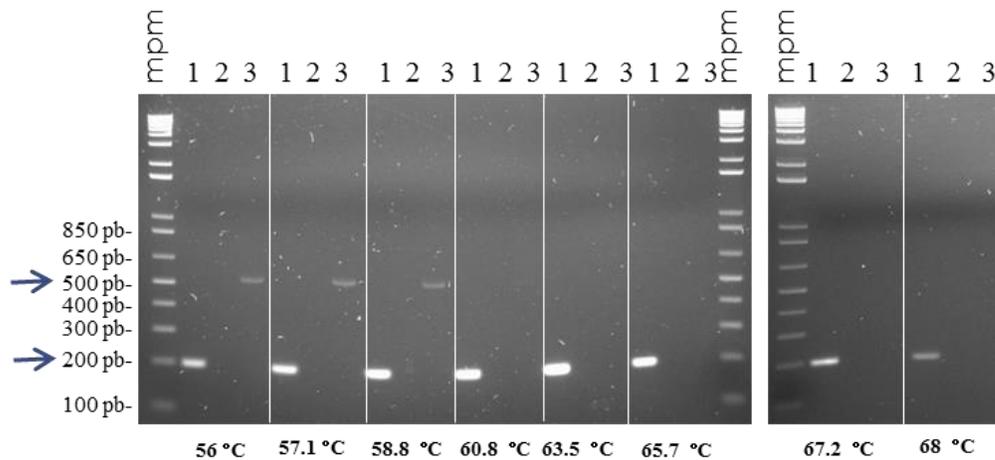
660

661

662

663

664



665

Fig. S1. Gradiente de temperatura para la selección de la temperatura

666

óptima de alineamiento de la pareja de oligonucleótidos.

667

Gradiente de temperatura para la detección de *C. albicans* (SC5314) utilizando la

668

pareja de oligonucleótidos **Ca5** como ejemplo. Control positivo, *C. albicans* (carril

669

1); Control negativo, sin ADN (carril 2). La banda inespecífica (carril 3) de la

670

especie *C. guilliermondii* va desapareciendo a medida que se aumenta la

671

temperatura de alineación de los oligonucleótidos. Para esta pareja de

672

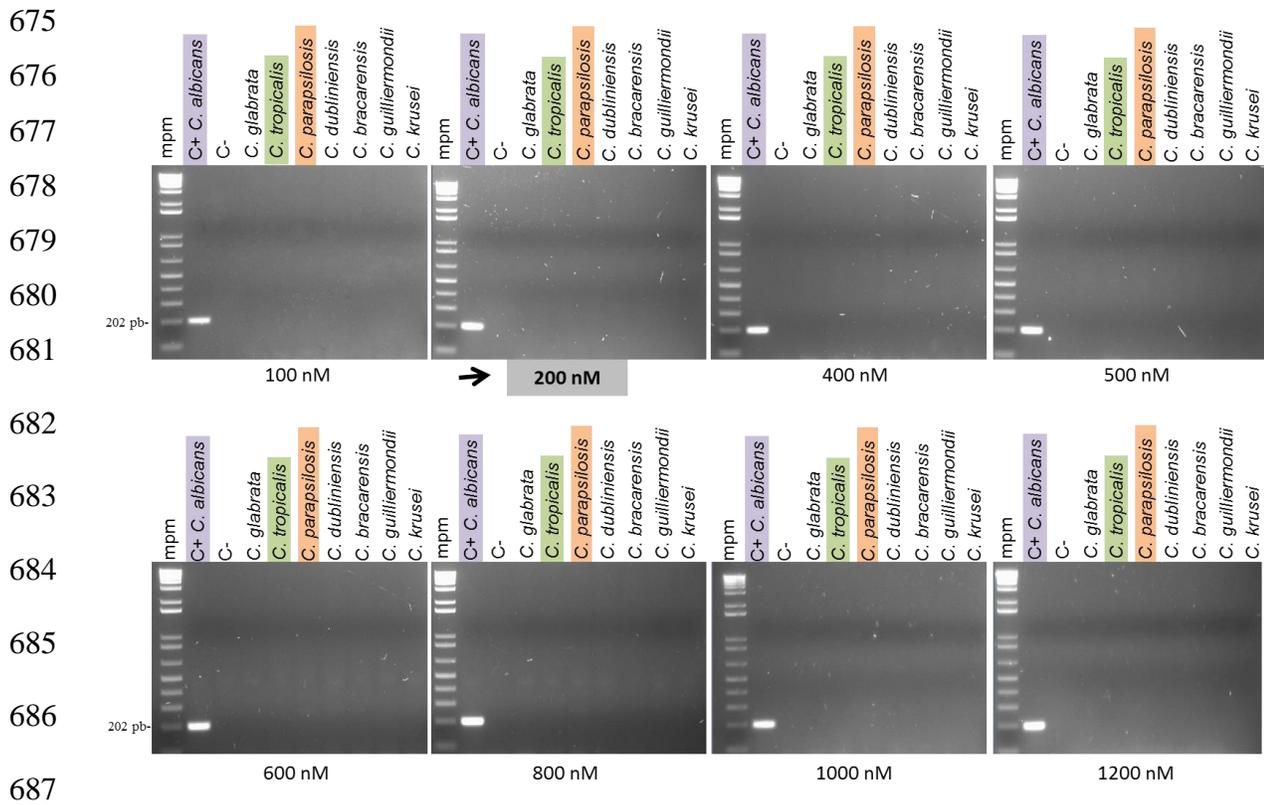
oligonucleótidos la temperatura óptima seleccionada es de **63.5 °C**. En la

673

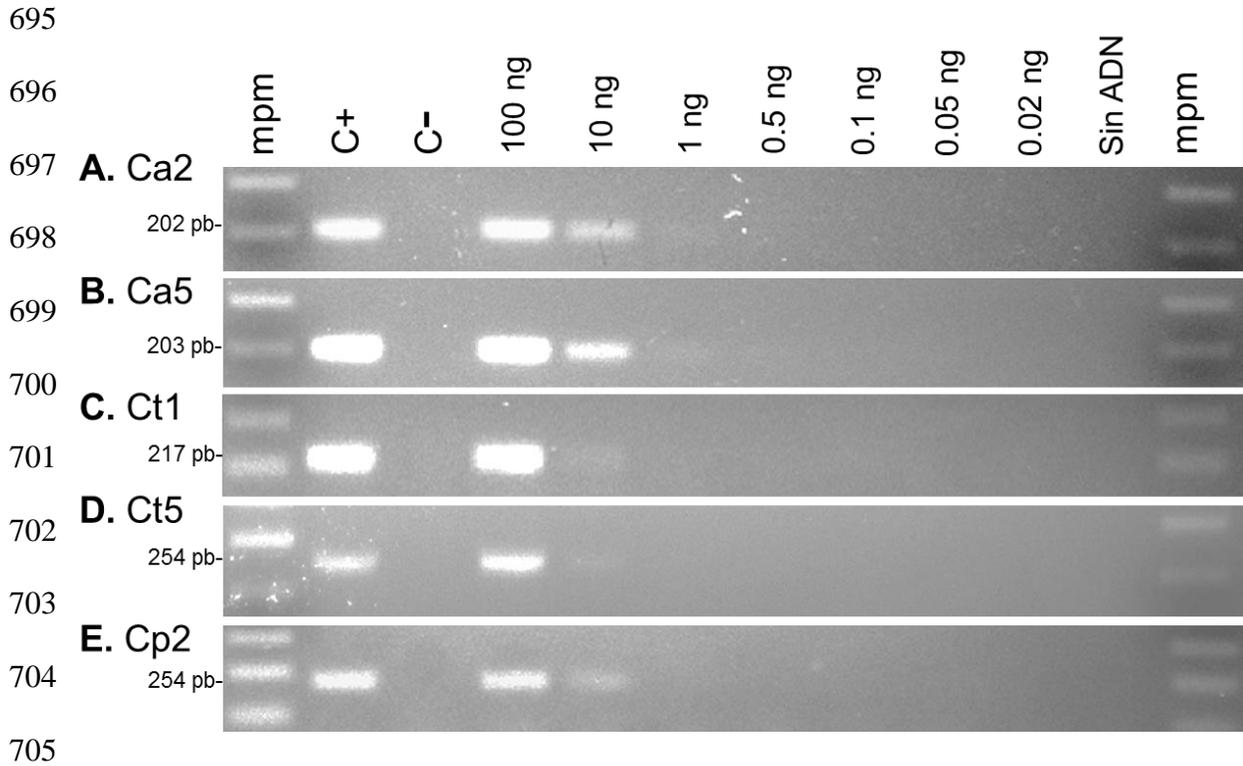
electroforesis, *C. guilliermondii* se corrió en una concentración 4 veces mayor a la

674

usada en los controles positivos.



688 **Fig. S2. Intervalo de concentraciones de oligonucleótidos evaluadas**
 689 **para cada pareja.** Se evaluaron concentraciones crecientes de cada pareja de
 690 oligonucleótidos específicos para cada una de las tres especies evaluadas (100
 691 nM, 200 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 800 nM, 1000 nM, 1200 nM). Se
 692 seleccionó la concentración mínima de oligonucleótidos que mostró ser óptima
 693 para la visualización del producto final de PCR (control positivo). En este caso,
 694 200 nM es la concentración óptima para la pareja Ca2.



706 **Fig. S3 Cantidad mínima de ADN genómico detectado por una pareja de**
 707 **oligonucleótidos de cada especie (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C.***
 708 ***parapsilosis*).**

709 La pareja de oligonucleótidos Ca2 **(A)** y Ca5 **(B)** para la detección de *C. albicans*
 710 detecta un mínimo de 1 ng de ADN genómico. La pareja de oligonucleótidos Ct1
 711 **(C)** y Ct5 **(D)** para la detección de *C. tropicalis* detecta un mínimo de 10 ng de
 712 ADN genómico. La pareja Cp2 **(E)** para la detección de *C. parapsilosis* detecta un
 713 mínimo de 10 ng de ADN genómico.

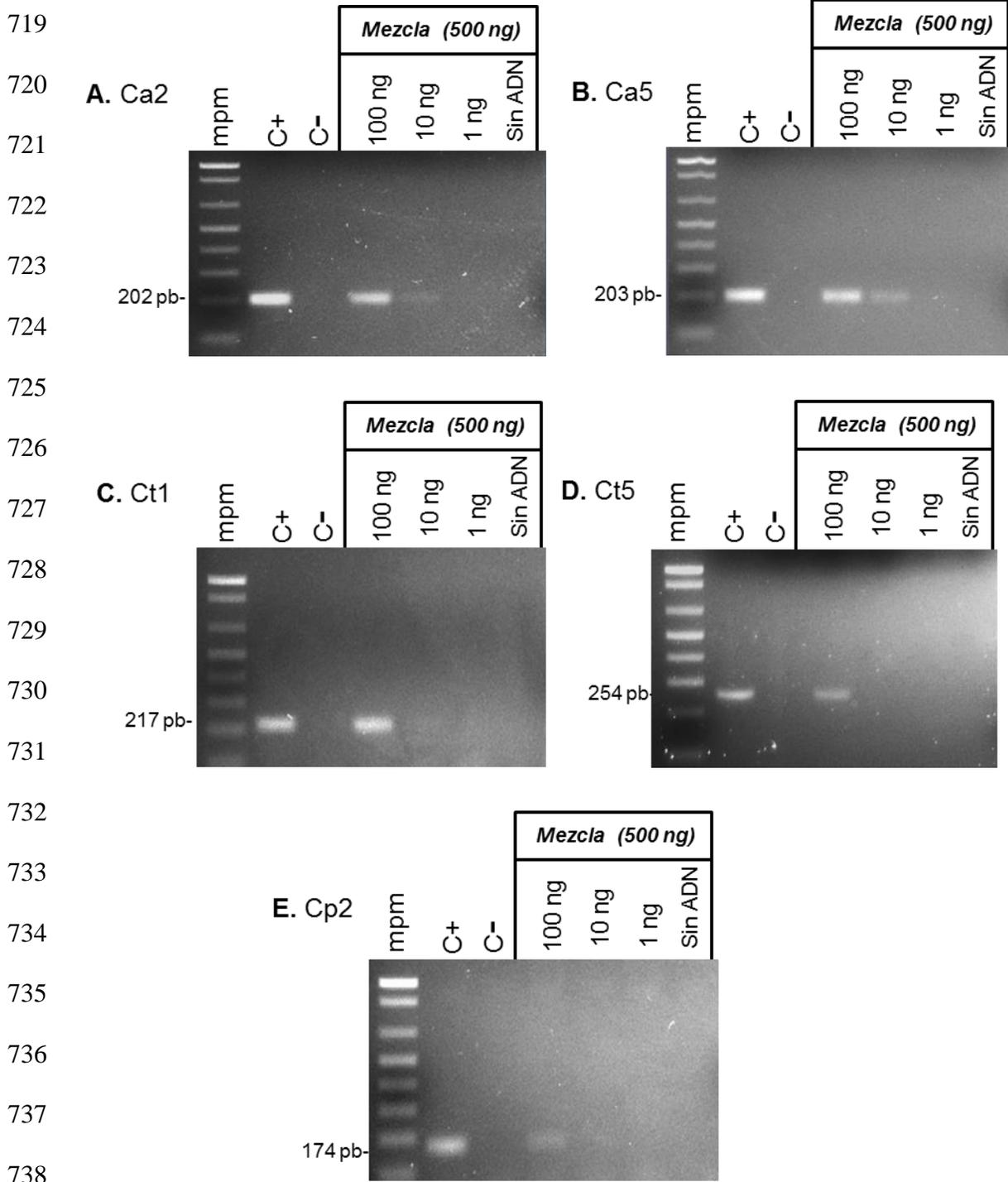
714

715

716

717

718



739 **Fig. S4. Mezcla de ADN de varias especies frente a cantidades decrecientes**
 740 **de ADN específico para la pareja de oligonucleótidos.** Los oligonucleótidos
 741 especie-específicos seleccionados muestran una alta especificidad aún en
 742 presencia de exceso de ADN de 10 especies de *Candida* relacionadas (500 ng).

743 Las dos parejas de oligonucleótidos utilizadas para la detección de *C. albicans*,
744 Ca2 **(A)**, Ca5 **(B)** y la pareja Ct1 para la detección de *C. tropicalis* detectan una
745 cantidad de ADN genómico específico de 10 ng en presencia de ADN de otras
746 especies. La pareja de oligonucleótidos Ct5 **(D)** utilizada para la detección de *C.*
747 *tropicalis* y la pareja Cp2 **(E)** para la detección de *C. parapsilosis* detectan una
748 cantidad de ADN genómico específico de 100 ng en presencia de ADN de otras
749 especies.