



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización molecular y fenotípica de aislados
clínicos secuenciales de *Candida glabrata*
pertenecientes a un mismo paciente**

Tesis que presenta

Martha Selene Herrera Basurto

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectoras del trabajo de tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización molecular y fenotípica de aislados clínicos de *Candida glabrata* pertenecientes a un mismo paciente**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Martha Selene Herrera Basurto** y aprobada el **9 de diciembre de 2020** 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 Cataño Navarro

Codirectora de la tesis

Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

Codirectora de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

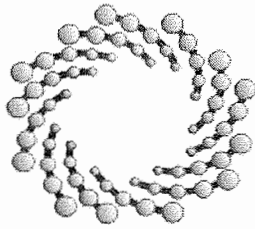
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo. Este trabajo fue apoyado por el proyecto CB 2014-239629.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 932042).



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 212 del Libro Segundo 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 9 días del mes de diciembre del año 2020, se reunió a las 10:00 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
Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo	Secretaria	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.

Martha Selene Herrera Basurto

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización molecular y fenotípica de aislados clínicos secuenciales de Candida glabrata pertenecientes a un mismo paciente

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:45 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 9 días del mes de diciembre de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A MI ESPOSO

Cesaré Moisés Ovando Vázquez con amor, por motivarme a crecer profesionalmente y por su apoyo incondicional en todo momento.

A MIS PADRES

*Moisés Herrera Guerrero y Martha Elena Basurto Solís
por su cariño y apoyo. Mi esfuerzo y corazón para ustedes siempre.*

Agradecimientos

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

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.**

A la **Dra. Irene Castaño** por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de microbiología molecular y por su constante apoyo y dirección en todas las etapas de este proyecto.

A la **Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo** por proporcionarme apoyo técnico y dirección en este proyecto.

A mi sinodal el **Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís** por su asesoría y contribuciones en este trabajo.

Al **Dr. Alejandro De Las Peñas** por sus comentarios y aportaciones en este proyecto.

A **Gloria López** por su ayuda con el material de trabajo en el laboratorio.

A mis **profesores de Biología Molecular** por orientar y compartir sus conocimientos, los cuales fueron parte importante en mi formación académica.

A todos mis **compañeros de generación y del laboratorio 6** por su compañía y amistad en esta enriquecedora experiencia.

A mi **familia** por su cariño y apoyo de siempre.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Copia del acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	5
Cepas de <i>Candida glabrata</i>	5
Extracción de DNA genómico de levaduras a partir de aislados clínicos	5
Ensayo de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)	5
Amplificación de Minisatélites en el gen <i>EPA1</i> de los aislados clínicos	6
Ensayo de microdilución en placa de susceptibilidad a fluconazol (FLC)	7
Análisis de Componentes Principales (PCA)	7
RESULTADOS	9
Selección de aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	9
Relación genética entre aislados clínicos secuenciales pertenecientes a un mismo paciente	9
Ensayo de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)	9
Identificación de Minisatélites (MS) en el gen <i>EPA1</i>	10
Susceptibilidad a fluconazol en aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i> pertenecientes a 10 pacientes	10
Análisis de PCA de los aislados clínicos de <i>Cg</i>	12
DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	17
REFERENCIAS	24
MATERIAL SUPLEMENTARIO	27

Lista de tablas

Tabla 1. Selección de aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i> pertenecientes a un mismo paciente	18
Tabla 2. Sensibilidad a fluconazol en aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	19

Lista de figuras

Figura 1. Los aislados provenientes de cada paciente muestran el mismo perfil molecular con RAPD y con los minisatélites de <i>EPA1</i>	20
Figura 2. Dendrograma de los marcadores moleculares de aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	21
Figura 3. Crecimiento de las cepas control utilizadas para el ensayo de susceptibilidad a FLC	22
Figura 4. Análisis de PCA de los aislados de <i>C. glabrata</i>	23

Anexos

Tabla S1. Condiciones de PCR utilizadas en la identificación de <i>C. glabrata</i>	27
Figura S1. Identificación molecular de <i>C. glabrata</i>	28
Figura S2. Perfiles moleculares obtenidos con RAPD y con los minisatélites de <i>EPA1</i> de los pacientes 6 al 10	29
Figura S3. Contribución de variables para la Dim1 y Dim2 de los análisis de PCA	30

Resumen

Caracterización molecular y fenotípica de aislados clínicos secuenciales de *Candida glabrata* pertenecientes a un mismo paciente

Candida glabrata se ha convertido en un patógeno fúngico humano frecuentemente aislado de infecciones del torrente sanguíneo. El éxito de *C. glabrata* como patógeno se debe en parte a la presencia de varios factores de virulencia como la alta resistencia al estrés oxidante, resistencia innata a los antifúngicos azólicos y la adherencia a dispositivos médicos y células epiteliales y endoteliales del hospedero. En este trabajo seleccionamos 34 aislados correspondientes a 10 pacientes. Para probar si todos los aislados del mismo paciente muestran el mismo genotipo, los caracterizamos genotípicamente mediante el ensayo de amplificación aleatoria de DNA polimórfica (RAPD, por sus siglas en inglés), con los oligonucleótidos OPA-09, OPA-18 y OPE-18, y también determinamos el tamaño de los minisatélites presentes en el gen *EPA1*. Todos los aislados de cada paciente muestra el mismo patrón con los marcadores de RAPD utilizados (clasificados en 4 genotipos) y el mismo tamaño de los minisatélites de *EPA1* (los cuales varían entre 800 a 1000 pb), lo cual sugiere fuertemente que el último aislado se deriva del aislado inicial de cada paciente. Determinamos la susceptibilidad a Fluconazol (FLC) utilizando el método estandarizado del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Encontramos que la mayoría de los aislados se clasifican como sensibles a FLC, aunque con diferentes dosis inhibitorias (MIC_{50}). En dos pacientes (P6 y P7) hubo una tendencia hacia el incremento en la MIC_{50} a FLC entre el primer aislado y el último aislado de cada paciente. Así mismo, el último aislado del paciente 1 (P1) mostró una disminución en la MIC_{50} respecto al primer aislado del P1. En conclusión, en este trabajo hemos encontrado que cada paciente estudiado posee una sola cepa de *C. glabrata* desde el inicio de la infección y que en algunos casos se pueden detectar cambios fenotípicos entre el primer y el último aislado de *C. glabrata* de un mismo paciente durante el transcurso de la infección. Encontramos que, en este grupo de aislados, el genotipo y la sensibilidad a FLC son independientes. Además, con el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), es posible identificar las tendencias de agrupación entre los aislados de *C. glabrata* clasificados por su resistencia a FLC.

PALABRAS CLAVE: *Candida glabrata*, aislados clínicos, RAPD, Fluconazol.

Abstract

Molecular and phenotypic characterization of sequential *Candida glabrata* clinical isolates from the same patient

Candida glabrata has become a human fungal pathogen frequently isolated from bloodstream infections. The success of *C. glabrata* as a pathogen is due in part to the presence of several virulence factors such as high resistance to oxidative stress, innate resistance to azole antifungals, and adherence to medical devices and host epithelial and endothelial cells. In this work we selected 34 isolates corresponding to 10 patients. To test whether all isolates from the same patient come from a single strain, we characterized them genotypically using the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) assay with oligonucleotides OPA-09, OPA-18 and OPE-18, and we also determined the size of the minisatellites within the *EPA1* gene. All the isolates from each patient displayed the same pattern with the RAPD markers used (classified into 4 genotypes) and the same size of the *EPA1* minisatellites (which vary between 800 to 1000 bp). This strongly suggests that the last isolate is derived from the initial isolate of each patient. We determined the susceptibility to Fluconazole (FLC) using the standardized method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). We found that most of the isolates are classified as sensitive to FLC, although with different inhibitory doses (MIC₅₀). In two patients (P6 and P7) there was a trend towards an increase in the MIC₅₀ to FLC between the first isolate and the last isolate from each patient. Likewise, the last isolate from patient 1 (P1) showed a decreased MIC₅₀ compared to the first isolate from P1. In conclusion, in this work we found that each patient studied was infected with a single strain of *C. glabrata* from the beginning of the infection and that in some cases phenotypic changes can be detected between the first and the last isolate from the same patient during the course of infection. We found that, in this group of isolates, the genotype and sensitivity to FLC are independent. Furthermore, with the Principal Component Analysis (PCA), it is possible to identify the clustering trends among the *C. glabrata* isolates classified by their resistance to FLC.

KEY WORDS: *Candida glabrata*, clinical isolates, RAPD, Fluconazole.

INTRODUCCIÓN

Los hongos patógenos son microorganismos saprófitos que han evolucionado a través de diversos mecanismos para sobrevivir en los mamíferos anfitriones, lo que ha convertido a las infecciones invasivas fúngicas en un problema de salud global (Ramana *et al.* 2013). Algunas especies de *Candida* son especies de hongos que pueden causar infecciones oportunistas del torrente sanguíneo (candidemia) y los principales factores de riesgo para que esto ocurra, incluyen el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, inmunosupresión del huésped y el uso de dispositivos médicos en cirugía (Pappas *et al.* 2018).

Entre las especies de *Candida* más relevantes se encuentran *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Estas especies son responsables de aproximadamente el 92% de las candidemias a nivel mundial (Magill *et al.* 2014). Si bien *C. albicans* se considera la especie aislada más comúnmente, varios estudios informan un aumento en la tasa de aislamiento de especies diferentes a *C. albicans*, como *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Pfaller and Diekema 2004; Guinea 2014)

Según el área geográfica estudiada, *C. glabrata* es la segunda o tercera especie de *Candida* aislada con mayor frecuencia (Guinea 2014). Esta alta incidencia puede explicarse parcialmente por la baja susceptibilidad innata de *C. glabrata* a los fármacos antimicóticos azólicos (Hee *et al.* 2009). En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio se analizaron 184 aislados pertenecientes a 101 pacientes de dos centros hospitalarios: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) e Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en el periodo de enero de 2017 a diciembre de 2018, se encontró un aumento de casi el doble en los casos de candidemia causada por *C. glabrata* (del 14 al 27.3%) respecto a un estudio del mismo hospital de 2008 a 2010 (Corzo-Leon *et al.* 2014). En este grupo de aislados encontramos que la especie más frecuentemente encontrada es *C. albicans* (28.2%), seguida de *C. glabrata* (27.3%),

C. parapsilosis (16.4%), *C. tropicalis* (13.6 %), y otras especies de *Candida* (14.5%) (Hernández-Carreón y Herrera-Basurto, datos no publicados).

Dos de los principales factores de virulencia que dota a *C. glabrata* de mayor viabilidad y patogenicidad dentro del hospedero son: (1) la capacidad de adhesión que en parte se debe a la alta variabilidad genómica en las regiones subteloméricas ricas en genes que codifican para proteínas de pared celular o CWPs (Cell Wall Proteins) por sus siglas en inglés y (2) la resistencia a antimicóticos. En *C. glabrata* se han identificado 81 genes que codifican para adhesinas, que son proteínas de la pared celular o CWPs por sus siglas en inglés (Xu *et al.* 2020). La mayoría de estos genes están localizados en regiones subteloméricas (Castaño *et al.* 2005). La familia más grande de CWPs es la familia de adhesinas Epa por sus siglas en inglés (Epithelial adhesin). Epa1 es la principal adhesina y media la adhesión a las células epiteliales, endoteliales e inmunes del hospedero mamífero. El número y la secuencia de los genes que codifican para las CWPs varía sustancialmente según la cepa (de Groot *et al.* 2013; Gómez-Molero *et al.* 2015; Vale-Silva *et al.* 2017) .

C. glabrata es de manera innata menos susceptible a los azoles que otras especies de *Candida* (Vale-Silva *et al.* 2013). De forma muy alarmante, en los Estados Unidos se ha reportado la resistencia a la clase de antifúngicos de las equinocandinas entre los aislados clínicos de *C. glabrata* que ya son resistentes a los azoles (Castanheira *et al.* 2016). El principal mecanismo descrito de resistencia adquirida a los azoles en aislados clínicos de *C. glabrata* es el aumento del flujo de salida del fármaco debido a la inducción de las bombas de flujo tipo ABC de medicamentos y otros xenobióticos. Esto generalmente se debe a mutaciones de ganancia de función (GOF, por sus siglas en inglés) dentro del gen *PDR1* que codifica para el factor de transcripción Pdr1, que es el responsable de la regulación positiva de las bombas de flujo tipo ABC de medicamentos, Cdr1, Cdr2 y Snq2. (Vale-Silva *et al.* 2013; Salazar *et al.* 2018). Estos trabajos iniciales encontraron que la aparición de aislados clínicos de *C. glabrata* resistentes a fluconazol, también resultó en un

aumento simultánea de la capacidad de adhesión de estos aislados más resistentes (Vale-Silva *et al.* 2013). En conjunto, estos datos sugieren una alta plasticidad genómica de *C. glabrata* para adaptarse a diversas condiciones ambientales en su hospedero que con frecuencia permiten un incremento en la capacidad de adhesión y simultáneamente un aumento en la resistencia a fluconazol (Poláková *et al.* 2009; Vale-Silva *et al.* 2017).

Actualmente se ha utilizado la secuenciación de DNA para realizar la comparación genómica entre aislados clínicos de *C. glabrata* (Ni *et al.* 2018; Carreté *et al.* 2019). En ausencia de información específica sobre la secuencia, es posible identificar polimorfismos en el tamaño de múltiples secuencias repetidas (mini y microsatélites) o mediante el uso de los marcadores conocidos como RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) para deducir la relación genética entre aislados (Cecilia Ruiz *et al.* 2009; Abbes *et al.* 2012).

En este trabajo nos interesa determinar si *C. glabrata* puede evolucionar dentro del paciente hacia la adquisición de factores de virulencia más eficientes para adaptarse y sobrevivir, tales como mayor resistencia a antimicóticos o mayor capacidad de adhesión, entre otras. Para ello seleccionamos aislados secuenciales de *C. glabrata* de un mismo paciente y, mediante la técnica de RAPD y la detección de polimorfismos de los minisatélites en el gen *EPA1*, determinamos la relación genética entre ellos. De esta manera establecimos que efectivamente los últimos aislados de cada paciente provienen del mismo aislado inicial correspondiente. Además, pudimos agrupar todos los aislados en cuatro genotipos distintos. Posteriormente realizamos ensayos de susceptibilidad a fluconazol de las series de aislados seleccionados.

Encontramos que los últimos aislados de dos pacientes, tienen una tendencia a presentar más resistencia a fluconazol que el aislado inicial correspondiente, además detectamos otro paciente del cual el último aislado disminuyó su resistencia a fluconazol respecto al primero. De acuerdo con la distribución de los aislados en

los análisis de PCA, identificamos diferencias y semejanzas entre los grupos de aislados clasificados como sensibles (S), sensibles dependiente de dosis (SDD) y resistentes (R).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de *Candida glabrata*

Cepas de referencia. Las cepas de referencia utilizadas en este trabajo fueron *C. glabrata* (BG14) (Cormack and Falkow 1999), *C. glabrata* CBS138 (ATCC 2001), CGM1094 *pdr1* Δ (*ura3* Δ ::*Tn903* G418^R *pdr1* Δ ::*hph*) cepa control sensible a fluconazol y CGM84 *hst1* Δ (*ura3* Δ ::*Tn903* G418^R *hst1* Δ) cepa control resistente a fluconazol.

Aislados secuenciales de *C. glabrata*. De la colección de aislados clínicos con la que cuenta el laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos, DBM, IPICYT se seleccionaron 34 aislados correspondientes a 10 pacientes con series de aislados consecutivos de *C. glabrata* (entre 2 y 8 según el caso). Para confirmar que estos aislados pertenecieran a *C. glabrata* se realizó el diagnóstico molecular por PCR con tres juegos de oligos especie-específicos diseñados en el laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos, DBM, IPICYT y utilizando el protocolo optimizado (Hernández-Howell 2014). Las condiciones de PCR utilizadas se encuentran en la Tabla S1.

Extracción de DNA genómico de levaduras a partir de aislados clínicos.

Las levaduras se inocularon en 3 mL de YPD líquido (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 2%) a 30 °C durante 24 h, con agitación constante. La extracción de DNA genómico (DNAg) se realizó mediante el método modificado descrito por Ausubel: lisis celular (acoplada al equipo Fast PrepTM), extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y precipitación con etanol (Ausubel, 2009). El DNAg se disolvió en un volumen final de 200 μ L de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8).

Ensayo de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD).

El ensayo de RAPD se realizó empleando los oligonucleótidos OPA-09 (5'-GGG TAA CGC C-3'), OPA-18 (5'-AGC TGA CCG T-3') y OPE-18 (5'-GGA CTG CAG A-3') (Baustista-Muñoz *et al.* 2003). Para cada reacción se utilizaron 20 ng de DNAg

y las concentraciones finales de cada componente fueron las siguientes: 4.5 μM para el oligonucleótido apropiado; dNTPs a 0.2 mM; MgCl_2 a 1.95 mM; buffer de reacción 1X; 2 μL de *Taq* DNA polimerasa (purificada en el laboratorio) y agua MilliQ para completar un volumen final de 20 μL .

Las condiciones de la reacción fueron desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 40 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento a 36°C por 1 min para los oligonucleótidos OPA-18 y OPE-18 y 37°C para OPA-09, extensión a 72 °C por 3 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C-100 Touch™ BIO-RAD.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System BIO-RAD). Con los patrones de banda obtenidos con cada reacción se construyeron matrices binarias, empleando como criterios: 1 para la presencia de banda y 0 para ausencia. Las matrices binarias generadas se utilizaron para calcular la distancia (euclidiana) entre aislados mediante el uso de la función *dist*. Esta matriz de distancia se utilizó para crear el dendrograma general de RAPD mediante el uso de la función *h clust* en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2020).

Amplificación de Minisatélites en el gen *EPA1* de los aislados clínicos.

Utilizamos los oligonucleótidos que alínean en el gen *EPA1* (No. 2059 EPA1@INT Fw 5'-CGA CTT CAA TGC ATA CTT CCT CCG-3' y No. 2060 EPA1@ INT Rv 5'-GGG TGC TAT GTA CCT TGC GAC ATG-3', colección del laboratorio) para amplificar la región de los minisatélites dentro de este gen en los aislados clínicos. Para la reacción se utilizaron 20 ng de DNAg y las concentraciones finales de cada componente fueron las siguientes: 0.25 μM para los oligonucleótidos; dNTPs a 0.03 mM; MgCl_2 a 1.5 mM; buffer de reacción 1X; 1.5 μL de *Taq* DNA polimerasa (purificada en el laboratorio) y agua MilliQ para completar un volumen final de 30 μL . Las condiciones de la reacción fueron desnaturalización inicial a 94 °C por 1min,

seguido de 30 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización a 94 °C por 15 s, alineamiento a 65°C por 20 s; extensión a 72 °C por 1 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C-100 Touch™ BIO-RAD. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System BIO-RAD).

Ensayo de microdilución en placa de susceptibilidad a fluconazol (FLC).

Para cuantificar la sensibilidad a fluconazol de los aislados clínicos y de las cepas control se utilizó el método modificado de microdilución en placa establecido por el instituto de estándares para el laboratorio y la clínica M27-A2 (CLSI, por sus siglas en inglés) (CLSI, 2002). Se inocularon las levaduras en 5 mL de YPD líquido a 30°C con agitación constante hasta llegar a fase estacionaria (48 h). Las células se ajustaron a una densidad óptica (OD) de 0.5 que corresponde a ± 1 por 10^7 células/mL de *C. glabrata*. Posteriormente se realizaron diluciones logarítmicas hasta obtener una suspensión celular de 1 por 10^4 células/mL. En una placa colmenar de 100 pozos (Oy Growth Curves Ab Ltd) se colocaron 150 μ L de la suspensión celular de 1 por 10^4 células/mL y 150 μ L de YPD con de las diferentes concentraciones de fluconazol (Diflucan® de Pfizer® 2 mg/mL) por cada pozo (0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 36.0, 40.0, 48.0, 56.0, 64.0, 80.0 y 96.0 μ g/mL). El crecimiento fue monitoreado en un equipo Bioscreen C system y se registraron lecturas a 580 nm cada 15 minutos a una temperatura de 35°C durante 24 horas. La concentración mínima inhibitoria del 50% del crecimiento (MIC₅₀, por sus siglas en inglés) fue calculada a partir del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) y la gráfica dosis-respuesta en el software GraphPad Prism (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA. Versión 8.0). Para visualizar la dinámica de crecimiento de las cepas control y de los aislados de *Cg* se graficaron las diferentes concentraciones de FLC y el AUC (Figura 3). El gráfico se construyó en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2020).

Análisis de Componentes Principales (PCA).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) de los aislados clínicos de *C. glabrata* con el fin de evaluar la variabilidad en los

datos obtenidos del ensayo de susceptibilidad a fluconazol. Se elaboró una tabla que incluye los siguientes elementos en cada columna: número de paciente, aislados de *C. glabrata* y cepas control, número de experimento (ya que cada aislado y cepa control se analizó por triplicado), concentraciones de FCL (0-96 µg/mL), AUC, MIC₅₀ y la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés) de la MIC₅₀. Las variables analizadas fueron: las diferentes concentraciones de FCL, AUC, MIC₅₀ y la SD de la MIC₅₀. El análisis de PCA se llevó a cabo en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2020), donde se utilizó la función *prcomp()* para el cálculo de los componentes principales, y se generó el gráfico con la función *fviz_pca_ind()*.

RESULTADOS

Selección de aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*.

De la colección de aislados clínicos de *Candida* spp con la que cuenta el laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos, DBM, IPICYT se seleccionaron 34 aislados correspondientes a 10 pacientes de los cuales se obtuvieron series de aislados secuenciales de *Candida glabrata* entre 2 y 8 según el caso (Tabla1). Inicialmente confirmamos que los 34 aislados seleccionados son efectivamente *C. glabrata* mediante el método de identificación molecular diseñado en el laboratorio de Microbiología Molecular, DBM, IPICYT (Hernández-Howell 2014), utilizando PCR con tres juegos de oligos especie-específicos que amplifican varios loci específicos para *C. glabrata*. Todos los aislados fueron positivos para *C. glabrata* (Figura 1S).

Relación genética entre aislados clínicos secuenciales pertenecientes a un mismo paciente.

En este trabajo utilizamos el ensayo de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) con los marcadores OPA-18, OPE-18 Y OPA-09 (Bautista-Muñoz *et al.* 2003) para investigar si todos los aislados de un mismo paciente provienen de mismo aislado inicial (y no de infecciones posteriores por una cepa distinta). Además, utilizamos los oligonucleótidos que alinean en el gen *EPA1* (EPA1@INT Fw y EPA1@ INT Rv, colección del laboratorio) para amplificar la región de los minisatélites dentro de este gen. El tamaño del fragmento que amplifica los minisatélites de *EPA1* es muy variable entre aislados clínicos de *C. glabrata*.

Ensayo de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD).

Realizamos el ensayo de RAPD para determinar la relación genética de los aislados secuenciales de cada paciente y entre los pacientes, en los 34 aislados consecutivos de *C. glabrata* procedentes de los 10 pacientes previamente seleccionados. Este método consiste en la amplificación aleatoria de segmentos de DNA genómico basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), utilizando solo un oligonucleótido corto (de 10 nucleótidos) y a temperaturas bajas de alineamiento (~36°C) (Williams *et al.* 1990). La Figura 1

muestra los diferentes perfiles moleculares obtenidos con los marcadores moleculares OPA-09, OPA-18 Y OPE-18 para los pacientes P1, P2, P3, P4 y P5.

Los perfiles moleculares de los pacientes 6 al 10 y el control negativo de las reacciones con cada marcador se muestran en la Figura S2. En el control negativo de las reacciones con los marcadores OPA-09, OPA-18 Y OPE-18 obtuvimos amplificación aleatoria de segmentos de DNA y no logramos identificar la fuente de contaminación. Sin embargo, estos patrones no coincidieron con ninguno de los perfiles generados en los aislados de los 10 pacientes ni con las cepas control BG14 y CBS138, que son los perfiles que utilizamos para generar las matrices y el árbol de relación filogenética.

Construimos un dendrograma general de RAPD utilizando las matrices generadas con cada uno de los tres marcadores. Se generaron cuatro genotipos principales donde el genotipo más común fue el número I, que se encontró en los pacientes P4, P8, P9, P10 y también en la cepa de referencia BG14. Los pacientes P1, P2, P7 y la cepa de referencia CBS138 se agruparon en el genotipo II. El genotipo III lo comparten los pacientes P5 y P6 y el P3 es el único que presentó el genotipo IV. Es importante enfatizar que todos los aislados correspondientes al mismo paciente mostraron el mismo genotipo (Figura 2).

Identificación de Minisatélites (MS) en el gen *EPA1*.

Además, determinamos el tamaño de los minisatélites presentes en el gen *EPA1* donde encontramos diferencias en el tamaño de las repeticiones en tándem dentro de este gen. Para las cepas de referencia BG14 y CBS138 el tamaño fue de 800 pb; para los pacientes P1, P2 y P5 de 900 pb y para el P3 de 1000 pb (Figura 1). Los pacientes 6 al 10 mostraron tamaños entre los rangos mencionados anteriormente (Figura S2).

Susceptibilidad a fluconazol en aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* pertenecientes a 10 pacientes.

Actualmente existen dos estándares independientes para determinar la susceptibilidad al antifúngico fluconazol (FLC) en especies de *Candida*: El método

M27-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) (CLSI 2002) y el método del Comité Europeo de la Evaluación de la Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés) (EUCAST, 2008). Estos métodos de microdilución en placa consisten en la preparación de placas que contienen pozos con el antifúngico en distintas concentraciones.

Posteriormente se inoculan cada uno de los pozos con una suspensión celular estandarizada del microorganismo en estudio. El crecimiento se monitorea de 24-48 horas y se determina la concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) del antifúngico de la cepa de interés. En este trabajo modificamos el método M27-A2 para utilizar el medio YPD en vez de RPMI-1640 y obtuvimos valores de concentraciones mínimas inhibitorias del 50% de crecimiento (MIC_{50}) similares a las reportadas previamente para las cepas de referencia: BG14 así como para las mutantes *pdr1* Δ (sensible a FLC) y *hst1* Δ (resistente a FLC) (Orta-Zavalza *et al.* 2013). Para determinar si se incrementó la sensibilidad a FLC entre aislados clínicos de *C. glabrata* pertenecientes a un mismo paciente en función del tiempo, realizamos el ensayo de susceptibilidad a FLC en 25 aislados pertenecientes a 10 pacientes; de los pacientes P7 y P8 solo se eligieron el primer y último aislado de su respectiva serie de aislados (Tabla 2). En la Figura 3 se muestra el crecimiento de las cepas de referencia; la mayoría de los aislados de *Cg* se distribuyen entre las cepas *pdr1* Δ (sensible) y BG14 (sensible dosis dependiente).

El aislado MC45 correspondiente al P1 lo clasificamos como sensible dependiente de dosis (SDD) y observamos una disminución en la MIC_{50} en el segundo aislado consecutivo (MC47). Los aislados correspondientes a los pacientes P2, P3, P4, P5, P6, P8, P9 y P10 se comportaron como cepas sensibles a fluconazol (S) sin cambios significativos entre el primero y el último de cada paciente. Los dos aislados analizados del P7 los clasificamos como resistentes a fluconazol (R), pero de forma muy interesante encontramos un incremento en la MIC_{50} entre el primer aislado AN374 ($50.23 \pm 9.40 \mu\text{g/mL}$) y el último AN378 ($61.92 \pm 13.02 \mu\text{g/mL}$). Al comparar los resultados de sensibilidad a FLC con el análisis RAPD no encontramos

correlación entre los genotipos y la susceptibilidad a FLC. En cada genotipo encontramos aislados con MIC₅₀ < 8 µg/mL considerados como sensibles a FLC. En el genotipo II se agruparon aislados con una MIC₅₀ < 8 µg/mL hasta 62 µg/mL.

Análisis de PCA de los aislados clínicos de *Cg*.

Hicimos un análisis de componentes principales utilizando como variables: las diferentes concentraciones de FCL, AUC, MIC₅₀ y la SD de la MIC₅₀ (Material y Métodos). En el primer componente (Dim1 52.1%, Dimensión 1 eje de las abscisas) de los aislados de *C. glabrata* se observó una distribución que se podría atribuir al grado de resistencia a FLC de cada aislado (Figura 4A). Los aislados AN374, AN378 y la cepa *hst1Δ* (que se clasifican como resistentes a FLC), se separaron de los aislados S y SDD cualitativamente, dada la distribución del PCA. Observamos que el aislado AN374 es más parecido a la cepa *hst1Δ* y que el aislado AN378 presenta mayor variabilidad y se diferencia de *hst1Δ*. El segundo componente (Dim2 40.9%, Dimensión 2 eje de las ordenadas) se interpretaría en relación a las diferentes concentraciones de FLC probadas en los aislados.

Se hizo un PCA solamente de los aislados S y SDD (Figura 4B) para poder distinguir mejor las posibles diferencias entre estos aislados. En el primer componente (Dim1 48.5%) como en el caso anterior, se observó una distribución que se podría atribuir al grado de resistencia a FLC de cada aislado. Observamos que los aislados AN755 y AN759 del paciente 10 (P10), de manera cualitativa se asemejan a la cepa *pdr1Δ*, sensible a FCL, dada la distribución del PCA. Los demás aislados se distribuyen en un gradiente entre las cepas *pdr1Δ* y BG14. El aislado AN542 clasificado como sensible tiene características similares con la cepa BG14 (SDD). El aislado MC45 (SDD) se distingue del grupo por no agruparse con el resto de los aislados. El segundo componente (PCA, Dim2 33.1%) se relacionaría con las diferentes concentraciones de FLC y al AUC de cada aislado. La contribución de cada variable tanto para la Dim1 como la Dim2 de los dos análisis de PCA se muestran en el material suplementario (Figuras S3A y S3B).

DISCUSIÓN

Candida glabrata es un patógeno fúngico oportunista frecuentemente aislado de infecciones del torrente sanguíneo. Entre los factores de virulencia que le permiten sobrevivir dentro del huésped se encuentra su alta capacidad de adherencia a células epiteliales y endoteliales, la resistencia innata a los antifúngicos azólicos y a estrés oxidante entre otros. Además, *C. glabrata* tiene una alta plasticidad genómica que podría ser un mecanismo de generar variabilidad en la población confiriéndole ventajas bajo condiciones de estrés dentro del hospedero (López-Fuentes *et al.* 2018). En este trabajo nos enfocamos a estudiar la variación en la evolución de *C. glabrata* dentro del paciente. Para ello primero identificamos series de aislados clínicos de un mismo paciente tomados a diferentes tiempos. En total seleccionamos 34 aislados correspondientes a 10 pacientes obtenidos durante los años 2005 al 2018.

En nuestro análisis de RAPD los aislados de mismo paciente presentaron el mismo patrón de bandas con una similitud mayor al 90%, de esta forma nos aseguramos que el último aislado de cada paciente proviene del primero y no de una segunda infección con una cepa diferente (Figura 2). Pinto y colaboradores (2004), encontraron un paciente que tuvo infecciones mixtas al identificar un perfil diferente de RAPD en un aislado de *C. albicans* 16 días después de la infección, por lo que el paciente pudo ser colonizado por especies con múltiples genotipos o infectado con una cepa genéticamente diferente. En un estudio similar realizado por Malek y colaboradores (2017) encontraron dos cepas idénticas de *C. glabrata* procedentes de diferentes pacientes, lo que evidencia una posible transmisión cruzada de estos patógenos. Esto muestra el complejo proceso dinámico de colonización de la levadura que pueden atribuirse a las microevoluciones promovidas por la colonización prolongada, y que su aparición depende de la estabilidad genética de las cepas en el entorno hospitalario.

En nuestro caso, los aislados de cada paciente provienen de una sola infección por lo que son series de aislados que nos permitirán evaluar los cambios que ocurrieron bajo las condiciones de alto estrés dentro del paciente. Obtuvimos que el genotipo IV correspondiente a los aislados del P3 fue el más divergente. El genotipo I fue el más frecuente pues se encontró en aislados de los pacientes P4, P9, P8, y P10. El genotipo más persistente fue el II dado que se encontró en aislados con más de 10 años de diferencia (febrero de 2005 a abril de 2015) en los pacientes P1, P2 y P7, lo que pone de manifiesto que es un genotipo común entre aislados clínicos de *C. glabrata*, con pequeños cambios evolutivos o que se encuentra como contaminante en el ambiente hospitalario.

Es de gran relevancia conocer los cambios evolutivos en las especies de *Candida* para el manejo clínico y tratamiento de las candidiasis, puesto que en el caso de *C. glabrata*, estos cambios pueden resultar en la adquisición de factores de virulencia como la resistencia a antimicóticos, producción de biopelículas, adhesión a distintos tejidos o resistencia al estrés oxidante.

En este trabajo encontramos que de los 10 pacientes que analizamos, en un caso, el último aislado del P1 tiene una menor MIC que el primero; si bien la diferencia resultó no ser estadísticamente significativa, si se puede observar una tendencia y es posible que este paciente no haya sido tratado con fluconazol. Por otra parte, hay dos pacientes (P6 y P7) cuyos aislados muestran una tendencia hacia una MIC mayor al FLC (Tabla 2). En pacientes inmunocomprometidos o con otros factores de riesgo de contraer candidemia, la infección se puede propagar a otros sitios anatómicos como el hígado, bazo, riñones, corazón y el cerebro (Kullberg and Arendrup 2015). Al respecto es interesante resaltar el caso del P7 cuyos aislados además de presentar una tendencia en el incremento de la MIC entre el primer y último aislado, encontramos la presencia de *C. glabrata* en el aislado AN376 obtenido de una muestra de orina y dos días posteriores al aislado inicial de un cultivo de sangre. Esto demuestra la diseminación de la infección del torrente sanguíneo hacia el sistema urinario.

En nuestro estudio, el 10% (1/10) de los pacientes presentó aislados resistentes a FLC, lo que concuerda con la frecuencia del 11.1% (1/9) reportados por Corzo-León y colaboradores (2014) en aislados obtenidos de los mismos centros hospitalarios. Además, estos datos se ajustan a lo reportado recientemente en un estudio realizado por Toda y colaboradores (2019) en los Estados Unidos, donde muestra que el 8.6% de los aislados analizados de *C. glabrata* son resistentes al FLC. En China el fluconazol es uno de los antifúngicos más utilizados frecuentemente y se ha reportado resistencia a FLC en el 16.5% de los aislados de *C. glabrata* (Hou *et al.* 2017).

Las diferencias en la frecuencia de aparición de cepas resistentes a FLC de *C. glabrata* pueden deberse en parte a las afecciones subyacentes de los pacientes analizados, así como a las diferencias en las prácticas clínicas, uso de antibióticos y antifúngicos. Es por esto que es importante mantener una vigilancia continua para detectar cepas resistentes a los antimicóticos para ayudar a establecer el tratamiento adecuado de cada paciente. En este estudio no encontramos correlación entre los genotipos y la susceptibilidad a fluconazol.

Las tendencias observadas dada la distribución de los aislados en los análisis de PCA, nos lleva a suponer que, si bien hay aislados que se clasifican dentro un mismo grupo como S, SDD y R (según lo establecido por el CLSI), la variabilidad en los aislados nos ayuda a identificar diferencias o semejanzas entre ellos.

En el caso del aislado MC45 (primero del paciente 1) que tiene una MIC más alta y que sí se separa del MC47 (último del paciente 1), la diferencia entre ambos podría atribuirse a cambios durante el tratamiento, por ejemplo, podría deberse a que en un inicio el paciente tuvo tratamiento con FLC, y que posteriormente se suspendió. En el paciente 7, especulamos que el aislado AN378 podría haber adquirido durante la infección alguna mutación, posiblemente en el gen *PDR1*. De manera que el aislado AN378 (que proviene del AN374) presentó cambios adaptativos, tal vez a causa de un tratamiento con FLC o bien por el uso de otro antifúngico del grupo de

los azoles. Para determinarlo, se mandará a secuenciar el gen *PDR1* de ambos aislados; de igual forma se realizará el análisis de sensibilidad a FLC de los aislados intermedios (entre los que se encuentra el aislado AN376 obtenido de un urocultivo), para poder realizar una comparación entre toda la serie de aislados de este paciente.

Resulta también de interés entender el caso particular del aislado AN542 (último del paciente 9) que, aunque también está clasificado como sensible a FLC, es más parecido a la BG14 (SDD) que a los dos aislados anteriores de ese paciente (AN511 y AN512).

Para poder detectar más cambios evolutivos de *C. glabrata* durante el curso de la infección, se plantea a futuro complementar este análisis incluyendo otras variables como la capacidad de adhesión a células epiteliales, resistencia a estrés oxidante y a otros fármacos, que nos ayuden a entender la variabilidad entre aislados y sus posibles repercusiones en cuanto a su virulencia.

La limitante de este trabajo reside en el análisis de un solo antimicótico (FLC) y en la carencia de información sobre los tratamientos recibidos o padecimientos subyacentes de los pacientes analizados.

CONCLUSIONES

Identificamos que los aislados secuenciales de cada paciente provienen del aislado inicial en cada caso y no de infecciones distintas posteriores, mediante el uso de los marcadores moleculares RAPD OPA-18, OPE-18 y OPA-09 y minisatélites en el gen *EPA1*.

Los 34 aislados se pueden clasificar en 4 grupos genotípicos. El genotipo más común fue el número I al cual pertenece la cepa de referencia BG14 y donde se agruparon los aislados de los pacientes P4, P8, P9 y P10. La cepa de referencia CBS138 y los pacientes P1, P2, P7 se agruparon en el genotipo II. El genotipo III lo comparten los pacientes P5 y P6. El genotipo IV corresponde solo al paciente 3.

Identificamos un incremento en la MIC₅₀ a fluconazol en el último aislado del paciente 7, de 50.23 en el primer aislado a 61.92 µg/mL en el último.

No hay correlación entre el genotipo y la sensibilidad a fluconazol entre los aislados secuenciales de cada paciente, es decir que la susceptibilidad al FLC es independiente del genotipo.

Se observan tendencias en la distribución del PCA de los aislados de *C. glabrata*. El aislado AN374, inicial del paciente 7, es más parecido a la cepa *hst1Δ* (R).

El aislado AN378, último del paciente 7, presenta mayor variabilidad y se diferencia de *hst1Δ* (R).

Los aislados AN755 y AN759 del paciente 10 son más parecidos a la cepa *pdr1Δ* (S).

El aislado AN542, último del paciente 9 y clasificado como sensible, tiene similitudes con la cepa BG14 (SDD).

El aislado MC45 (SDD) se diferencia de los aislados clasificados como sensibles y de la cepa BG14 (SDD).

El resto de los aislados sensibles se distribuyeron entre la cepa *pdr1Δ* (S) y BG14 (SDD).

Tabla 1. Selección de aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* pertenecientes a un mismo paciente.

No. Total de aislados	Paciente	No. Colección	Fecha	Fuente de aislamiento
1	P1	MC45	07-feb-05	No Especificado
2		MC47	15-feb-05	No Especificado
3	P2	MC64	22-abr-08	Orina
4		MC65	23-abr-08	Orina
5	P3	MC70	26-abr-08	Orina
6		MC67	27-abr-08	Orina
7		MC74	30-abr-08	Orina
8	P4	AN765	04-jun-12	Sangre
9		AN766	04-jun-12	Sangre
10		AN767	23-jun-12	Sangre
11	P5	AN230	16-nov-13	No Especificado
12		AN234	22-nov-13	No Especificado
13		AN236	01-dic-13	No Especificado
14	P6	AN264	17-mar-14	No Especificado
15		AN359	17-mar-14	No Especificado
16		AN360	17-mar-14	No Especificado
17		AN362	17-mar-14	No Especificado
18		AN363	17-mar-14	No Especificado
19		AN364	17-mar-14	No Especificado
20		AN365	22-mar-14	No Especificado
21		AN366	22-mar-14	No Especificado
22	P7	AN374	08-abr-15	Sangre
23		AN375	08-abr-15	Sangre
24		AN376	10-abr-15	Orina
25		AN377	10-abr-15	Sangre
26		AN378	10-abr-15	Sangre
27	P8	AN504	26-feb-16	Sangre
28		AN509	17-feb-16	Sangre
29		AN483	20-feb-16	Sangre
30	P9	AN511	01-jun-16	Sangre
31		AN512	03-jun-16	Sangre
32		AN542	03-jun-16	Sangre
33	P10	AN755	04-may-18	Sangre
34		AN759	07-may-18	Sangre

Tabla 2. Sensibilidad a fluconazol en aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*.

No. Total de aislados	Paciente	No. Colección	Fecha	MIC ₅₀ ug/mL	
1	P1	MC45	07-feb-05	9.90 ± 1.65	SDD
2		MC47	15-feb-05	6.68 ± 0.32	S
3	P2	MC64	22-abr-08	6.85 ± 0.57	S
4		MC65	23-abr-08	6.56 ± 0.52	S
5	P3	MC70	26-abr-08	5.14 ± 0.33	S
6		MC67	27-abr-08	4.63 ± 0.18	S
7		MC74	30-abr-08	4.63 ± 0.87	S
8	P4	AN765	04-jun-12	5.04 ± 0.16	S
9		AN766	04-jun-12	5.01 ± 0.34	S
10		AN767	23-jun-12	5.77 ± 0.85	S
11	P5	AN230	16-nov-13	5.60 ± 0.03	S
12		AN234	22-nov-13	7.53 ± 1.11	S
13		AN236	01-dic-13	6.24 ± 0.81	S
14	P6	AN264	17-mar-14	5.33 ± 0.64	S
15		AN359	17-mar-14	-	-
16		AN360	17-mar-14	-	-
17		AN362	17-mar-14	-	-
18		AN363	17-mar-14	-	-
19		AN364	17-mar-14	-	-
20		AN365	22-mar-14	-	-
21		AN366	22-mar-14	7.27 ± 0.74	S
22	P7	AN374	08-abr-15	50.23 ± 9.40	R
23		AN375	08-abr-15	-	-
24		AN376	10-abr-15	-	-
25		AN377	10-abr-15	-	-
26		AN378	10-abr-15	61.92 ± 13.02	R
27	P8	AN504	26-feb-16	3.81 ± 1.62	S
28		AN509	17-feb-16	3.88 ± 0.66	S
29		AN483	20-feb-16	4.52 ± 0.64	S
30	P9	AN511	01-jun-16	5.41 ± 0.72	S
31		AN512	03-jun-16	4.25 ± 0.97	S
32		AN542	03-jun-16	5.07 ± 1.85	S
33	P10	AN755	04-may-18	2.45 ± 0.37	S
34		AN759	07-may-18	2.37 ± 0.32	S
Cepas Control	<i>pdr1</i> Δ			2.42 ± 0.40	S
	BG14			7.49 ± 1.19	SDD
	<i>hst1</i> Δ			60.84 ± 6.85	R

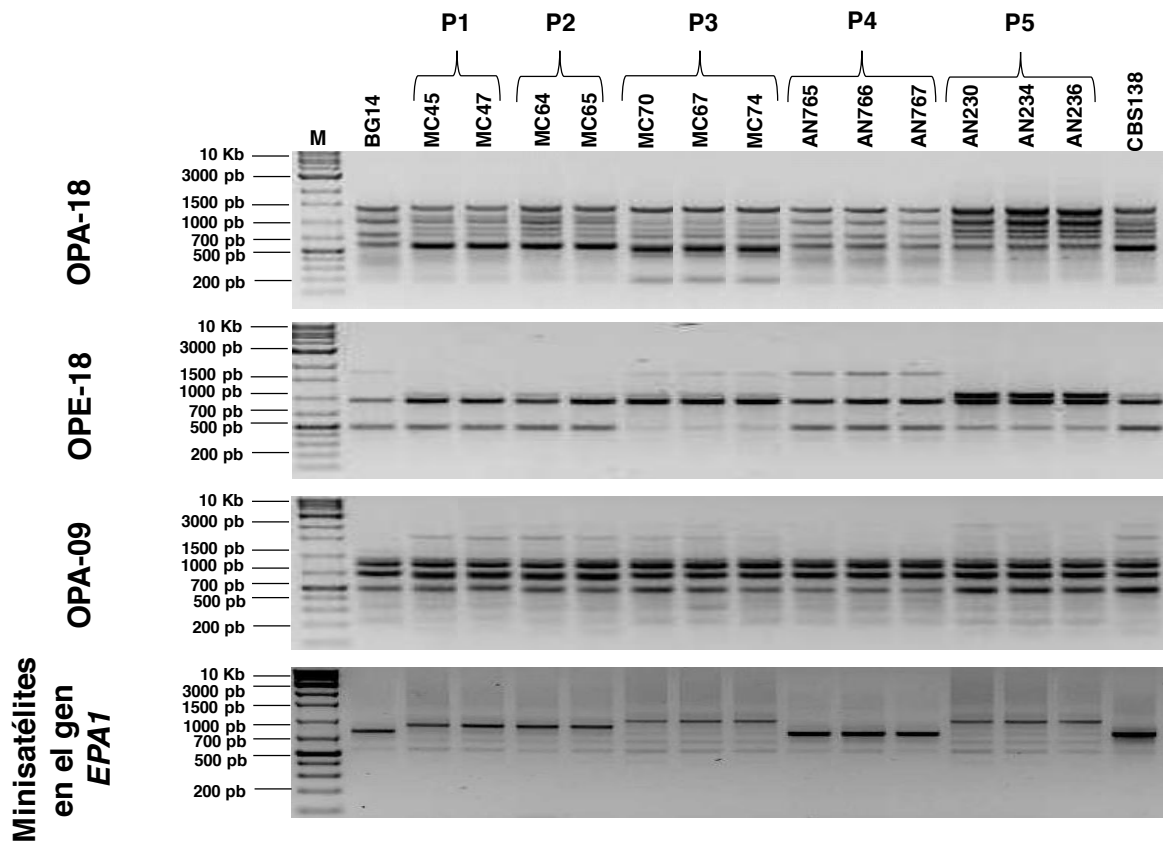


Figura 1. Los aislados provenientes de cada paciente muestran el mismo perfil molecular con RAPD y con los minisatélites de *EPA1*.

Geles de agarosa representativos de los pacientes 1, 2, 3, 4 y 5 que muestra los distintos perfiles moleculares de RAPD generados por los oligonucleótidos OPA-18, OPE-18, OPA-09 y Minisatélites en el gen *EPA1*. Los aislados correspondientes al mismo paciente mostraron el mismo perfil molecular para cada marcador utilizado.

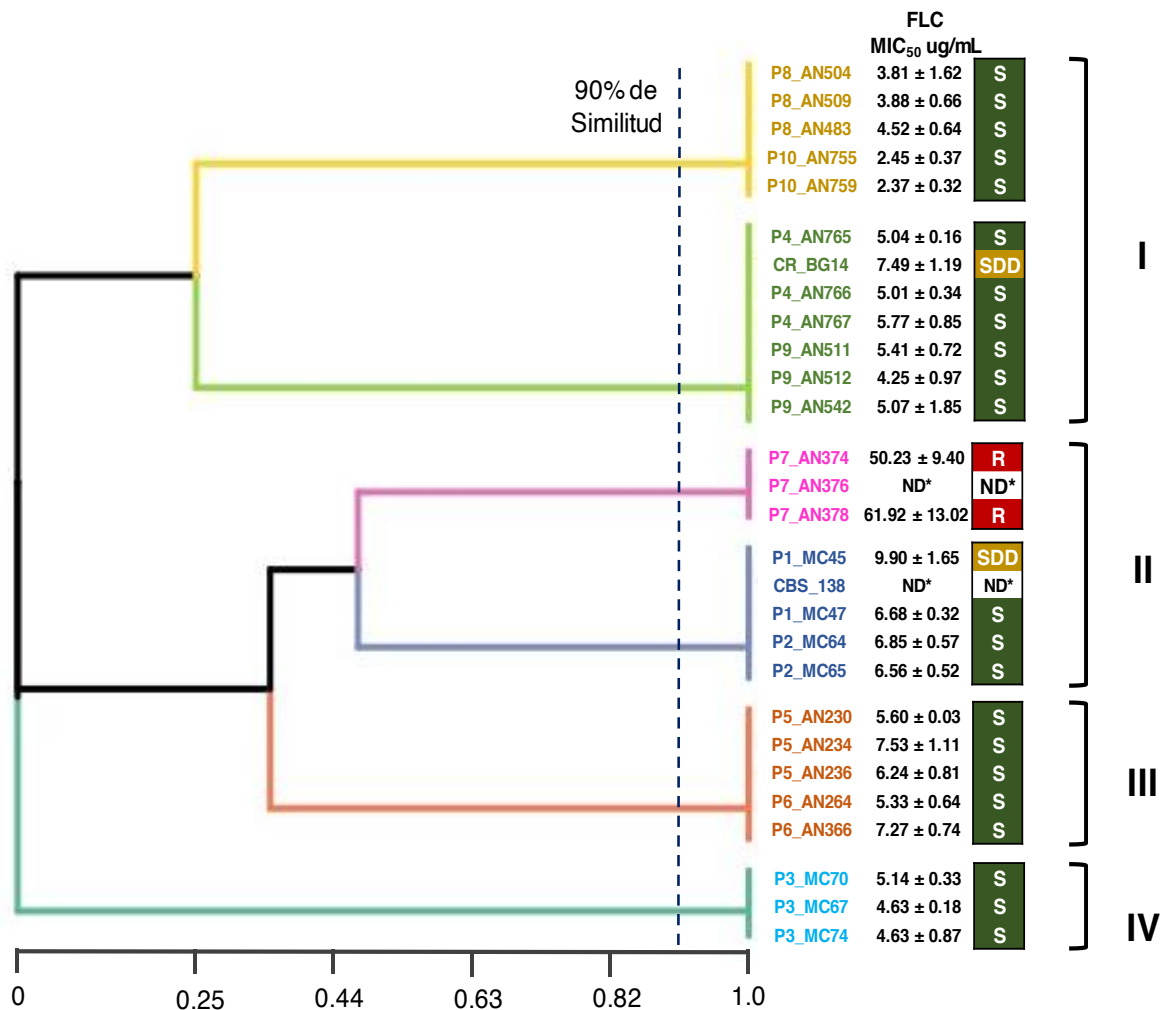


Figura 2. Dendrograma de los marcadores moleculares de aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*.

Dendrograma obtenido con los marcadores OPA-09, OPA-18 y OPE-18 en aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* correspondientes a 10 pacientes, incluye a las cepas de referencia (CR) BG14 y CBS138. A la derecha se encuentra la MIC₅₀ a fluconazol y los genotipos obtenidos. ND*= No hay Datos.

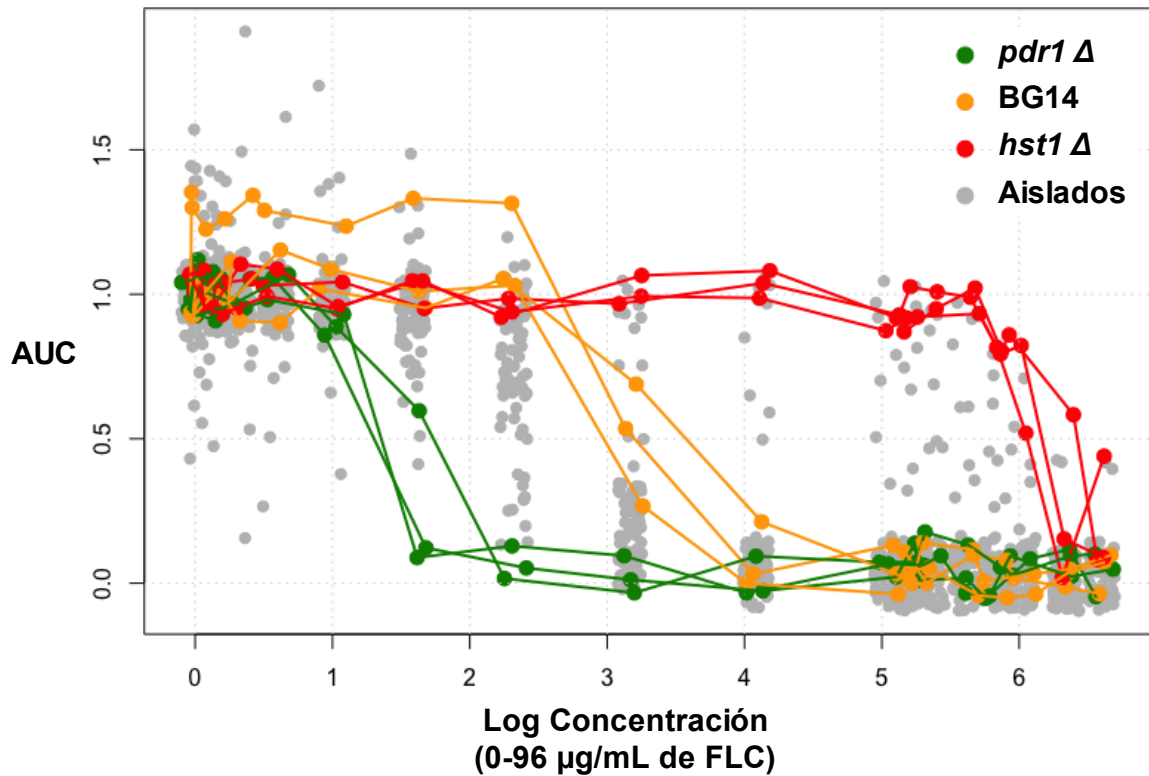


Figura 3. Crecimiento de las cepas control utilizadas para el ensayo de susceptibilidad a FLC.

En verde se muestra a la cepa *pdr1*Δ sensible a FLC, en naranja a la cepa BG14 sensible dependiente de dosis, en rojo a la cepa *hst1*Δ resistente a FLC y en gris a los demás aislados analizados de *Cg*. La mayoría de los aislados analizados se encuentran distribuidos entre la cepa *pdr1*Δ y BG14.

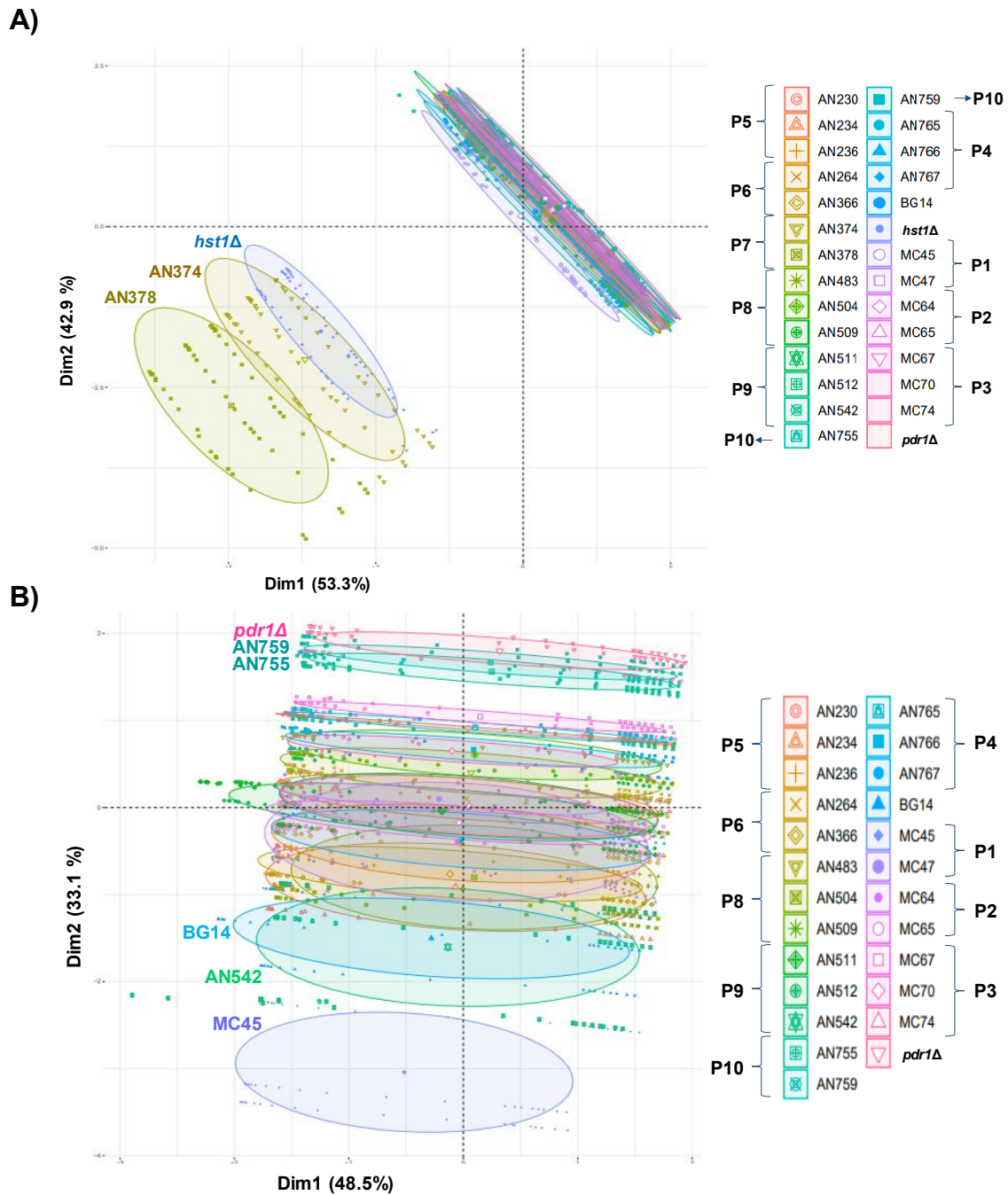


Figura 4. Análisis de PCA de los aislados de *C. glabrata*. A) PCA de todos los aislados de *Cg* generado a partir de las cuatro variables seleccionadas del ensayo de susceptibilidad a FLC. **B)** PCA de los aislados S y SSD. A la derecha de cada grafico se muestran los identificadores para cada aislado y el paciente al que corresponden. Cepas control: *pdr1Δ*, BG14 y *hst1Δ*.

REFERENCIAS

- Abbes S., H. Sellami, A. Sellami, I. Hadrich, I. Amouri, *et al.*, 2012 *Candida glabrata* strain relatedness by new microsatellite markers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1280-4>
- Ausubel, F. M. (2009). *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley.
- Bautista-Muñoz C., X. M. Boldo, L. Villa-Tanaca, and C. Hernández-Rodríguez, 2003 Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* 41: 414–420. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.414-420.2003>
- Carreté L., E. Ksiezopolska, E. Gómez-Molero, A. Angoulvant, O. Bader, *et al.*, 2019 Genome comparisons of *Candida glabrata* serial clinical isolates reveal patterns of genetic variation in infecting clonal populations. *Front. Microbiol.* 10: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00112>
- Castanheira M., S. A. Messer, P. R. Rhomberg, and M. A. Pfaller, 2016 Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY antifungal surveillance program (2013). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85: 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.009>
- Castaño I., S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon, *et al.*, 2005 Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* 55: 1246–1258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04465.x>
- Cecilia Ruiz A., D. Milena Calderón, and J. Enrique Gómez, 2009 Variabilidad molecular de aislamientos de *Candida* spp. por la técnica de polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) en mujeres de Armenia, Colombia. *Infectio.* [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(09\)70140-7](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(09)70140-7)
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard—second edition. NCCLS document M27-A2. ISBN 1-56238-469-4, 2002.
- Cormack B. P., and S. Falkow, 1999 Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151: 979–987. <https://www.genetics.org/content/151/3/979.long>
- Corzo-Leon D. E., T. Alvarado-Matute, A. L. Colombo, P. Cornejo-Juarez, J. Cortes, *et al.*, 2014 Surveillance of *Candida* spp bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097325>
- GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.
- Gómez-Molero E., A. D. de Boer, H. L. Dekker, A. Moreno-Martínez, E. A. Kraneveld, *et al.*, 2015 Proteomic analysis of hyperadhesive *Candida glabrata* clinical isolates reveals a core wall proteome and differential incorporation of adhesins. *FEMS Yeast Res.* 15: 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov098>
- Groot P. W. J. de, O. Bader, A. D. de Boer, M. Weig, and N. Chauhan, 2013

- Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryot. Cell* 12: 470–481. <https://doi.org/10.1128/EC.00364-12>
- Guinea J., 2014 Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect.* 20: 5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
- Hee K. C., J. J. Su, S. L. Han, S. C. Bum, H. C. Suk, *et al.*, 2009 Blood stream infections by *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a single-center experience. *Korean J. Intern. Med.* 24: 263–269. <https://doi.org/10.3904/kjim.2009.24.3.263>
- Hernandez-Howell Cesia, 2014. Detección Molecular Específica y Oportuna de Tres Especies de *Candida* Comunes en Infecciones Humanas: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Tesis de Maestría. https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/1504/1/TMIPICYT_H4D42014.pdf.
- Hou X., M. Xiao, S. C. A. Chen, F. Kong, H. Wang, *et al.*, 2017 Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida glabrata* in China (August 2009 to July 2014): a multi-center study. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00880>
- Kullberg B. J., and M. C. Arendrup, 2015 Invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1315399>
- López-Fuentes E., G. Gutiérrez-Escobedo, B. Timmermans, P. Van Dijck, A. De Las Peñas, *et al.*, 2018 *Candida glabrata*'s genome plasticity confers a unique pattern of expressed cell wall proteins. *J. Fungi* 4: 67. <https://doi.org/10.3390/jof4020067>
- Magill S. S., J. R. Edwards, W. Bamberg, Z. G. Beldavs, G. Dumyati, *et al.*, 2014 Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N. Engl. J. Med.* 370: 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa130680>
- Małek M., P. Paluchowska, B. Bogusz, and A. Budak, 2017 Molecular characterization of *Candida* isolates from intensive care unit patients, Krakow, Poland. *Rev. Iberoam. Micol.* <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.005>
- Ni Q., C. Wang, Y. Tian, D. Dong, C. Jiang, *et al.*, 2018 CgPDR1 gain-of-function mutations lead to azole-resistance and increased adhesion in clinical *Candida glabrata* strains. *Mycoses.* <https://doi.org/10.1111/myc.12756>
- Orta-Zavalza E., G. Guerrero-Serrano, G. Gutiérrez-Escobedo, I. Cañas-Villamar, J. Juárez-Cepeda, *et al.*, 2013 Local silencing controls the oxidative stress response and the multidrug resistance in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* 88: 1135–1148. <https://doi.org/10.1111/mmi.12247>
- Pappas P., Lionakis S., Arendrup M. O.-Z. L. and K. B., 2018 Invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 30: 103–124. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>
- Pfaller M. A., and D. J. Diekema, 2004 Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond. *Society* 42: 4419–4431. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4419>
- Pinto P. M., M. A. Resende, C. Y. Koga-Ito, and M. Tendler, 2004 Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000200006>
- Poláková S., C. Blume, J. Á. Zárate, M. Mentel, D. Jørck-Ramberg, *et al.*, 2009

- Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 2688–2693. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809793106>
- Ramana K. V, S. Kandi, V. Bharatkumar P, C. V Sharada, R. Rao, *et al.*, 2013 Invasive fungal infections: a comprehensive review. Am. J. Infect. Dis. Microbiol. <https://doi.org/10.12691/ajidm-1-4-2>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Salazar S. B., C. Wang, M. Münsterkötter, M. Okamoto, A. Takahashi-Nakaguchi, *et al.*, 2018 Comparative genomic and transcriptomic analyses unveil novel features of azole resistance and adaptation to the human host in *Candida glabrata*. FEMS Yeast Res. 18: 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox079>
- Toda M., S. R. Williams, E. L. Berkow, M. M. Farley, L. H. Harrison, *et al.*, 2019 Population-based active surveillance for culture-confirmed candidemia - four sites, United States, 2012-2016. MMWR. Surveill. Summ. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6808a1>
- Vale-Silva L., F. Ischer, S. Leibundgut-Landmann, and D. Sanglard, 2013 Gain-of-function mutations in *PDR1*, a regulator of antifungal drug resistance in *Candida glabrata*, control adherence to host cells. Infect. Immun. 81: 1709–1720. <https://doi.org/10.1128/IAI.00074-13>
- Vale-Silva L., E. Beaudoin, V. D. T. Tran, and D. Sanglard, 2017 Comparative genomics of two sequential *Candida glabrata* clinical isolates. G3 Genes, Genomes, Genet. 7: 2413–2426. <https://doi.org/10.1534/g3.117.042887>
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey, 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Xu Z., B. Green, N. Benoit, M. Schatz, S. Wheelan, *et al.*, 2020 De novo genome assembly of *Candida glabrata* reveals cell wall protein complement and structure of dispersed tandem repeat arrays. Mol. Microbiol. <https://doi.org/10.1111/mmi.14488>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Condiciones de PCR utilizadas en la identificación de *C. glabrata*.

	Juegos de Oligonucleótidos específicos para la detección de <i>Candida glabrata</i>		
	Cg1	Cg2	Cg3
Temperatura de desnaturalización	94°C	94°C	94°C
Temperatura de alineación	59°C	67.1°C	63.4°C
Temperatura de extensión	72°C	72°C	72°C
Número de ciclos	30	30	30
Tamaño del producto	136 y 140 pb	327, 348 y 363 pb	601 y 664 pb

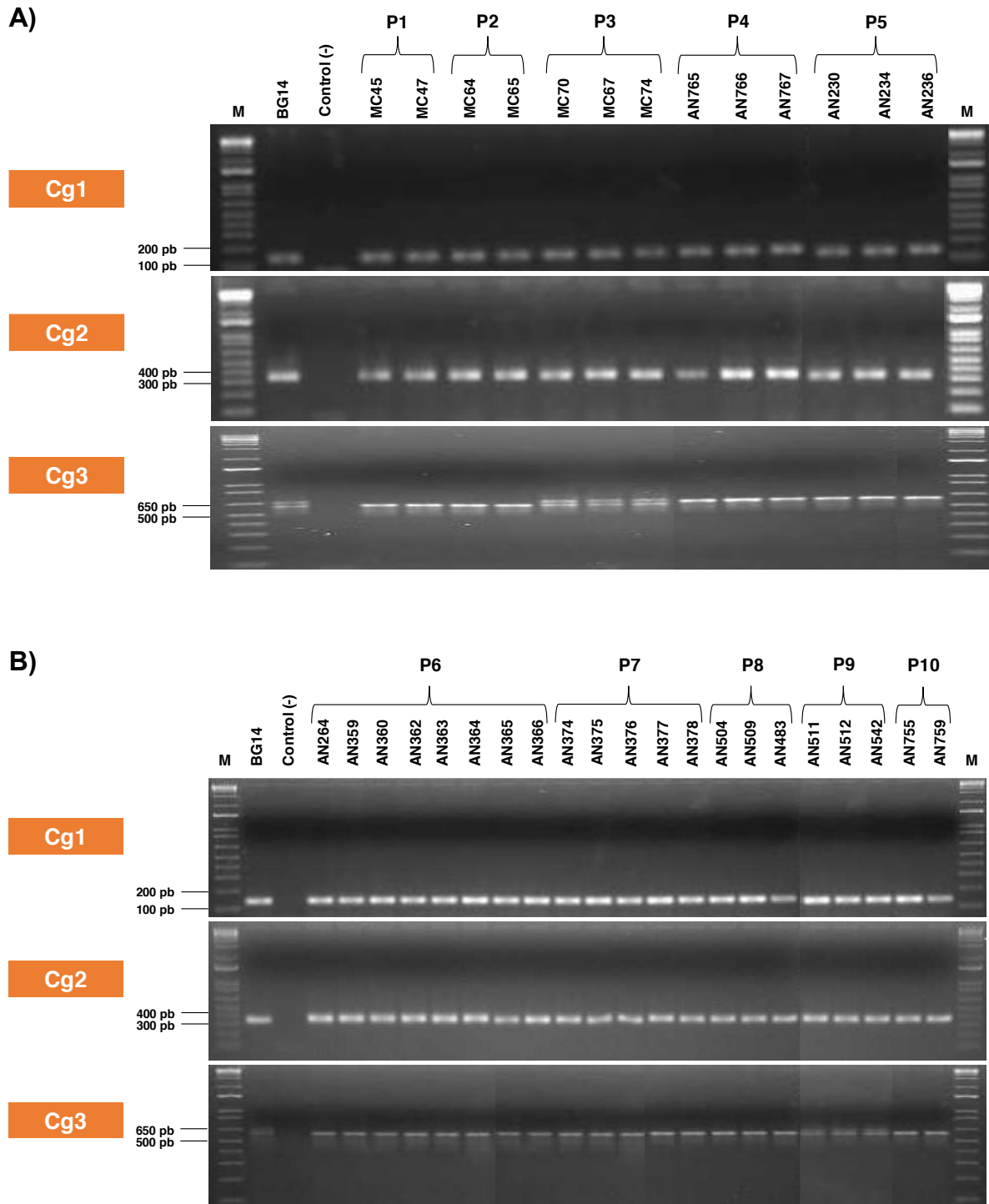


Figura S1. Identificación molecular de *C. glabrata*. A) Serie de aislados clínicos de los pacientes 1 al 5. B) Serie de aislados clínicos de los pacientes 6 al 10.

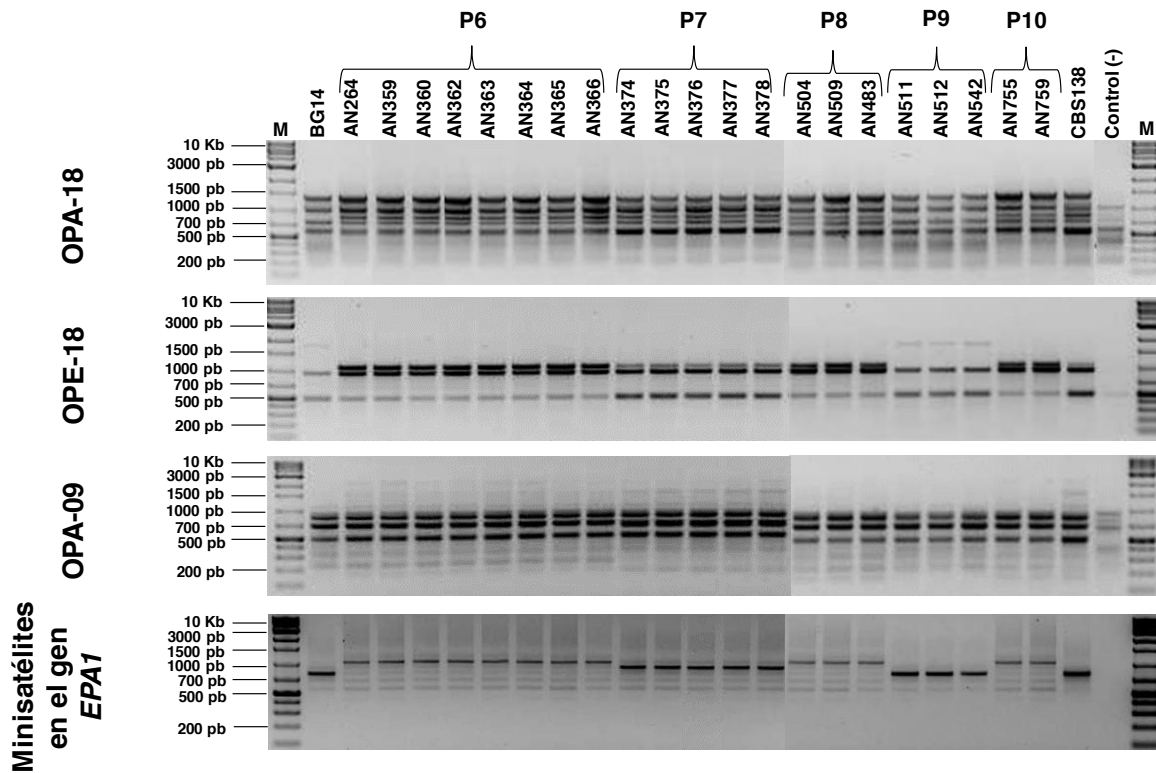
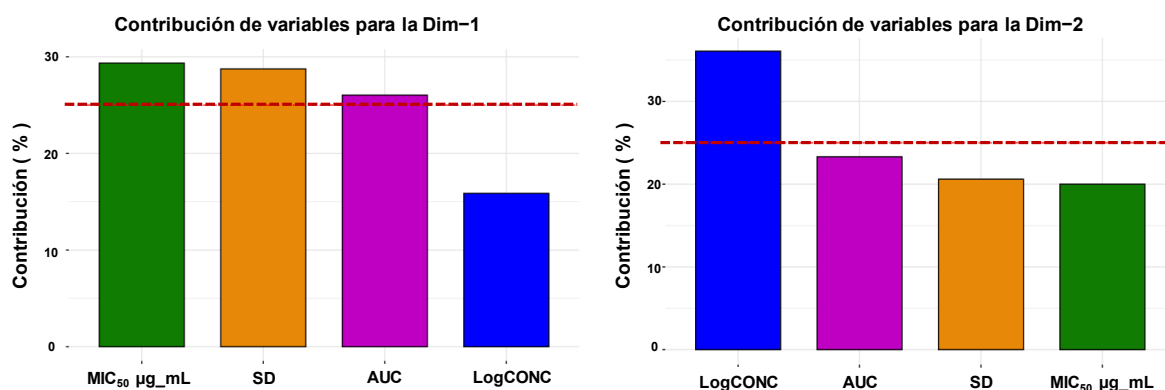


Figura S2. Perfiles moleculares obtenidos con RAPD y con los minisatélites de *EPA1* de los pacientes 6 al 10. Geles de agarosa que muestra los distintos perfiles moleculares de RAPD generados por los oligonucleótidos OPA-18, OPE-18, OPA-09 y Minisatélites en el gen *EPA1*. Los aislados correspondientes al mismo paciente mostraron el mismo perfil molecular para cada marcador utilizado.

A)



B)

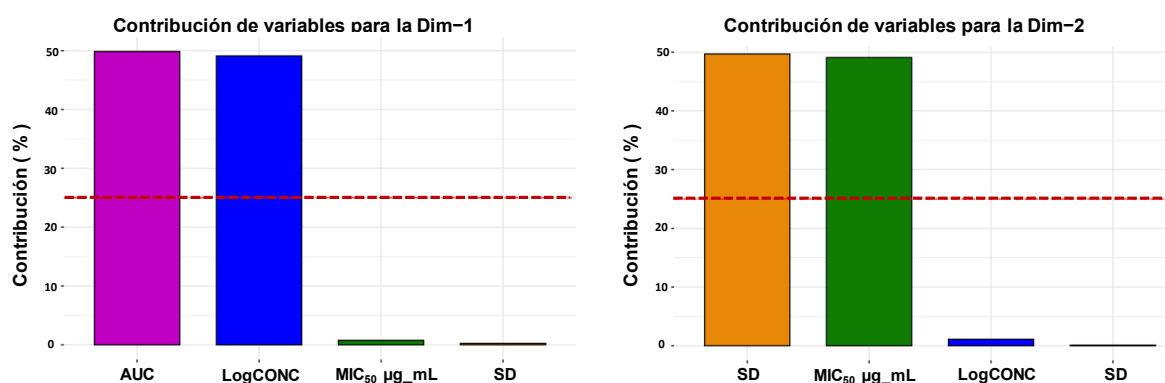


Figura S3. Contribución de variables para la Dim1 y Dim2 de los análisis de PCA. A) Contribución de variables para el PCA de todos los aislados de *C. glabrata*. **B)** Contribución de variables para el PCA de los aislados S y SDD. La línea roja discontinua indica el valor medio de contribución. Una variable mayor a este límite se considera que tiene una contribución importante para una determinada componente. Variables: en magenta AUC = área bajo la curva, en azul LogCONC = Concentraciones de FLC en base logarítmica, en verde MIC₅₀ µg/mL = Concentración Mínima Inhibitoria del 50% de crecimiento y en naranja SD = Desviación estándar de la MIC₅₀.