



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“MICROEVOLUCIÓN Y RESISTENCIA *IN VITRO* A
FLUCONAZOL EN *Candida dubliniensis*”

MOISES MENESES SOTERAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: GERMÁN HERMOSILLA DÍAZ

SANTIAGO, CHILE
2006



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“MICROEVOLUCIÓN Y RESISTENCIA *IN VITRO* A FLUCONAZOL EN *Candida dubliniensis*”

MOISES MENESES SÓTERAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: GERMÁN HERMOSILLA DÍAZ
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: BETTY SANMARTIN NUÑEZ

SANTIAGO, CHILE
2006

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en estas pocas líneas a las personas que estuvieron conmigo durante el desarrollo de esta tesis y durante mi carrera.

A mi Madre a quien agradeceré eternamente su intensa lucha por sostener nuestra familia, por su generoso amor que siempre me colmó y dio felicidad, y, por su constante apoyo a lo largo de mi vida que en muchas ocasiones me dio la fuerza para continuar.

A mi Novia Alejandra que con su grande, bondadoso y desinteresado amor es capaz de consolar y acariciar mi corazón, doblar mis voluntades, quebrar mis defectos y embellecer mi vida...Te Amo.

A mi hermano David por su preocupación y cariño de hermano mayor, por dar siempre ánimo y fortaleza.

A mi padre Víctor que a pesar de que estuvo a la distancia siempre sentí su apoyo y cariño cerca...ahora, a pesar que nos distancie la muerte tengo la certeza que nos volveremos a ver...

A mi abuela Yolanda que con su tierno cariño de abuelita estuvo ahí para consentirme siempre, y aunque ni siquiera lo supiese... aliviarme en días difíciles.

A mi fiel amigo Camilo agradecer el que por años hayamos podido compartir tanto alegrías como tristezas.

A Alejandro y Judith, Nico y Sola que con su especial cariño lograron darme un segundo hogar.

A mi Tío Ramón por preocuparse y darme animo siempre, también por su insistencia en enseñarme todo su conocimiento.

A mi Tutor Germán que durante dos años me guió con conocimiento y experiencia hacia el fin de esta tesis, por inculcarme paciencia y empeño. Pero por sobretodo el darme la posibilidad de que al final de esta tesis yo pueda llamarte Amigo y tú a mi "Doctor".

A mis Tutoras Consuelo Borie y Betty San Martín por entregarme de su tiempo y su ayuda para desarrollar esta tesis. A los departamento de Medicina Preventiva Animal, Ciencias Clínicas y a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

Al programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina y todo sus integrantes.

A Jehová Dios quien me permite la vida todos los días.

DEDICATORIAS

A mi Padre...

Y Jehová procedió a responder a Job desde la tempestad de viento y decir:

“¿Quién es este que está oscureciendo el consejo con palabras sin conocimiento?

Cíñete los lomos, por favor, como hombre físicamente capacitado, y déjame interrogarte, y tú dame informe.

¿Dónde te hallabas tú cuando yo fundé la tierra?

Infórmame, si de veras conoces el entendimiento.

¿Quién fijó sus medidas, si acaso lo sabes,

o quién extendió sobre ella el cordel de medir?

¿En qué han sido hundidos sus pedestales con encajaduras, o quién colocó su piedra angular, cuando las estrellas de la mañana gozosamente clamaron a una, y todos los hijos de Dios empezaron a gritar en aplauso?

¿Te han sido descubiertas las puertas de la muerte, o puedes ver las puertas de la sombra profunda?...

Si un hombre físicamente capacitado muere, ¿puede volver a vivir? Todos los días de mí trabajo obligatorio esperaré, hasta que llegue mi relevo. Tú llamarás, y yo mismo te responderé.

Por la obra de tus manos sentirás anhelo.

Extractos del libro de Job Capítulos 38 y 14

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	3
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	7
REVISION BIBLIOGRÁFICA	9
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Cepas	16
2. Identificación y pruebas diferenciales de <i>Candida dubliniensis</i>	16
3. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas	17
4. Determinación del tiempo generacional	18
5. Cultivo seriado en medio YPD e YPD + FCZ	18
6. Extracción de ADN genómico de levaduras	19
7. Genotipificación por “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)	20
8. Coeficiente de similitud y análisis de agrupamiento	21
9. Valores CIM para las colonias aisladas a 128 µg/mL de FCZ	21
10. Microevolución y su relación con la adquisición de resistencia	22

RESULTADOS	23
1. Identificación de levaduras	23
2. Concentraciones mínimas inhibitorias	24
3. Tiempo generacional	25
4. Aislamiento de las cepas bajo tratamiento	26
5. Extracción de ADN genómico	28
6. Elección de los partidores	28
7. Genotipificación por “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)	30
8. Coeficiente de similitud y análisis de agrupamiento	32
9. Valores CIM para las colonias aisladas a 128 µg/mL	35
10. Diversidad genética	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO	48

RESUMEN

Candida dubliniensis fue descrita por primera vez en el año 1995, como una levadura estrechamente relacionada con *Candida albicans*. Coloniza normalmente la cavidad oral, tracto respiratorio alto y otros lugares anatómicos. Debido a que la mayoría de las infecciones ocurre en individuos con inmunosupresión se la describe como un patógeno oportunista. A diez años de su descubrimiento varios aspectos de su biología son poco claros, como los mecanismos de resistencia que puede adquirir. Se caracteriza por su capacidad para adquirir resistencia tanto *in vivo* como *in vitro* cuando es sometida a tratamientos con antifúngicos. Varios estudios han postulado que esta habilidad podría estar relacionada a un proceso de microevolución

El objetivo de este trabajo fue determinar la ocurrencia de microevolución *in vitro* en la levadura *C. dubliniensis* expuesta a fluconazol (FCZ) y analizar su relación con la aparición de cepas menos susceptibles a este antifúngico. Para ello, se estudió el comportamiento de una cepa de *C. dubliniensis*, cuyo valor de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) fue 0,5 µg/mL a fluconazol. La cepa fue sometida a un cultivo seriado con concentraciones crecientes de FCZ desde 0,5 a 128 µg/mL, tomándose muestra a distintos intervalos de tiempo. Las colonias obtenidas fueron caracterizadas molecularmente por Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico, RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) y en cada caso se determinó su susceptibilidad a fluconazol mediante microdilución en caldo.

C. dubliniensis dio origen a cepas menos susceptibles a fluconazol, cuando fue expuesta al antifúngico. Las cepas menos sensibles presentaron una CIM de 32 µg/mL, valor superior al encontrado entre las cepas derivadas del grupo control (CIM=0,125 µg/mL). Además, el grupo de cepas menos susceptibles experimentó mayor microevolución, lo que determinó una alta diversidad genética, expresada en la aparición de un número mayor de genotipos (11 genotipos diferentes) respecto al grupo control (6 genotipos), con valores de diversidad genotípica G de 5,00 y 3,76, respectivamente.

Estos resultados sugieren una relación entre la adquisición de resistencia y la

microevolución en cepas de *Candida dubliniensis* cultivadas *in vitro*. Sin embargo, esto debe ser evaluado más extensamente analizando un mayor número de cepas.

SUMMARY

Candida dubliniensis was first described in 1995. This organism is closely related with the *Candida albicans* yeast. *C. dubliniensis* usually colonizes the oral cavity, high breathing tract and other anatomical places, however, is describes as an opportunist pathogen, because most of the infections happen in persons with immunodeficiency. To ten years of their discovery, several aspects of their biology are not very clear, as the resistance mechanisms that *C. dubliniensis* can acquire. *C. dubliniensis* is characterized by their capacity to acquire resistance *in vitro* and *in vivo*, when is exposed to treatments with antifungics. Several studies have postulated that this ability could be related to a microevolution process.

The objective of this work was to determine the microevolution occurrence *in vitro* in *C. dubliniensis*, exposed to FCZ, and to analyze its relationship with the appearance of less susceptible colonies to this antifungic. For it, the behavior of a strain of *C. dubliniensis* was studied, with a value of Inhibitory Minimum Concentration (CIM) of 0,5 µg to fluconazol, subjected to a seriate culture with growing concentrations of fluconazol from 0,5 to 128 µg/mL, taking shows to different intervals of time. The colonies obtained were characterized molecularly by RAPD and in each case their susceptibility to fluconazol was determined by means of microdilution in broth.

C. dubliniensis gave origin to less susceptible strains to fluconazol, when was exposed to the antifungic. Less sensitive strains presented a CIM of 32 µg/mL, superior to control group (CIM=0,125 µg/mL). Also, the group of less susceptible strains experienced a bigger microevolution grade, which determined a high genetic diversity, expressed in the appearance of a bigger number of genotypes (11 different genotypes) in comparison to the control group (6 genotypes), with values of diversity genotypic **G**, of 5,00 and 3,76, respectively.

These results suggest a relationship between the resistance acquisition and the microevolución in strains of *Candida dubliniensis* cultivated *in vitro*. However, this should be evaluated analyzing a bigger number of strains.

INTRODUCCIÓN

Candida dubliniensis es un hongo emergente descrito en Dublín, Irlanda, en el año 1995. Aunque diversos estudios han demostrado que se trata de una levadura comensal, que coloniza normalmente la cavidad oral, tracto respiratorio alto y posiblemente otros lugares anatómicos en humanos, ésta puede comportarse como un hongo patógeno oportunista en individuos que cursan algún tipo de inmunosupresión.

Por años ha sido confundida con la especie *C. albicans*, debido a que comparten características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Como consecuencia de ello, muchos aislados de *C. dubliniensis* fueron erróneamente identificados, como *C. albicans*, de tal manera que en la actualidad su epidemiología es parcialmente conocida. Sólo recientemente se han desarrollado métodos de identificación rápidos y confiables.

C. dubliniensis ha sido aislada frecuentemente desde candidiasis oral en pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y pacientes con Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Normalmente, estas cepas se aíslan como levaduras susceptibles a antifúngicos, como por ejemplo los derivados azólicos, una de las familias de antifúngicos más utilizados en clínica.

Uno de los representantes más usados de esta familia es el fluconazol (FCZ), ampliamente utilizado en el tratamiento de candidiasis oral. Dado su frecuente uso y su condición de fungistático, se ha reportado el aislamiento de cepas de *C. dubliniensis* resistentes en pacientes que están bajo un largo tratamiento. De igual manera, estudios *in vitro* en esta especie, también han revelado su capacidad para generar rápida resistencia cuando la levadura es expuesta previamente a FCZ.

En pacientes con candidiasis orofaríngea que están bajo un esquema terapéutico antifúngico prolongado, las cepas resistentes aisladas muestran cambios genéticos relacionados con mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos y sobreexpresión de genes.

C. dubliniensis tiene la capacidad de sufrir pequeños cambios genéticos, estables y acumulativos en el tiempo, denominados en su conjunto microevolución. La microevolución ocurre tanto en poblaciones comensales como patógenas y determina que en poblaciones, originalmente clonales, surjan variantes genéticas dentro de una especie. Estudios recientes han intentado correlacionar su habilidad para experimentar microevolución, tanto *in vivo* como *in vitro*, con su capacidad de generar resistencia frente a los antifúngicos, pero éstos no han sido concluyentes.

En consecuencia con lo anterior se hace necesario estudiar el efecto del FCZ en una población experimental de *C. dubliniensis*, de tal manera de establecer la posible relación entre microevolución y desarrollo de resistencia.

La importancia de este estudio radica en lo fundamental que es entender el mecanismo de evolución de la resistencia y como consecuencia de ello, poder mejorar el esquema de tratamiento antifúngico en humanos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Candida dubliniensis

Actualmente, se reconocen cerca de cien mil especies de hongos que ocupan la mayoría de los nichos ecológicos existentes. Alrededor de cuatrocientas especies han sido descritas como organismos causales de infección, tanto en humanos como en animales (Hoog & Guarro, 1996).

El género *Candida* es uno de los principales agentes responsables de infecciones fúngicas, con alrededor de 200 especies que forman parte de la microbiota comensal gastrointestinal y genitourinario del ser humano (Arenas, 2003; Calderone, 2002). Alrededor de 17 especies han sido descritas como agentes de micosis en el hombre, siendo 7 las responsables de más del 90% de las candidiasis (Kwon-chung & Bennett, 1992; Hazen, 1995; Kurtzman & Fell, 1998).

Candida dubliniensis es una nueva especie de este género, recientemente identificada. Por años fue confundida con *C. albicans*, con la cual comparten características fenotípicas, entre las cuales están las de producir tubo germinativo y clamidoconidios. El aislado más antiguo del que se tiene conocimiento, fue obtenido desde un bazo postmortem de un paciente fallecido en el Reino Unido el año 1957, sin embargo debido a diferentes circunstancias, no fue hasta el año 1995 que se consideró a este aislado y otros posteriores, como una nueva especie a la que se llamó *Candida dubliniensis*, pues fue en Dublín (Irlanda), donde fue identificada por primera vez (Sullivan & Coleman, 1998; Sullivan *et al.*, 1995). Desde entonces ha sido aislada desde pacientes alrededor de todo mundo (Sullivan & Coleman, 1998).

Se piensa que esta levadura es un comensal que coloniza normalmente la cavidad oral y otros lugares anatómicos en humanos (Sullivan & Coleman, 1998). Se ha visto incluso un aumento en el aislamiento de *C. dubliniensis* en esputos y lavados alveolares, lo que hace suponer que su hábitat normal sería la orofaringe y el tracto respiratorio alto (Polacheck *et*

al., 2000; Kim *et al.*, 2003; Fotedar & Al-Hedaithy, 2003, 2004). Como la mayoría de las especies del género *Candida*, se comporta como un patógeno oportunista, teniendo una alta prevalencia en aislados de pacientes que cursan candidiasis esofageal, particularmente en personas infectadas con VIH y enfermos de SIDA. Además de tener una asociación con infecciones orales, ha sido reportada como agente infeccioso en enfermedades sistémicas, pacientes bajo tratamiento quimioterápico, cáncer hematopoyético, vulvovaginitis, estados finales de enfermedad hepática y transplantados (Meis *et al.*, 1999; Brandt *et al.* 2001; Cimolai *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2005). También ha sido recuperada desde pacientes sanos no infectados con VIH, como microbiota oral colonizante, aunque estos casos son menos frecuentes (Moran *et al.*, 1997; Sullivan & Coleman, 1998; Sullivan *et al.*, 2005). A pesar de esto, todavía no existe un consenso sobre la prevalencia de *C. dubliniensis* en la cavidad oral de estos individuos. Además, se ha reportado el caso de infecciones orales por *C. dubliniensis* en personas sanas (Mosca *et al.* 2005)

Las candidiasis producidas por *C. dubliniensis* pueden ser de diferente gravedad, desde infecciones superficiales, afectando mucosa oral, a infecciones profundas, como la candidiasis hematógena, siendo esta última altamente letal (Sullivan & Coleman, 1998; Gee *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2005)

Identificación

Desde 1995, variadas técnicas de identificación han surgido a través de los años. *C. dubliniensis* es un hongo capaz de crecer como levadura o como un hongo filamentoso, formando pseudohifas con clamidoconidios o hifas verdaderas. Además de compartir estas características con *C. albicans*, ambas levaduras forman clamidoconidios en medio agar Maíz y tienen la facultad de desarrollar una estructura denominada tubo germinativo en presencia de plasma. Sin embargo, existen pruebas diagnósticas capaces de diferenciar entre ambas especies, por ejemplo, sólo *C. albicans* es capaz de crecer en el rango de los 42°C a 45°C en Agar Saboureaux y en medio Xilosa a 37°C. Por otro lado, el uso de medios cromogénicos apropiados como el Chromo Agar[®], permite el rápido reconocimiento de

estas especies (Sullivan & Coleman, 1998). Adicionalmente, Biomeriux[®] (Marcy-l'Etoile, Francia) ha desarrollado un sistema de galerías de identificación basados en la actividad enzimática, capaz de distinguir *C. dubliniensis* de *C. albicans*, denominado API ID 32C (Pincus *et al.*, 1999). Por último, se están desarrollando una serie de herramientas moleculares con el fin de identificar ambas especies, basadas en la genotipificación del hongo por medio de técnicas como PCR, RAPD, análisis de cariotipo e inmunocromatografía, entre otros. (Sullivan & Coleman, 1998; Pincus *et al.*, 1999; Mähnß *et al.*, 2005; Marot-Leblond *et al.*, 2004)

Importancia clínica

La importancia clínica de esta nueva especie radica en varios factores, uno de ellos es que a pesar de los esfuerzos para identificar a *Candida dubliniensis* no se ha podido determinar concretamente su prevalencia. Han habido numerosos estudios epidemiológicos, utilizando diversos métodos para determinar su prevalencia, pero con resultados poco claros (Sullivan *et al.*, 2005). Además, dado que ésta especie fue recientemente descrita, no todos los laboratorios han implementado pruebas diagnósticas diferenciales.

Un segundo factor a tomar en cuenta es la capacidad de esta levadura de generar micosis que podrían ser graves, con compromiso vital. Por último, y quizás lo más importante, es su rápida capacidad de generar resistencia a los antifúngicos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, Ruhnke *et al.* (2000) observaron en un paciente con candidiasis esofageal y SIDA el desarrollo simultáneo de resistencia a FCZ *in vivo* en cepas de *C. dubliniensis* y *C. albicans* (Sullivan & Coleman, 1998; Gee *et al.* 2002).

Microevolución y resistencia

La microevolución es un proceso evolutivo o de cambio que sufren algunos microorganismos en una escala de tiempo relativamente pequeña (en días o semanas) y

que da origen a nuevas variantes. Ha sido extensamente estudiada en *C. albicans* (Lockhart *et al.*, 1996), pero recientemente también ha sido descrita en *C. dubliniensis* (Gee *et al.*, 2002; Joly *et al.* 2002). Estos cambios genómicos pueden deberse a mutaciones, reordenamientos cromosómicos y recombinaciones no homólogas. La microevolución cobra importancia si se considera que podría estar relacionada con cambios que afectan el fenotipo de resistencia y capacidad patogénica de hongos infecciosos.

La microevolución ocurre tanto en poblaciones comensales como patógenas de ambas especies y determina que en estas poblaciones, originalmente clonales, surjan variantes genéticas. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que este fenómeno ocurre en ausencia o presencia de estrés selectivo, como por ejemplo un tratamiento antifúngico (Gee *et al.* 2002). Dado que la evolución de la resistencia a los antifúngicos, es el resultado de la selección natural por la exposición a la droga sobre la variabilidad genética de poblaciones de origen clonal, la microevolución constituye un factor importante a considerar en la aparición de cepas resistentes.

En *C. dubliniensis*, los modelos de infección donde más se ha descrito microevolución es en candidiasis orofaríngea, en pacientes VIH positivo bajo tratamiento antifúngico y pacientes con SIDA. En ellos, concomitantemente a la aparición de nuevos genotipos, también aparecen cepas menos susceptibles al tratamiento con azoles. Estos resultados son válidos también cuando se utilizan concentraciones subletales de antifúngico en poblaciones experimentales (Ruhnke *et al.*, 2000; Cowen *et al.*, 2002a; Gee *et al.*, 2002). Gee *et al.* (2002) encontraron una mayor variación genética cuando cepas de *C. dubliniensis*, aisladas de pacientes con SIDA, fueron expuestas a concentraciones crecientes de FCZ *in vitro* y, simultáneamente, se observó la aparición de cepas con una menor susceptibilidad a la droga. Sin embargo, los autores no pudieron establecer la exacta relación entre microevolución y resistencia a FCZ, pues algunas cepas con menor susceptibilidad no mostraron variaciones genéticas significativas por microevolución y por otro lado, cepas que exhibieron cambios genéticos fueron igualmente sensibles que la cepa original (Gee *et al.*, 2002). Además, en este estudio no se encontró ningún genotipo en particular que correlacionara con una menor susceptibilidad a la droga. Esto último, ha sido

también cierto para *C. albicans* en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Cowen *et al.*, 2000; Cowen *et al.* 2002a).

Los resultados de Gee *et al.* (2002), no necesariamente deben ser interpretados como una falta de correlación entre microevolución y adquisición de resistencia. Los autores indican haber encontrado cepas menos susceptibles que no presentaron evidencia de cambios microevolutivos; sin embargo, esto podría ser explicado por una falta de sensibilidad de las herramientas utilizadas (cariotipo electroforético, sondas Cd1, Cd24 y Cd25).

Mecanismos de resistencia a los azoles

La resistencia a los antifúngicos puede ser clínica (falla en la respuesta al tratamiento a pesar de que la cepa sea sensible a la droga *in vitro*) o microbiológica (concentraciones inhibitorias mínimas elevadas). La resistencia microbiológica puede ser intrínseca (insensibilidad a la droga), primaria (algunos clones de la población presentan una concentración inhibitoria mínima elevada a un antifúngico sin haber estado en contacto con él) o secundaria (adquisición de resistencia después del contacto con la droga). La resistencia secundaria a antifúngicos es más frecuente frente a drogas fungiestáticas como los azoles.

Dado que la microevolución determina cambios genéticos al azar, cabe esperar que se vean afectados genes cuyos productos estén directamente relacionados con la resistencia, por ejemplo, se ha descrito para levaduras del género *Candida* que mutaciones en el gen *ERG11*, el cual codifica para la enzima esterol 14- α -demetilasa (la proteína blanco para FCZ), resultan en la síntesis de una enzima con reducida susceptibilidad (Sobel *et al.*, 1998; Cowen *et al.*, 2002b). La sobreexpresión del gen *ERG11* también le conferiría una menor susceptibilidad al hongo (Rex *et al.*, 2001; Cowen *et al.*, 2002b; Shin *et al.*, 2004). Otro mecanismo de resistencia es la sobreexpresión de los genes *CDR1* y *CDR2*, relacionados también con el gen *MDR1*, que codifican para bombas de eflujo situadas en la membrana celular, las que se encargan de expulsar diversos componentes al exterior de la célula (Moran *et al.* 1998). En cepas de *C. albicans* con resistencia secundaria a FCZ se

ha descrito un 85% de sobreexpresión de las bombas de eflujo, un 65% de mutaciones en el gen *ERG11* y un 35% de sobreexpresión de éste último. En forma similar, en *C. dubliniensis* se asocia la sobreexpresión de los genes *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* a fenotipos resistentes a azoles, aunque un estudio reciente demostró que *CDR1* no es esencial para la resistencia a FCZ, pero sí para Itraconazol y Ketoconazol (Moran *et al.*, 2002; Pinjon *et al.*, 2003). Además, se comprobó que la sobreexpresión o mutaciones en el gen *ERG11* también confieren resistencia a cepas de *C. dubliniensis* (Moran *et al.*, 2002; Pinjon *et al.*, 2003).

El presente estudio tubo como objetivo estudiar la ocurrencia de microevolución en una población experimental de *C. dubliniensis* expuesta a FCZ y determinar su posible relación con la aparición de cepas menos susceptibles a este antifúngico.

HIPÓTESIS

La ocurrencia de microevolución está relacionada con la selección de cepas menos susceptibles a FCZ en poblaciones experimentales de *C. dubliniensis* expuestas a concentraciones crecientes de este antifúngico.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo general:

Determinar la ocurrencia de microevolución *in vitro* en la levadura *C. dubliniensis*, expuesta a FCZ y analizar su relación con la aparición de cepas menos susceptibles a este antifúngico.

Objetivos específicos:

- 1.- Establecer el tiempo generacional de la cepa de *C. dubliniensis* en estudio.
- 2.- Analizar la diversidad genética en una población control y en individuos menos susceptibles aislados desde una población expuesta a FCZ.
- 3.- Describir la relación entre microevolución y la aparición de cepas menos susceptibles a FCZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Cepas

Durante el año 2003, se realizó en los laboratorios del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile el proyecto DID Sal “Caracterización fenotípica y genética de la microbiota de levaduras en pacientes con periodontitis crónica y agresiva” en el cual se aislaron cepas de *Candida* spp. desde pacientes que no cursaban candidiasis y no habían estado bajo tratamiento antifúngico. En el marco de este proyecto se seleccionaron 5 cepas de 3 pacientes: 2 con periodontitis crónica (P16 y P29) y un individuo sin esta patología (CC). De esta forma se contó con las cepas de *C. dubliniensis*, designadas como, PM16-1, Pb16-1 Pc16-1, PM29-1 y CCM-1.

2) Identificación de las levaduras y pruebas diferenciales de *C. dubliniensis*

La identificación de las levaduras a nivel de especie fue confirmada según los procedimientos estándares en Micología Médica, analizando las características fisiológicas (formación de tubo germinativo, crecimiento a 37°C y 42°C), bioquímicas (crecimiento en Xilosa) y micromorfológicas (formación de pseudohifas y clamidoconidios) de cada cepa.

Para esto, las levaduras aisladas fueron sembradas en placas agar Sabouraud glucosado (ver Anexo), e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Posteriormente, se realizó la prueba del tubo germinativo, para lo cual se inoculó una asada de cultivo fresco de cada cepa en 0.5 mL de plasma fresco humano e incubó por 2 a 3 horas a 37°C. La presencia de tubo germinativo fue observado al microscopio con un aumento de 400X, siendo esta estructura característica tanto de *C. dubliniensis* como de *C. albicans*. Posteriormente, se efectuó un microcultivo en agar Maíz (ver Anexo), a 25°C por 48 a 72 horas, con el fin de observar la presencia de blastoconidios, clamidoconidios y pseudohifas.

Para identificar a *C. dubliniensis*, se realizaron las siguientes pruebas diferenciales: Cultivo en agar Sabouraud glucosado a 42°C y cultivo en medio Xilosa 1% (ver Anexo), en los cuales el crecimiento de *C. dubliniensis* es negativo, mientras que para *C. albicans* es positivo. Además, se utilizó el medio cromogénico ChromoAgar®, en el cual las colonias de la especie *C. dubliniensis* adquieren un color verde oscuro, y en cambio, las colonias de *C. albicans* se muestran de color verde claro.

Como confirmación de especie *C. dubliniensis*, se aplicó el sistema comercial API ID 32 C, (Biomeriux®), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

3) Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de cepas de *C. dubliniensis* frente a FCZ

Se determinó el valor CIM de las 5 cepas de *C. dubliniensis* en estudio y una cepa de *C. parapsilopsis* ATCC 2219, como control, mediante el método de microdilución en caldo de acuerdo al estándar de la “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 1992). Brevemente, en una placa de microcultivo celular de 96 pocillos (NUNC®), se prepararon diferentes concentraciones del antifúngico FCZ (Diflucan® I.V. Pfizer) a 128.0, 64.0, 32.0, 16.0, 8.0, 4.0, 2.0, 1.0 y 0.5 µg/mL, por dilución en medio de cultivo RPMI (Sigma®), conteniendo 2% de Glucosa y tamponado a pH 7.0 con ácido morfolinepropanosulfónico 0.165M (MOPS, Sigma®). A 100 µL de cada concentración de FCZ se agregó 100 µL de una suspensión de levaduras de *C. dubliniensis* (0.5 McFarland) y se incubó a 35°C con agitación suave. Las lecturas de crecimiento se realizaron mediante un lector de ELISA Titeertek Multiskan MCC a las 24 y 48 horas de incubación, consignándose la mínima concentración de FCZ capaz de inhibir el crecimiento de la levadura (valor CIM).

Para el cultivo seriado en medio YPD (ver Anexo) y estudios posteriores, se seleccionó la cepa que tenía un valor CIM frente al antifúngico igual o menor a 0.5 µg/mL.

4) Determinación del tiempo generacional

Para calcular el tiempo generacional de la cepa seleccionada, se realizó una curva de crecimiento. Para ello, las células fueron crecidas en medio YPD a 37°C por 24 hrs y luego inoculadas en medio fresco de YPD. El inóculo inicial fue de una concentración de 1.8×10^6 células/mL, el cual fue determinado por conteo en cámara de Neubauer. El cultivo fue realizado en medio YPD a 37°C con agitación constante a 175 rpm. La progresión del crecimiento celular fue determinada por lectura de turbidez con un espectrofotómetro a 540 nm, durante 10 horas. Los datos desde la curva de crecimiento fueron analizados de acuerdo a la ecuación de Gompertz, modificada por Zwietering (ver Anexo), utilizando el software Curve Expert v 1.3.

5) Cultivo seriado en medio YPD e YPD + FCZ

La cepa seleccionada fue cultivada en forma seriada en medio YPD y medio YPD + FCZ (0.5 µg/mL). Para ello, se inoculó 1.8×10^6 células/mL de la cepa seleccionada en 25 mL de cada medio. Cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, se tomó 1 mL de cada uno y se re-inoculó en medio fresco de YPD (control) e YPD + FCZ, respectivamente. La concentración de FCZ fue aumentada desde 0.5 µg/mL a 1, 5, 10, 50, 60, 70 y 128 µg/mL, en las generaciones 50, 100, 150, 250, 300 y 350, respectivamente.

Se aislaron colonias por muestreo desde los cultivos YPD e YPD + FCZ [50 µg/mL], las que fueron cultivadas en placas con agar Sabouraud (AS). Cada colonia aislada fue repicada, por “replica plating” a los medios AS y AS + FCZ [50 µg/mL], con el fin de distinguir las colonias susceptibles (FCZ⁵⁰-S), aquellas que crecen sólo en AS, y colonias menos susceptibles (FCZ⁵⁰-R), las que desarrollan en ambos medios.

Este mismo procedimiento se repitió considerando un muestreo a una concentración de 70 y 128 µg/mL de FCZ, junto a los controles respectivos. Se distinguieron las colonias susceptibles (FCZ⁷⁰-S y FCZ¹²⁸-S) y colonias menos susceptibles (FCZ⁷⁰-R y FCZ¹²⁸-R).

Debido a que los resultados fueron poco discriminativos entre colonias controles (CTRL⁵⁰, CTRL⁷⁰ y CTRL¹²⁸) y colonias menos susceptibles (FCZ⁵⁰-R, FCZ⁷⁰-R y FCZ¹²⁸-R), utilizando el procedimiento anteriormente descrito, fue necesario diseñar un método más selectivo. Éste consistió en sembrar cada colonia aislada en un medio de cultivo YPD líquido, conteniendo concentraciones de FCZ de 0, 50 y 70 µg/mL. Para ello, se utilizó una placa de microcultivo de 96 pocillos, en la cual se dispuso de un pocillo como control negativo por placa. Cada colonia fue sembrada en los 3 pocillos, e incubada por 24 y 48hrs. De esta manera en medio líquido, se pudo obtener una mayor discriminación entre las cepas susceptibles y menos susceptibles. Este último test se aplicó sólo a colonias aisladas desde YPD + FCZ [128 µg/mL], debido a que en esta concentración se obtuvieron las mayores diferencias entre los grupos FCZ¹²⁸-R y CTRL¹²⁸. Por lo tanto, en adelante, los grupos FCZ¹²⁸-S, FCZ¹²⁸-R y CTRL¹²⁸, serán consignados como FCZ-S, FCZ-R y CTRL.

6) Extracción de ADN genómico de levaduras

El ADN genómico de cepas provenientes de cada grupo (FCZ-S, FCZ-R y CTRL), fue extraído mediante el kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega[®]), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para esto, se cultivaron las levaduras en 3 mL de medio líquido YPD a 30°C, en agitación constante por 20 horas (fase exponencial de crecimiento). Se tomó 1,5 mL de medio y se concentró las células por microcentrifugación a 13.000 g por 2 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 285 µL de EDTA 50 mM homogenizando en agitador. Luego se agregó 15 µL de liticasa [20 mg/mL], mezclando suavemente con ayuda de una micropipeta. Posteriormente, se incubó por 60 minutos a 37°C, para digerir la pared celular. Se volvió a centrifugar a 13.000 g por 2 minutos, agregando al sedimento 300 µL de la solución de lisis y 100 µL de la solución de precipitación de proteínas (Promega[®]). Se dejó la muestra en hielo por 5 minutos y se volvió a centrifugar a 13.000 g por 3 minutos. El sobrenadante se traspasó a otro tubo Eppendorf que contenía 300 µL de isopropanol, a temperatura ambiente y se mezcló suavemente por inversión. Se volvió a

centrifugar a 13.000 g por 2 minutos, para luego eliminar el sobrenadante y añadir 300 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclando varias veces por inversión, para así lavar el ADN precipitado. Se centrifugó a 13.000 g por 2 minutos y luego se eliminó el etanol por aspiración. Se dejó secar el ADN 10 a 15 minutos a 37°C. Una vez seco el tubo, se agregó 50 μ L de agua bidestilada estéril conteniendo RNAsa 30 μ g/mL. El ADN genómico extraído, fue visualizado por electroforesis en geles de agarosa 0.7 %, en tampón TAE 1x (ver Anexo) y su concentración determinada mediante el programa Kodak 1D v3.6 (ver Anexo). La concentración final de ADN genómico, de cada cepa, se ajustó con TE (ver Anexo) a 10 pg/ μ L. Las muestras fueron almacenadas a -20° C hasta su utilización.

7) Genotipificación por “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)

Con el propósito de estimar la diversidad genética en la población de levaduras, se utilizó la herramienta de genotipificación RAPD. Para ello, se extrajo el ADN genómico (ADNg) de 41 colonias desde el cultivo YPD + FCZ [128 μ g/mL] (20 menos susceptibles, FCZ-R y 21 cepas aparentemente susceptibles, FCZ-S), previamente seleccionadas. Como control, desde un cultivo en YPD, se extrajo el ADNg desde 18 colonias que no estuvieron expuestas a FCZ (CTRL).

Además, con el objetivo de seleccionar 6 partidores capaces de revelar microevolución, se analizaron 14 partidores elegidos al azar (ver Anexo). Para ello, cada partidor fue utilizado en una reacción RAPD analizando 10 cepas de *C. dubliniensis*, aisladas desde un mismo paciente. Aquellos partidores que detectaron microevolución, fueron los seleccionados para los análisis de RAPD.

Cada reacción de RAPD contenía 100 pg de ADN de la cepa en estudio, tampón Taq pol 1x; los nucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP 100pM cada uno; MgCl₂ 2 mM, partidor 10 pmoles y Taq ADN polimerasa 1 U (Gibco BRL®), en un volumen total de 25 μ l. La reacción de RAPD se realizó en un termociclador Eppendorf. El programa de RAPD consistió en un precalentamiento a 95°C por 3 min, 40 ciclos de denaturación a

94°C por 1 min, hibridación del partidor a 35°C por 2 min. y extensión a 72°C por 2 min., terminando con una extensión a 72°C por 5 min.

El tamaño molecular de los productos de amplificación fue determinado por electroforesis en geles de agarosa 1%, en tampón TAE 1x, utilizando como estándar ADN Lambda Hind III (BioLabs®), la electroforesis se realizó a 70 Volts por 2 horas. Los perfiles de RAPD fueron visualizados mediante un transiluminador UV y registrados fotográficamente con el equipo KODAK EDAS 290.

8) Coeficiente de Similitud y Análisis de Agrupamiento

Los perfiles de RAPD fueron analizados mediante el software Kodak 1D v3.6. Con el fin de calcular la similitud existente entre dos cepas, se determinó el coeficiente de similitud de DICE (ver Anexo), utilizando el software RAPDistance (ver Anexo). El coeficiente de similitud de DICE (S_{AB}) mide la proporción de bandas electroforéticas comunes, (del mismo tamaño), presentes en los perfiles RAPD de dos cepas.

Para un análisis global de los coeficientes de DICE, derivados de todas las comparaciones posibles entre cepas, se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA “unweighted pair group method with arithmetic averages” (Sneath & Sokal, 1973). Finalmente, los datos fueron representados gráficamente a través de un dendrograma. Con esto fue posible observar si las cepas formaban subgrupos que se asociaran a su condición de susceptibilidad antifúngica.

9) Valores CIM para las colonias aisladas a 128 µg/mL de FCZ

Para cada uno de los grupos (FCZ-S, FCZ-R y CTRL), se determinó el valor CIM de una colonia por cada genotipo distinto definido por RAPD. Para ello se utilizó el método de microdilución en caldo de acuerdo al estándar del NCCLS (1992). Estos resultados fueron

comparados con los valores de diversidad genética de cada grupo, con el fin de analizar su posible relación.

10) Microevolución y su relación con la adquisición de resistencia

Como medida de microevolución se determinó la diversidad genotípica en la población mediante la ecuación $G=1/\sum p^2$ (Stoddart & Taylor, 1987), referida como la proporción de genotipos diferentes dentro de una muestra, tomando en cuenta la frecuencia de cada uno de ellos. De esta forma, se calculó la diversidad genotípica de la población de *C. dubliniensis* cultivada en medio YPD sin FCZ (cepas CTRL) y la población cultivada en medio YPD con FCZ, agrupada en colonias menos susceptibles y colonias aparentemente susceptibles (cepas FCZ-R y FCZ-S, respectivamente).

Valores de diversidad genética similares entre las poblaciones analizadas indicarían que no existe asociación entre microevolución y la disminución de la susceptibilidad en *C. dubliniensis*. Contrariamente, una mayor diversidad genética en la población bajo tratamiento y de menor susceptibilidad antifúngica, en comparación a la población susceptible del grupo control, indicaría la asociación entre microevolución y la adquisición de resistencia o menor susceptibilidad.

FINANCIAMIENTO

Laboratorio de Biología Molecular de Hongos, Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

RESULTADOS

I Identificación de las levaduras

Las cinco cepas analizadas fueron identificadas como *C. dubliniensis*, por los test convencionales (Figura 1) y test diferenciales, tales como el ChromoAgar (Figura 2). En la Tabla 1, se muestran los resultados de estas pruebas. Además, la especie fue confirmada en todos los casos por la galería enzimática API ID 32 C (Biomeriux®).

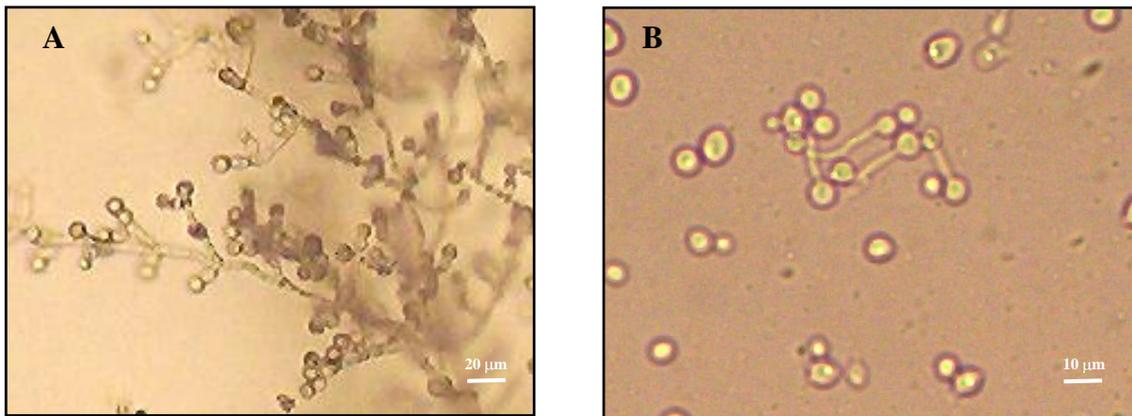


Figura 1: Microfotografías de estructuras especie-específicas de *Candida dubliniensis*. A, clamidoconidios, inducidos por el crecimiento en Agar Maíz. B, tubos germinativos de *C. dubliniensis* inducidos por plasma.

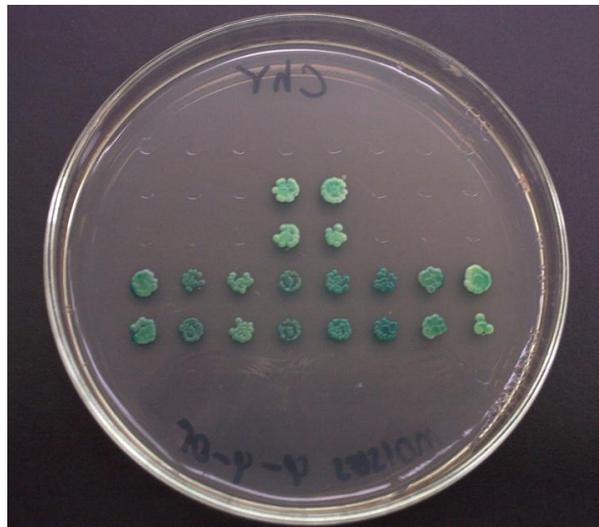


Figura 2: Cultivo en ChromoAgar. Colonias de color verde corresponden a la especie *C. albicans*, mientras que las colonias verde oscuro a *C. dubliniensis*.

Tabla 1.
Resultado de las pruebas diferenciales para *C. dubliniensis*

Cepa	AS 37°C	Tubo Germinativo	Microcultivo Clamidoconidios	Chromoagar	Xilosa	AS 42°C
CCM-1	+	+	+	verde oscuro	-	-
Pb16-1	+	+	+	verde oscuro	-	-
PC16-1	+	+	+	verde oscuro	-	-
PM16-1	+	+	+	verde oscuro	-	-
PM29-1	+	+	+	verde oscuro	-	-
PM13-137	+	+	+	verde	+	+

PM13-137: cepa de referencia de *Candida albicans*

II Concentraciones mínimas inhibitorias

De las 5 colonias de *C. dubliniensis* en estudio sólo una de ellas mostró una CIM superior a 0.5 (PM16-1). La cepa seleccionada para el estudio fue la Pb16-1 (Tabla 2).

Tabla 2.
Medición de CIM de cepas en estudio

CEPA	CIM (µg/mL)
CCM-1	0.5
Pb16-1	0.5
Pc16-1	0.5
Pm16-1	1.0
Pm29-1	0.5
REFERENCIA	0.5-1

III Tiempo generacional

Para calcular el tiempo generacional de la cepa seleccionada, se realizó una curva de crecimiento (Figura 3), determinando un tiempo generacional de 80 min.

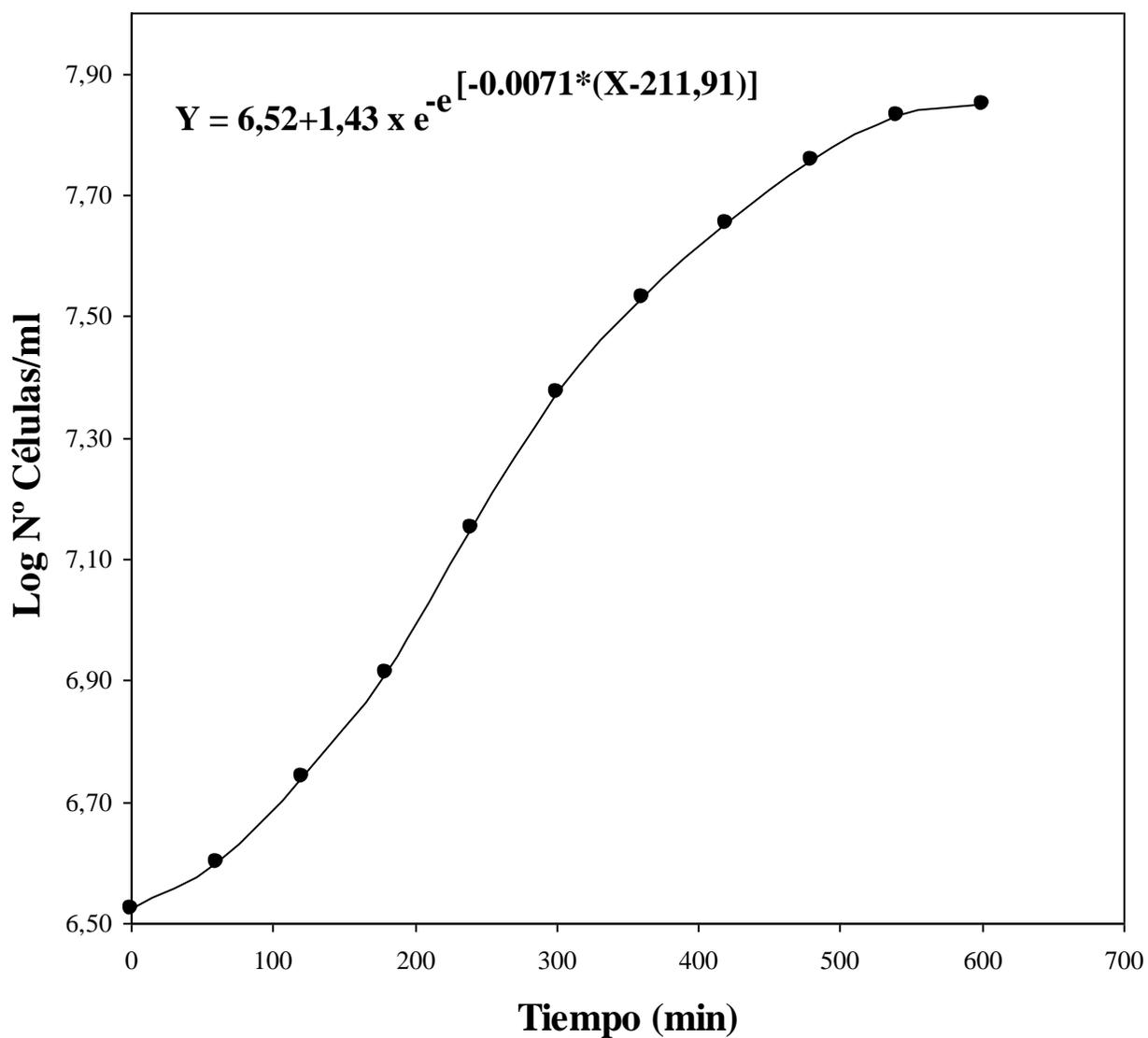


Figura 3: Curva de sobrevida para la cepa de *C. dubliniensis* Pb16-1 en medio YPD.

IV Aislamiento de las cepas bajo tratamiento

Todas las colonias provenientes de los grupos controles (CTRL 50, CTRL 70 y CTRL 128) fueron capaces de crecer en medio sólido AS. Sin embargo, estas mismas colonias también mostraron algún grado de crecimiento en medio AS con fluconazol (AS + FCZ). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.
Porcentaje de colonias que crecieron en medio sólido AS con y sin fluconazol

Muestra	Replica plating	% Crecimiento (N=208)
CTRL 50	AS	100
	AS + FCZ 50	100
FCZ 50	AS	100
	AS + FCZ 50	100

Muestra	Replica plating	% Crecimiento (N=208)
CTRL 70	AS	100
	AS + FCZ 70	100
FCZ 70	AS	100
	AS + FCZ 70	100

Muestra	Replica plating	% Crecimiento (N=208)
CTRL 128	AS	100
	AS + FCZ 128	100
FCZ 128	AS	100
	AS + FCZ 128	100

Por otro lado, las colonias aisladas desde los grupos bajo tratamiento (FCZ 50, FCZ 70 y FCZ 128), mostraron un comportamiento similar a las colonias de los grupos controles correspondientes.

Debido a los resultados con los grupos controles, se realizó otro método más sensible, utilizando medio YPD líquido, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Porcentaje de colonias que crecieron en medio líquido YPD con y sin fluconazol.

Muestra	Tratamiento	% de colonias que crecieron
CONTROL 128 (N=156)	YPD	100,0
	YPD+FCZ 50	0
	YPD+FCZ 70	0
FCZ 128 (N=189)	YPD	100,0
	YPD+FCZ 50	88,9
	YPD+FCZ 70	7,9

En este nuevo ensayo, el 100% de las colonias aisladas desde el grupo control (CTRL 128) fueron capaces de crecer en medio YPD y no fueron capaces de crecer en medio YPD más fluconazol 50 µg/mL (YPD+FCZ 50) o 70 µg/mL (YPD+FCZ 70).

Por otro lado, el total de las colonias aisladas desde el grupo FCZ 128, se desarrollaron en medio YPD. El 88.9% de estas se comportaron como cepas menos sensibles a fluconazol (50 µg/mL), mientras que sólo el 7.9% fueron menos sensibles a fluconazol (70 µg/mL).

En YPD+FCZ 50 se observó un 11,1% (21 colonias) de colonias con un reducido crecimiento en medio conteniendo fluconazol, por lo tanto aparentemente sensibles, mientras que un 92.1% (174 colonias) no crecieron en medio con FCZ 70 µg/mL.

Dado que entre las colonias del grupo FCZ 128, se recuperaron cepas aparentemente

sensibles al antifúngico (21 colonias sensibles en YPD+FCZ 50), éstas se agruparon como colonias fluconazol-Sensibles (**FCZ-S**) hasta confirmar los valores CIM correspondientes. Por otro lado, aquellas colonias del grupo FCZ 128, que se comportaron como cepas resistentes o menos sensibles al antifúngico, se agruparon como colonias fluconazol-Resistentes (**FCZ-R**).

V Extracción de ADN Genómico

El ADN obtenido fue de alto peso molecular y estable en el tiempo, permitiendo obtener perfiles de RAPD reproducibles. Se realizó la extracción de ADN a la cepa original Pb 16-1, 18 cepas del grupo control, 21 fluconazol-Resistente (FCZ-R) y 20 fluconazol-Sensible (FCZ-S). Las cantidades promedio que se extrajo de cada uno de estos grupos fue de: 2,6 ng/mL, 7,7 ng/mL, 24,9 ng/mL y 5,0 ng/mL, respectivamente. Los ADN fueron diluidos para ajustar la concentración a 10 pg/mL, concentración utilizada en la reacción de amplificación.

VI Elección de partidores

Con el propósito de seleccionar partidores RAPD sensibles a microevolución, se analizaron 14 partidores elegidos al azar (Tabla 5), en un ensayo RAPD con 10 cepas de *C. dubliniensis* de un mismo paciente.

Tabla 5

Características de los partidores testeados para ser utilizados en el análisis global de *C. dubliniensis* derivadas del cultivo seriado.

Identificación	Número de bandas ¹	Bandas polimórficas ¹	Secuencia nucleotídica 5' → 3'
OPBA 01	N.d.	N.d.	TTCCCCACCC
OPBA 02	3	-	TGCTCGGCTC
OPBA 03	7	+	GTGCGAGAAC
OPBA 04	N.d.	N.d.	TCCTAGGCTC
OPBA 05	6	-	TGCGTTCCAC
OPBA 06	5	-	GGACGACCGT
OPBA 07	10	-	GGGTCGCATC
OPBA 08	6	-	CCACAGCCGA
OPBA 09	6	+	GGA ACTCCAC
OPBA 10	5	+	GGACGTTGAG
OPBA 11	4	+	CCACCTTCAG
OPBA 12	6	-	TGTTGGGCAC
OPBA 14	4	+	TCGGGAGTGG
OPBA 15	7	+	GAAGACCTGG

N.d.= No determinado

1: del análisis de 10 cepas de *C. dubliniensis* de un mismo paciente

De los 14 partidores analizados, fueron seleccionados en base a su capacidad de discriminación entre cepas de una misma especie: OP BA03, OPBA09, OPBA10, OPBA14 y OPBA15. También se usó el partidor OPBA07, que aunque no mostró polimorfismo en las 10 cepas analizadas, generó un buen número de bandas (Figura 4).

En la Figura 4, se muestra como ejemplo un gel en agarosa con los perfiles de amplificación para los partidores OPBA 06 y OPBA 07. Ninguno de estos partidores reveló polimorfismo entre las cepas.

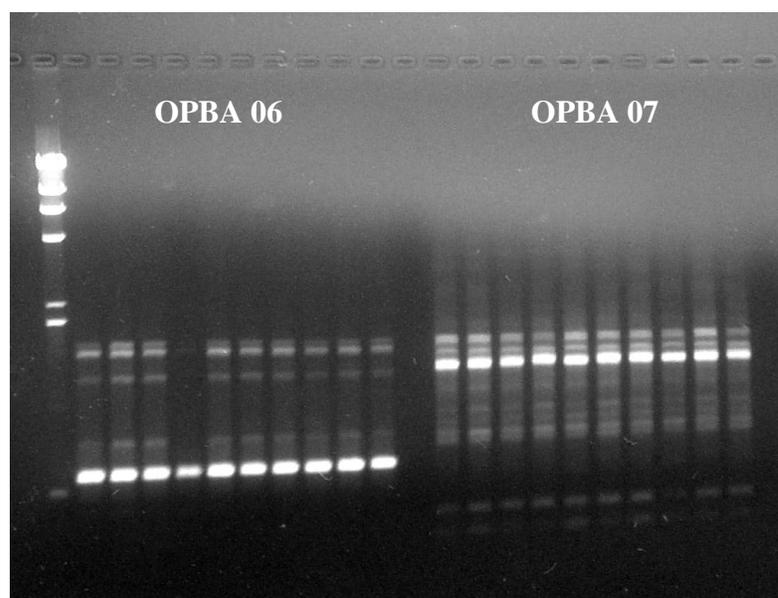


Figura 4: Perfiles de amplificación con diferentes partidores de 10 cepas de *C. dubliniensis*. Carril 1, marcador de tamaño molecular λ /HindIII; carril 2 al 11, amplificación con partidor OPBA 06; carril 13 al 22, amplificación con partidor OPBA 07. Carriles 12 y 23, controles negativos.

VII Genotipificación por “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD)

La tipificación molecular de las 61 cepas se realizó utilizando 6 partidores de 10 bases de largo de secuencia arbitraria. El número total de bandas y el rango de tamaño molecular (pb) obtenido con cada partidor, para cada especie, se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Características de los partidores utilizados en el análisis global de 61 cepas de *C. dubliniensis* derivadas del cultivo seriado.

Partidor	Número de bandas*	Tamaño molecular
OPBA 03	6	700-1800 pb
OPBA07	11	300-1700 pb
OPBA09	6	600-1400 pb
OPBA10	5	800-3300 pb
OPBA14	4	400-1700 pb
OPBA15	11	250-1200 pb

Al genotipificar las 61 cepas de *C. dubliniensis* aisladas, la mayor cantidad de bandas se obtuvo con el partidor OP BA 07 y OP BA15 (ambos con 11 bandas) y la menor cantidad se obtuvo con el partidor OP BA 14 (4 bandas). La banda de mayor tamaño que se obtuvo fue de 3,3 Kb, con el partidor OP BA 10; la más pequeña fue de 300 pb con el partidor OP BA 07.

En cada caso, las bandas más intensas de los patrones obtenidos, fueron reproducibles. Por lo tanto, para el análisis comparativo entre las cepas, solo se incluyeron las bandas de mayor intensidad y claramente definidas. En la Figura 5, se muestran los perfiles de RAPD obtenidos con el partidor OP BA 15 de cepas del grupo control (CTRL) y grupo FCZ-R, en el que destacan las bandas polimórficas.

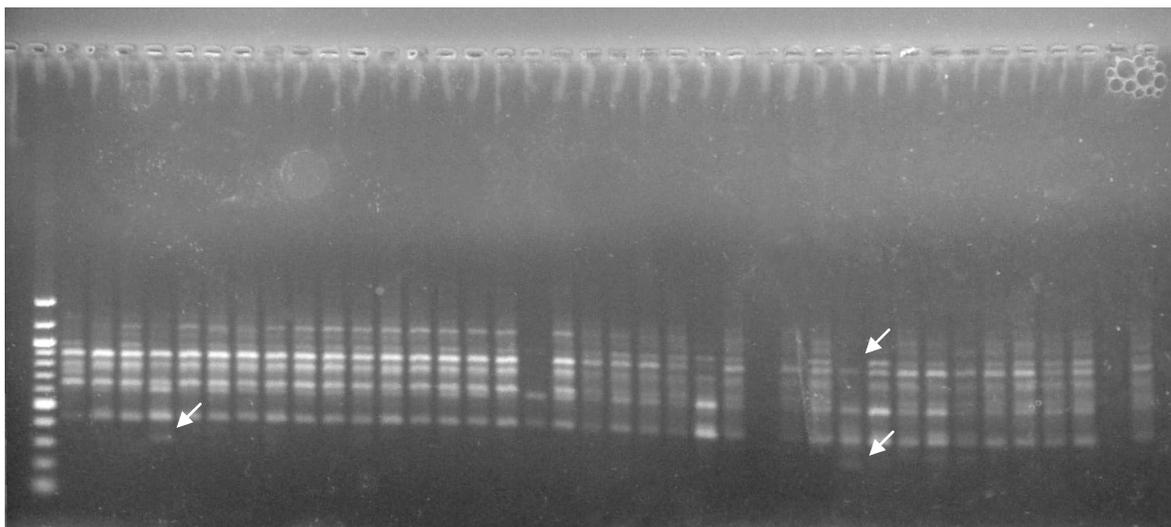


Figura 5: Perfiles de amplificación con el partidor OPBA 15 de las cepas del grupo CTRL (carriles 2 al 19) y FCZ-R (carriles 20 al 40), derivadas de la cepa Pb16-1 de *C. dubliniensis*. Carril 1, marcador de tamaño molecular 100pb. Las flechas indican la ausencia o presencia de bandas diferenciales.

VIII Coeficiente de similitud y análisis de agrupamiento

A partir de los perfiles RAPD se determinó el coeficiente de similitud de DICE (S_{AB}) para todos las cepas analizadas. Valores de similitud $S_{AB} \geq 0,90$ y $< 1,00$ denotan pequeños cambios genéticos probablemente debidos a microevolución.

El coeficiente de similitud promedio entre cepas pertenecientes al mismo grupo (CTRL, FCZ-R y FCZ-S) fue alta ($S_{AB} \geq 0,96$). De igual forma, el S_{AB} promedio de todas las cepas analizadas, sin importar al grupo al que pertenecen, fue elevado (0.96), como se muestra en la Tabla 7.

Es interesante mencionar que la cepa original de *C. dubliniensis*, Pb 16-1, muestra una de las más altas distancias ($S_{AB} = 0,88$, respecto a las otras colonias), haciendo mas notable la diversidad de genotipos aparecidos debido a microevolución, tanto en el grupo sometido a tratamiento con FCZ, como en el CTRL. Similarmente, las colonias FCZ-R10 y FCZ-R17, mostraron un $S_{AB} < 0,9$, a pesar de pertenecer ambas al grupo que mostró menor susceptibilidad.

Tabla 7

Similitudes promedio S_{AB} obtenidas dentro y entre grupos CTRL, FCZ-R Y FCZ-S.

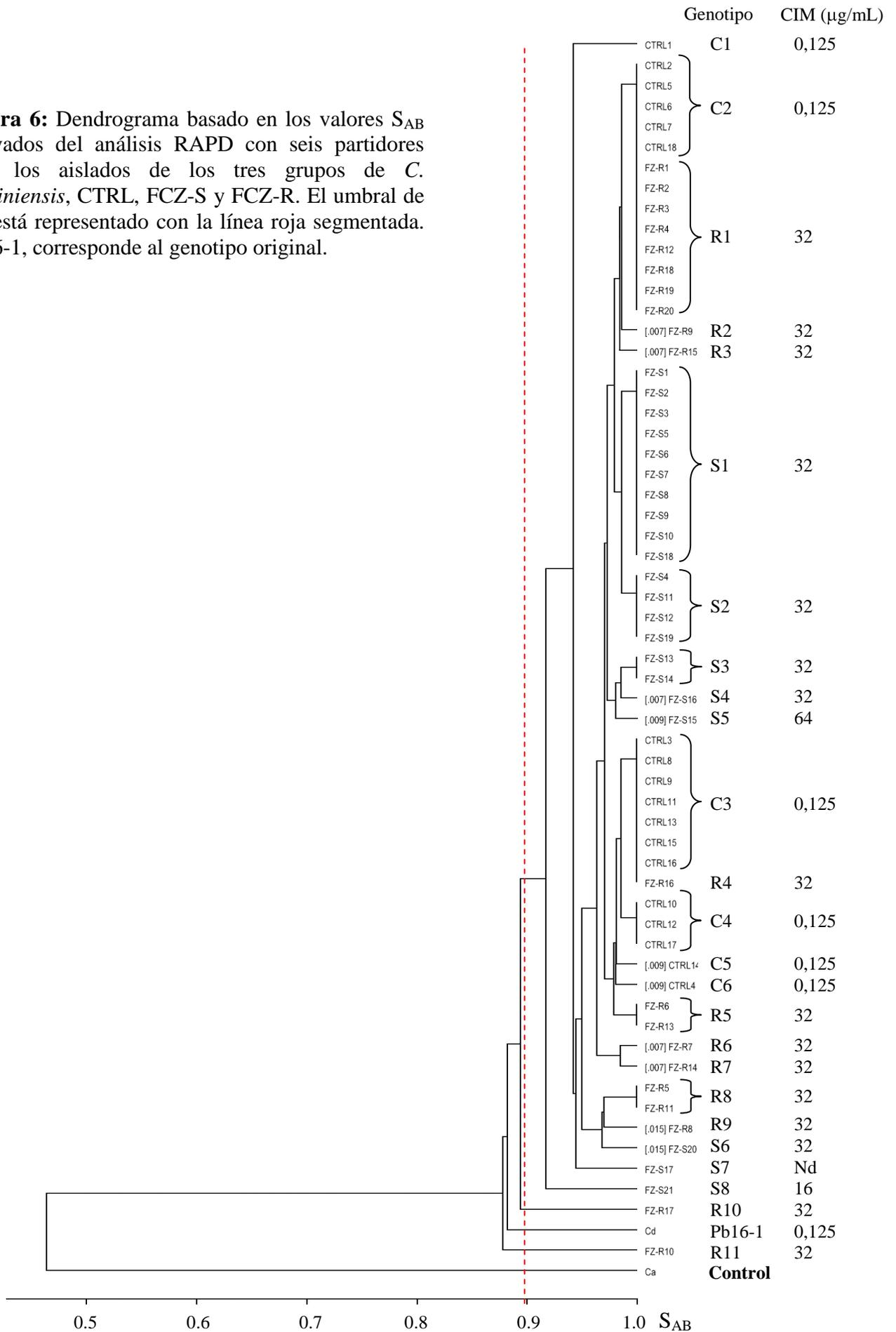
Grupo	CTRL	FCZ-R	FCZ-S	Total
Similitud S_{AB}	0,98	0,96	0,96	0,96

A partir de los coeficientes de DICE, obtenidos en todas las cepas analizadas, se realizó un análisis de agrupamiento, mediante UPGMA, representando gráficamente los resultados en un dendrograma a partir de los 5 partidores. En la Figura 6, en el dendrograma no se observan agrupaciones notables y diferenciales dentro de la especie *C. dubliniensis*, que pudieran asociarse a algún grupo en específico. En cuanto a las colonias FCZ-R, no se logra apreciar un genotipo específico o único para este grupo. Sin embargo, se debe destacar su alta diversidad genotípica, con un total de 11 genotipos diferentes. Además, en este grupo

también aparecen dos genotipos que son comunes con el grupo CTRL, (R1 = C2 y R4 = C3), esto sugiere que los cambios ocurridos en estas cepas no tendrían que ver con la adquisición de resistencia. Por otro lado, el grupo FCZ-S contiene 8 genotipos, más alto que el grupo CTRL (N = 6) y ninguno de ellos es compartido con otro grupo.

Además, en el dendrograma se muestra como control una cepa de la especie *Candida albicans*, la que como se esperaba mostró una similitud $S_{AB} < 0,5$ respecto a las cepas de *C. dubliniensis* (Figura 6).

Figura 6: Dendrograma basado en los valores S_{AB} derivados del análisis RAPD con seis partidores para los aislados de los tres grupos de *C. dubliniensis*, CTRL, FCZ-S y FCZ-R. El umbral de 0.9 está representado con la línea roja segmentada. Pb16-1, corresponde al genotipo original.



IX Valores CIM para las colonias aisladas a 128 µg/mL

Se determinó los valores de CIM de la cepa original Pb 16-1 y de una colonia por cada uno de los genotipos nuevos (Figura 6), con el propósito de observar la evolución de la resistencia, y poder encontrar alguna asociación entre los valores CIM y los grupos formados. Para ello se utilizó el método estándar, establecido por la NCCLS (1992), utilizando placas de 96 pocillos y registrando crecimiento positivo mediante turbidez (Figura 7).

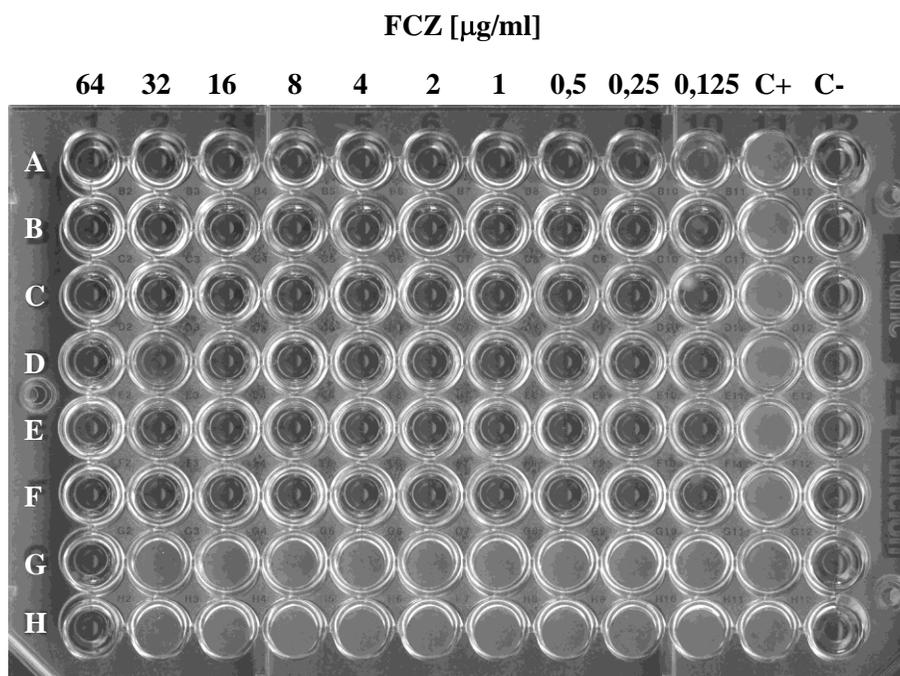


Figura 7: Prueba CIM realizada a los diferentes genotipos. Filas A-F cepas CTRL, G y H cepas FCZ-R. C+, control positivo; C-, control negativo.

El valor CIM para la cepa original Pb16-1 fue de 0,125 µg/mL. Los valores CIM para el resto de las cepas se muestran en la Tabla 8.

Debido a que el grupo FCZ-S, mostró valores CIM tan elevados como el grupo FCZ-R, éste grupo no se considera como un grupo de cepas sensibles y por lo tanto no constituye un grupo independiente del grupo FCZ-R. La diversidad genética sólo se determinó en los grupos CTRL y FCZ-R.

Tabla 8
Determinación de CIM* para grupos CTRL, FCZ-R y FCZ-S según genotipo.

CTRL		FCZ-R		FCZ-S	
GENOTIPO	CIM (µg/mL)	GENOTIPO	CIM (µg/mL)	GENOTIPO	CIM (µg/mL)
C1	0,125	R1	32	S1	32
C2	0,125	R2	32	S2	32
C3	0,125	R3	32	S3	32
C4	0,125	R4	32	S4	32
C5	0,125	R5	32	S5	64
C6	0,125	R6	32	S6	32
		R7	32	S7	N.d.
		R8	32	S8	16
		R9	32		
		R10	32		
		R11	32		

N.d.= No determinado

* : Se utilizó fluconazol puro generosamente donado por Laboratorios Pfizer ®

X Diversidad genética

Se estimó la diversidad genética, (G) y la proporción de genotipos diferentes para cada uno de los grupos en estudio, el CTRL y FCZ-R (Tabla 9). El grupo FCZ-R, exhibió la mayor diversidad genética (G = 5,0) y proporción de genotipos, constituyendo este grupo el de mayor variación (55,0 %), mientras que, el grupo CTRL presentó la menor diversidad (30,0 %). Además, se estimó la diversidad genotípica para cada uno de los partidores, con el fin de establecer cuan sensible fueron los partidores utilizados para detectar microevolución (Tabla 10). La mayoría de los partidores mostraron algún grado de diversidad: los partidores OP BA03 y OP BA09 mostraron diversidad sólo en un grupo (CTRL), los partidores OP BA07, OP BA10 y OP BA 15 mostraron diversidad en ambos grupos. Los partidores OP BA14 y OP BA 09 no lograron mostrar diferencias entre cepas

(G = 1). Estos resultados muestran que la mayoría de los partidores utilizados en este estudio fueron capaces de detectar microevolución.

Tabla 9
Diversidad y proporción de genotipos diferentes para cada grupo en estudio.

Cepa	Diversidad (G)	Porcentaje (%)
CTRL	3,76	30,0
FCZ-R	5,00	55,0

Tabla 10
Diversidad genotípica **G** de cada grupo utilizando sólo un partidador.

Cepa	OP BA03	OP BA07	OP BA09	OP BA10	OP BA14	OP BA15
CONTROL	1,11	1,38	1,00	1,67	1,00	1,25
FCZ-R	1,00	1,92	1,00	1,36	1,00	1,72

DISCUSION

Las candidiasis producidas por *C. dubliniensis* pueden llegar a ser letales cuando se establecen a nivel sanguíneo (candidemias), pero generalmente están asociadas a enfermedades superficiales, como las infecciones orofaríngeas. Sin embargo, todas requieren tratamiento antifúngico (Gee *et al.*, 2002; Sullivan *et al.* 2005).

El tratamiento antifúngico con azoles es efectivo pero se han reportado casos refractarios al tratamiento. *Candida dubliniensis* tiene la capacidad de desarrollar resistencia a diferentes antifúngicos. En pacientes con candidiasis esofageal y SIDA se ha descrito la aparición de resistencia a FCZ durante el tratamiento (Sullivan & Coleman, 1998; Ruhnke *et al.* 2000; Gee *et al.* 2002).

La resistencia secundaria de *C. dubliniensis*, después de la exposición a un antifúngico, está dada por mecanismos similares a los encontrados en *C. albicans*. Así se han descrito mutaciones en el gen *ERG 11*, sobreexpresión de los genes *CDR1* y *CDR2*, así como del gen *MDR1* (Rex *et al.*, 2001; Cowen *et al.*, 2002 B; Shin *et al.*, 2004; Sobel *et al.*, 1998) (Moran *et al.*, 1998).

Hay estudios recientes que han intentado correlacionar su habilidad para experimentar microevolución, tanto *in vivo* como *in vitro*, con su capacidad de generar resistencia frente a los antifúngicos, pero éstos no han sido concluyentes (Gee *et al.*, 2002).

El objetivo general del presente estudio fue determinar la ocurrencia de microevolución *in vitro* en la levadura *C. dubliniensis*, expuesta a FCZ y analizar su relación con la aparición de cepas menos susceptibles a este antifúngico. Para ello se trabajó con la cepa Pb 16-1 de *C. dubliniensis*, la que tiene una valor CIM de 0,5µg/mL frente al FCZ.

Con relación al aislamiento de las cepas a concentraciones de 50, 70 y 128 µg/mL y sus equivalentes controles, se pudo apreciar que el método usado en medio sólido no logró discriminar entre cepas sensibles y menos sensibles o resistentes, pues como se puede

apreciar en la Tabla 3, todas las colonias controles mostraron crecimiento en medio AS+FCZ tanto a concentraciones de 50, 70 y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este resultado difiere de los encontrado por Gee *et al.* (2002), quienes con este mismo método discriminaron entre las cepas controles y cepas menos susceptibles. Una de las explicaciones factibles sería el uso del medio Agar Saboureaud, el cual tiene un pH relativamente ácido (5,5) lo que podría interferir con la acción del FCZ. Sin embargo, cuando se repitieron las pruebas usando medio sólido YPD con un pH aproximado a 6,5 el resultado fue relativamente el mismo (Datos no mostrados).

Entonces fue necesario recurrir a un método que evitara esta situación y que tuviera la capacidad de diferenciar las colonias controles de las colonias menos susceptibles. Finalmente, se desarrolló una prueba en medio líquido, basada en el método CIM (NCCLS, 1992)

Los resultados de este último método fueron satisfactorios, ya que se observó que todas las colonias controles crecieron en medio líquido YPD, pero ninguna fue capaz de crecer en medio YPD+FCZ a 50 o 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este hecho era esperado pues, a pesar de que sufrieron microevolución no estuvieron bajo una selección por antifúngico. Esto también concuerda con el trabajo de Gee *et al.* 2002 ya que sus colonias controles tampoco crecieron en medio con antifúngico.

En cuanto a las colonias que habían estado bajo tratamiento con FCZ, se observó que todas tenían crecimiento en medio YPD, mientras que la mayoría tuvo crecimiento en YPD+FCZ, tanto a 50 como a 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FCZ. Estos resultados concuerdan con lo observado por Ruhnke *et al.* (2000), quienes observaron el desarrollo de colonias resistentes en pacientes bajo tratamiento antifúngico. La determinación de los valores CIM de algunas de estas cepas comprobó la reducida susceptibilidad encontrada (CIM de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por otro lado, las cepas aparentemente sensibles (FCZ-S), aquellas que crecieron en YPD+FCZ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostraron igualmente valores CIM de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo tanto estas cepas fueron consideradas como cepas menos susceptibles.

En relación con la selección de los partidores, se pudo apreciar que de los 14 analizados la mayoría presentaba un buen número de bandas. Sólo 2 de ellos, el OP BA 01 y OP BA 04 no amplificaron, lo que se explicaría por la falta de regiones homólogas en el genoma de la cepa Pb16-1, por la falta de hibridación de los partidores en el sentido apropiado, o hibridación de los partidores a una distancia excesiva (aproximadamente > 4.0 Kb). Se seleccionaron aquellos partidores que mostraron diferencias entre colonias, como lo fueron el OP BA 07, OP BA09, OP BA10, OP BA14 y OP BA15.

En cuanto a los perfiles RAPD obtenidos a partir de las cepas en estudio, CTRL y FCZ-R, éstas obtuvieron un coeficiente de similitud $S_{AB} = 0,96$, valor esperable considerando que la microevolución esta definida como la ocurrencia de pequeños cambios acumulativos en el tiempo (Lockhart *et al.*, 1996). Sin embargo, la menor similitud de la cepa original Pb 16-1 y la aparición de 19 genotipos nuevos dan cuenta de la capacidad de cambio que puede lograrse mediante este mecanismo.

En el dendrograma no fue posible observar agrupaciones o “clusters” específicos que se pudieran asociar a un fenotipo de resistencia o de susceptibilidad particular. Así mismo, no se observó ningún genotipo común o marcador asociado al grupo FCZ-R.

Es interesante notar que se presentaron 2 genotipos comunes ($S_{AB} = 1$) en los grupos CTRL y FCZ-R, lo que sugeriría que los cambios microevolutivos que ocurrieron en estas colonias o que se pudieron detectar no estaban relacionados con la resistencia.

Cabe señalar que el grupo que alcanzó una mayor variación genotípica fue el FCZ-R, con 11 genotipos, dos de ellos (R10 y R11) mostraron la mayor distancia genética respecto al grupo CTRL.

Los resultados anteriormente mencionados podrían indicar que la exposición a FCZ favorecería la aparición de variantes genéticas. Gee *et al* 2002, también encontraron mayor variación genética cuando compararon las cepas que habían estado sometidas a tratamiento con FCZ con las que no fueron tratadas. Esto se ve reflejado en las mayores distancias

genéticas observadas en el grupo FCZ-R.

Las 168 colonias que estuvieron bajo tratamiento con FCZ mostraron menor susceptibilidad, en contraste con el grupo CTRL, en el que de 156 colonias, ninguna desarrolló menor susceptibilidad a la droga. Esto demuestra que la exposición a la droga conlleva rápidamente al desarrollo de una disminución de la susceptibilidad al antifúngico (Moran *et al.* 1997).

Los valores de CIM fueron consistentes con los resultados anteriores pues dieron cuenta que el grupo CTRL produjo menos variantes y mantuvo el CIM de la cepa original (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en todos sus genotipos. En cambio el grupo FCZ-R produjo 11 variantes genotípicas, las cuales experimentaron aumento en sus CIM a valores de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Cuando se calculó la diversidad para obtener una visión más real de la microevolución ocurrida en cada grupo se observó que el grupo FCZ-R obtuvo la mas alta diversidad con un $G=5$, mientras que el grupo CTRL $G=3,76$. Incluso, si se tomara en cuenta el grupo aparentemente sensible (FCZ-S) como parte del grupo de resistentes, la diversidad aumentaría a $G=8,2$.

Se sabe que en *C. albicans* y *C. glabrata*, mutaciones genéticas en el gen *ERG 11*, rearrreglos cromosómicos, sobreexpresión de genes, alteración de metabolismo, son causales de adquisición de resistencia (Cowen *et al.*, 2002a; Marichal *et al.*, 1997). Por microevolución todos estos cambios genéticos podrían ocurrir, afectando la susceptibilidad al FCZ, de forma directa o indirecta. La mayor diversidad genética encontrada en el grupo FCZ-R (diversidad $G=5$), concuerda con lo anterior, sugiriendo que la microevolución aumenta las probabilidades de que en una población aparezcan individuos menos susceptibles o resistentes. Por el contrario, la ocurrencia de una menor microevolución en el grupo CTRL (diversidad $G=3,7$) reduce las posibilidades de adquirir resistencia.

En contraste con los resultados del presente trabajo, Gee *et al.* (2002) encontraron niveles de variación genética similares entre el grupo que se mantuvo sensible a FCZ y aquel que fue menos sensible, concluyendo que no había evidencia para confirmar la relación entre la

microevolución y la adquisición de resistencia. Una probable explicación de estos resultados es que los métodos utilizados para detectar microevolución no fueron los suficientemente sensibles.

Finalmente, parece interesante invitar a desarrollar futuras investigaciones en relación con el fenómeno de microevolución y lograr determinar la implicancia exacta que tendría en el proceso de adquisición de resistencia. Para ello podría aumentarse el número de partidores, y el número de cepas de *C. dubliniensis* a examinar mediante RAPD. Sería interesante determinar mediante técnicas de genotipificación, como el RAPD, la presencia de perfiles de amplificación comunes en las cepas resistentes, que permitan correlacionarlos a la resistencia de algún tipo de droga antifúngica y, así utilizar esta información como un marcador epidemiológico de resistencia, de tal manera de identificar rápidamente posibles dificultades en el tratamiento, y mejorarlo haciéndolo rápido y eficaz.

CONCLUSIONES

1. De los 14 partidores analizados, 6 de ellos (OPBA 03, OPBA 09, OPBA 10, OPBA 11, OPBA 14 y OPBA 15) fueron capaces de revelar pequeñas diferencias genéticas entre las cepas de *Candida dubliniensis* debido a microevolución.
2. En las condiciones experimentales, la cepa Pb16-1 de *Candida dubliniensis* con un valor CIM de 0,5 µg/mL fue capaz de disminuir su sensibilidad a fluconazol durante la exposición a concentraciones crecientes de este antifúngico, alcanzando valores CIM de 32 µg/mL al cabo de 350 generaciones aproximadamente.
3. La cepa Pb16-1 expuesta a concentraciones crecientes de fluconazol experimentó mayor microevolución alcanzando, al cabo de 350 generaciones, una diversidad genética mayor a la obtenida por el grupo CTRL.
4. Una mayor .ocurrencia de microevolución ocurrida en el grupo menos sensible (FCZ-R) favorece la adquisición de resistencia a fluconazol. Por el contrario, la ocurrencia de una menor microevolución en el grupo CTRL reduce las posibilidades de adquisición de resistencia.
5. De acuerdo al diseño experimental y resultados se puede concluir que existe una relación entre la ocurrencia de microevolución en cepas cultivadas in vitro de *Candida dubliniensis* y su capacidad de disminuir su sensibilidad al fluconazol.

BIBLOGRAFÍA

- Arenas, R.** 2003. *Micología Médica Ilustrada*. 2ª ed. Editorial McGraw Hill. México DF, México. 352 p.
- Brandt, M., Harrison, L., Pass, M., Sofair, A., Huie, S., Li, R., Morrison, C., Warnock, D. and Hajjeh, R.** 2001 *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in north. *America Emerg Infect Dis.* 6(1): 46-9.
- Calderone, R.** 2002. *Candida and candidiasis*. Editorial ASM Press, Washington DC, USA. 451 p.
- Cimolai, N., Davis, J., and Trombley, C.** 2002 *Candida dubliniensis* fungemia and vascular access infection. *J Ped Hem Onc.* 24(3):237-239.
- Cowen, L., Sanglard, D., Calabrese, D., Sirjusingh, C., Anderson, J., and Kohn, L.** 2000. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 182: 1515-1522.
- Cowen, L., Anderson, J. and Kohn, L.** 2002 a. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 139–165.
- Cowen L., Nantel A., Whiteway M., Thomas D., Tessier D., Kohn L. and Anderson J.** 2002 b. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *PNAS* 99: 9284-9289.
- Dice, L.** 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-300.
- Fotadar, R. and Al-Hedaithy, S.** 2003. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1907-1911.
- Fotadar, R. and Al-Hedaithy, S.** 2004 Prevalence of *Candida dubliniensis* among gram tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses* 47: 150-155.
- Gee, S., Joly, S., Soll, D., Meis, J., Verweij, P., Polacheck, I., Sullivan, D. and Coleman, D.** 2002. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* & detection of microevolution *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 556-574
- Hazen, K.** 1995. New and emerging yeasts pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 462-478
- Hoog, G. and Guarro, J.** 1996. *Atlas of clinical fungi*. 2ª ed. Centralbureau voor Schimmelcultures y Universitat Rovira i Virgili. Netherlands. 1126 p.
- Joly, S., Pujol, C., and Soll, D.** 2002. Microevolutionary changes and chromosomal translocations are more frequent at RPS loci in *Candida dubliniensis* than in *Candida*

albicans infection. Infect Genet Evol. 2:19-37.

Kim, J., Garofalo, L., Blecker-Shelly, D. and McGowan, K. 2003 *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: restriction identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans* J. Clin. Microbiol. 41, 3354-3357.

Kurtzman, C. and Fell, J. 1998. The yeast, a taxonomic study. 4^a ed. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, The Netherlands. 1055 p.

Kwon-chung, C. and Bennett, J. 1992. Medical Mycology. Lea & Febiger, London, Philadelphia. 375 p.

Lockhart, S., Reed, B., Pierson, C. and Soll, D. 1996. Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with “substrain shuffling”: demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1 and CARE2. J. Clin. Microbiol. 34: 767-777.

Mähnß, B., Stehr, F., Schafer, W. and Neuber, K. 2005. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Mycoses 48, 55-61.

Marichal, P., Vanden Bossche, H., Odds, F., Nobels, G., Wrnock, D., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S. and Mose-Larsen, P. 1997. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob. Agents Chemoter. 41:2229-2237.

Marot-Leblond, A., Grimaud, L., David, S., Sullivan, D., Coleman, D., Ponton, J. and Robert, R. 2004 Evaluation of rapid immunochromatographic assay for identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. J. Clin. Microbiol. 42: 4956-4960.

Meis, J., Ruhnke, M., De Pauw, B., Odds, F., Siegert, W. and Verweij, P. 1999. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. Emerg. Infect. Dis. 5: 150-153.

Moran, G., Sullivan, D., Henman, M., McCreary, C., Harrington, B., Shanley, D. and Coleman, D. 1997. Antifungal drug susceptibility of oral *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemoter. 41:617–623.

Moran, G., Sanglard, D., Donnelly, M., Shanley, B., Sullivan, D. and Coleman, D. 1998. Identification and Expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. Antimicrob. Agents and Chemoter. 42: 1819–1830.

Moran, G., Sullivan, D., Morschhäuser, J. and Coleman, D. 2002. The *Candida dubliniensis* *CdCDR1* gene is not essential for fluconazole resistance antimicrob. Agents Chemoter. 46: 2829-2841.

Mosca, C., Moragues, M., Brena, S., Rosa, A. and Ponton, J. 2005. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med. Oral Cir. Bucal.* 10:28-31.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standards M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Pincus, D., Coleman, D., Pruitt, W., Padhye, A., Salkin, I., Geimer, M., Bassel, A., Sullivan, D., Clarke, M. and Hearn, V. 1999. Rapid Identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems. *J. Clin. Microbiol.* 37:3533–3539.

Pinjon, E., Moran, G., Jackson, C., Kelly, S., Sanglard, D., Coleman, D. and Sullivan, D. 2003. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis* antimicrob. *Agents Chemother.* 47:2424-2437.

Polacheck, I., Strahilevitz, J., Sullivan, D., Donnelly, S., Salkin, I. and Coleman, D. 2000. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J. Clin. Microbiol.* 38: 170-174.

Rex, J., Pfaller, M., Walsh, T., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum M., Gosey, L., Odds, F., Rinaldi, M., Sheehan, D. and Warnock, D. 2001. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:643-658.

Ruhnke, M., Schmidt-Westhausen, A. and Morschhauser, J. 2000. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 291-295.

Shin, J., Park, M., Song, J., Shin, D., Jung, S., Cho, D., Kee, S., Shin, M., Suh, S. and Ryang, D. 2004 Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4025-4031.

Sneath and Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman & Co., San Francisco. 573 pgs.

Sobel, J., Faro, S., Force, R., Foxman, B., Ledger, W., Nyirjesy, P., Reed, B. and Summers, P. 1998. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178: 203-211.

Stoddart, J. and Taylor, J. 1987. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics* 118: 705-711

Sullivan, D., Westerneng, T., Haynes, K., Bennett, D. and Coleman, D. 1995. *Candida dubliniensis* sp.nov: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol.* 141: 1507–1521.

Sullivan, D. and Coleman, D. 1998. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. J. Clin. Microbiol. 36: 329-34.

Sullivan, D., Moran, G. and Coleman, D. 2005. *Candida dubliniensis*: Ten years on. FEMS Microbiol lett 253: 9-17

Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. and Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1875-1881.

ANEXO

1. Medios de cultivo

a) Agar Sabouraud (1Lt)

Peptona	10 g
Glucosa	35 g
Agar	15 g
pH	5.6

b) Agar Maíz con Tween 80 (1Lt)

Harina de Maíz	10 g
Tween 80	10 g
Agar	15 g
pH	7.0

c) Medio Xilosa (1Lt)

Sulfato de Amonio	5.0 g
Fosfato Monopotásico	1.0 g
Sulfato de Magnesio	0.3 g
Xilosa	10.0 g
Agar	16.5 g
pH	6.0

d) Medio YPD (1Lt)

Extracto de Levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
pH	6.0

2. Soluciones

a) TAE 50X

Tris	242 g/L
Acido acético glacial	57.1 mL/L
EDTA (0,5M) pH 8.0	100 mL/L

b) TE (pH 7,6)

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

3. Ecuaciones

a) Ecuación de Gompertz, modificada por Zwietering *et al.*, 1990.

$$\text{Log } N = A + D e^{-e^{-B(t - M)}}$$

Donde;

N: Es el número de individuos
A: Es el menor valor de la curva
D: Es el mayor valor de la curva

B: Tasa de crecimiento, pendiente
t: Tiempo
M: Tiempo de máximo crecimiento

b) Coeficiente de DICE

El coeficiente de DICE (Dice, 1945), mide la proporción de bandas comunes entre dos individuos a través de la siguiente ecuación:

$$S_{AB} = 2E / (2E + a + b)$$

Donde;

E: Es el número de bandas compartidas por las cepas A y B
a: Es el número de bandas presentes sólo en la cepa A
b: Es el número de bandas presentes sólo en la cepa B.

Un S_{AB} de 1 significa que las cepas comparten un patrón de bandas idéntico y un S_{AB} de 0 significa que las cepas presentan un patrón de bandas completamente diferente, considerando S_{AB} entre 0,01 y 0,99 como un rango de similitud creciente.

4. Software Utilizado

a) Kodak 1D v3.6

Eastman Kodak Company. 2003. KODAK 1D Image Analysis software v3.6.2.

b) RAPDistance.

Armstrong, J., Gibbs, A., Peakball, R. and Weiller, G. 1994. The RAPDistance Package. Version 1.04. <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>

5. Partidores RAPDs

Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en cada reacción de RAPD

IDENTIFICACIÓN	SECUENCIA NUCLEOTIDICA 5' → 3'
OPBA 01	TTCCCCACCC
OPBA 02	TGCTCGGCTC
OPBA 03	GTGCGAGAAC
OPBA 04	TCCTAGGCTC
OPBA 05	TGCGTTCCAC
OPBA 06	GGACGACCGT
OPBA 07	GGGTCGCATC
OPBA 08	CCACAGCCGA
OPBA 09	GGA ACTCCAC
OPBA 10	GGACGTTGAG
OPBA 11	CCACCTTCAG
OPBA 12	TGTTGGGCAC
OPBA 14	TCGGGAGTGG
OPBA 15	GAAGACCTGG

Fuente: Operon Technologies[®], INC. Alameda, CA