



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**CLONALIDAD DE CEPAS PATÓGENAS Y COMENSALES DE  
*CANDIDA ALBICANS* DE PACIENTES HUMANOS CON  
CANDIDEMIA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.**

**KAREN CASTAÑÓN SANTIBÁÑEZ**

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

**PROFESOR GUIA: VICTOR SILVA VARGAS**  
**SANTIAGO, CHILE**

2007

## RESUMEN

*Candida albicans* es una levadura comensal que forma parte de la microbiota de las mucosas en el hombre, sin embargo es también un patógeno oportunista, responsable de infecciones invasoras, principalmente nosocomiales endógenas, las que presentan una alta morbiletalidad. Debido a que el estado sexual no es conocido en *C. albicans*, se espera que su estructura poblacional sea primariamente clonal, por esta razón un individuo puede portar clones de una cepa colonizante, en distintos lugares anatómicos, los que bajo ciertas condiciones, principalmente del hospedero, pueden producir infección. En Chile no existen estudios que revelen la relación de origen entre cepas colonizantes e infectantes, por lo tanto, resulta relevante profundizar el conocimiento sobre la epidemiología de la infección por *C. albicans*.

El objetivo de este trabajo fue analizar genéticamente cepas patógenas de *C. albicans*, aisladas de hemocultivo, y cepas comensales provenientes de sitios colonizados de un mismo paciente con diagnóstico comprobado de candidemia, con el fin de determinar la relación de origen de estas cepas. Para esto, se analizaron molecularmente 35 cepas, identificadas previo al estudio como *C. albicans*, provenientes de ocho pacientes internados en Unidades de Pacientes Críticos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. De estas 35 cepas, cuatro se identificaron posteriormente como *C. dubliniensis* y provenían de un mismo paciente.

Las cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron genotipificadas inicialmente mediante el método de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), utilizando cinco partidores con actividad discriminatoria intraespecie. Se determinó el grado de similitud entre cepas mediante Coeficiente de Dice y se construyó un dendrograma, mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Whit Arithmetic Averages). Los resultados mostraron que casi en la totalidad de los pacientes, los aislados propios de cada uno fueron agrupados en "cluster" únicos con una alta similitud genética ( $S_{AB} \geq 0.9$ ), demostrando el origen clonal de los aislados y, en algunos casos, la existencia de fenómenos microevolutivos y reemplazo de cepas.

Posteriormente se analizaron las cepas de *C. albicans* a través de la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturante (DGGE), mediante la amplificación de la porción final del 18S, el ITS1, el 5.8S y parte del ITS2 del ADN ribosomal. Los resultados del DGGE mostraron que las bandas pertenecientes a cada uno de los aislados en estudio migraron a la misma altura, sin conseguir evidenciar las diferencias genéticas existentes entre aislados de un mismo paciente y entre pacientes.

El análisis estadístico, mediante el Test de McNemar, permitió establecer que el método de RAPD presenta un mayor rendimiento que el DGGE para la genotipificación de cepas de *Candida* spp.

Finalmente, al comparar ambos métodos de genotipificación, sólo el RAPD pudo determinar que las cepas patógenas y comensales de *C. albicans*, provenientes de un mismo paciente con candidemia, están en su gran mayoría, relacionadas clonalmente.

## SUMMARY

*Candida albicans* is a commensal yeast that comprises the microbiota of the mucous in the human being. Nevertheless, *C. albicans* is also an opportunistic pathogen, mainly responsible for endogenous nosocomial and invading infections that cause a high morbidity and mortality. Because a sexual state is not known in *C. albicans*, it is expected that their population would be primarily clonal. Therefore, a person could have clones of a colonizing strain at different anatomical places, and any of them could produce infection depending on certain conditions of the host. In Chile there are no studies that relate colonizing and infecting strains, therefore, it is relevant to know the epidemiology of the infection by *C. albicans*.

The aim of this study was to genetically analyze pathogenic strains of *C. albicans*, isolated from hemoculture and commensal strains originated from colonized sites of a same patient with candidemia, in order to determine the origin relation of these strains. For this purpose, 35 strains were analyzed. These strains were previously identified as *C. albicans* and were obtained from eight patients committed in Critical Care Units of the Clinical Hospital of the University of Chile. Of these 35 strains, four were later identified like *C. dubliniensis*.

The strains of *C. albicans* and *C. dubliniensis* were initially genotyped by the Random Amplified Polymorphic DNA method (RAPD), using five primers with intraspecies discriminatory ability. The degree of similarity between strains was determined by the Dice Coefficient and a dendrogram was constructed by the UPGMA method (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages), considering all the primers. The results showed that the isolates from every patient were grouped in unique "clusters" with a high genetic similarity ( $S_{AB} \geq 0.9$ ) in almost all patients, demonstrating the clonal origin of the isolates and, in some cases, the existence of microevolutionary phenomena.

Then, the strains of *C. albicans* were analyzed by the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis method (DGGE), by the amplification of the final portion of 18S, the complete ITS1 and 5.8S regions and a piece from the ITS2 of the ribosomal DNA. The results of the DGGE showed that the bands belonging to each one of the isolates in study migrated at the same position without being able to demonstrate the existence of genetic differences among isolates of a same patient and among patients.

The statistical analysis allowed establishing that the RAPD method displays a greater yield than the DGGE for the genotyping of *Candida* spp. strains.

Finally, when both genotyping methods were compared, only RAPD could determine that the pathogenic and commensal strains of *C. albicans* from the same patient with candidemia were highly clone-related.

## INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* es una levadura miembro de la microbiota de las mucosas de los aparatos digestivo, genitourinario, respiratorio y de piel de los humanos, y son estas mucosas los reservorios más importantes y origen de candidiasis endógenas. En estos lugares, *C. albicans* puede ganar dominio y asociarse a otras patologías, especialmente en enfermos debilitados o inmunocomprometidos, para producir infección.

A partir de la década de los ochenta, existe un continuo aumento de las infecciones fúngicas producidas por *Candida* spp., especialmente en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, apareciendo en el 78 a 80% de estas infecciones. Hoy en día, las especies del género *Candida* se encuentran en el cuarto lugar entre las causas más comunes de infección nosocomial del torrente sanguíneo (ITS) en USA, desplazando a patógenos como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este cuarto lugar representa entre un 8 a 15% de todas las sepsis adquiridas en hospital, lo que no es menor. *C. albicans* es el principal agente causal de candidiasis, representando entre un 40 a 80% de los aislamientos, como lo señalan diversos estudios. En Chile, *C. albicans* también es el agente más prevalente, aunque sin superar el 50%.

El aumento en la incidencia de estas infecciones se debe en parte a los avances médico-tecnológicos y al incremento de una población con alto riesgo de sufrir infecciones fúngicas oportunistas. En estos pacientes de alto riesgo, las micosis invasoras son severas, progresan rápidamente, son difíciles de diagnosticar y tratar y presentan una altísima mortalidad. Por esta razón, una rápida identificación de las especies de *Candida* en el laboratorio clínico, se ha convertido de suma importancia. También es de gran relevancia el desarrollo de técnicas moleculares que puedan diferenciar adecuadamente aislados de *Candida* spp., que permitan identificar reservorios y modos de transmisión y que tengan la habilidad de trazar sus vías epidemiológicas.

De especial relevancia es el establecimiento de la relación de origen entre cepas de la misma especie aisladas de un mismo paciente, ya que a pesar de que se señala la adquisición endógena como fuente principal de diseminación a través de propagación clonal, el hecho de que esta levadura esté presente en un alto porcentaje de personas, sin producir enfermedad, plantea ciertas dudas sobre la epidemiología de la infección.

En el presente estudio, se buscó determinar clonalidad entre cepas de *C. albicans* patógenas, aisladas desde sangre, y cepas comensales aisladas de distintos lugares anatómicos, en pacientes con candidemia. Para ello se utilizaron dos métodos de tipificación del ADN genómico como son la amplificación al azar del ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA o RAPD), que ya ha sido estandarizada y utilizada en genotipificación de cepas de *Candida* spp., y la electroforesis en gel con gradiente desnaturalante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis o DGGE), método aplicado exitosamente en la epidemiología molecular de bacterias, pero muy poco utilizada con anterioridad en *Candida* spp., por lo que se comparó con el RAPD.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.- Características del género *Candida*.

El género *Candida* esta constituido por aproximadamente 163 especies, de las cuales cerca de un 10% son reconocidas como patógenas para el hombre (Kurtzman y Fell, 1998; Calderone, 2002a). Las especies de *Candida* son hongos unicelulares o levaduras, ampliamente distribuidas en la naturaleza. El principal representante del grupo es *C. albicans*, aunque otras especies también son fuente de infecciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y críticamente enfermos (Calderone, 2002b).

En los frotis de exudados, *Candida* aparece como una levadura en gemación y en algunos casos, como células alargadas en gemación semejantes a hifas denominadas pseudohifas. En agar Sabouraud, incubado a temperatura ambiente o a 37 °C, se desarrollan colonias de textura cremosa y superficie lisa, blancas, con olor a levadura. El desarrollo superficial de estas colonias en el agar consiste en células ovales en gemación. El desarrollo sumergido consiste en pseudomicelios. Este pseudomicelio está compuesto de pseudohifas, que forman blastoconidios (estructura que se desarrolla por gemación, con la separación subsiguiente de esta yema de la célula progenitora) en sus terminales (Calderone, 2002a).

*Candida albicans* es un hongo que presenta transición morfológica, es decir, toma forma de levadura en saprofitismo o al colonizar un hospedero, pero cuando produce infección toma la forma filamentosa. Por esta razón, en presencia de suero o plasma, puede convertirse a la forma de hifa formándose inicialmente un tubo germinal (Calderone, 2002a). La mayoría del tiempo existe como una sola célula oval con un diámetro de 4 a 6 x 6 a 10 µm. Las pseudohifas, compuestas por cadenas de células no septadas, se pueden formar de las células que están en gemación, las cuales siguen unidas una a la otra.

*Candida albicans* también puede formar clamidoconidios, que corresponden a células esféricas de aproximadamente 8 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, en las terminales o intercaladas en una hifa, que crecen y desarrollan paredes gruesas, refractantes y resistentes a condiciones ambientales desfavorables, cuando la levadura es incubada en medios nutricionalmente pobres (Calderone, 2002a). Las cepas de *C. albicans* producen colonias cremosas, pastosas, suaves y lisas, de color blanco en el agar Sabouraud-Glucosa y no producen ningún crecimiento superficial cuando están inoculados en caldo.

*Candida albicans* vive como comensal en la mayoría de los individuos sanos, sobre todo en el aparato gastrointestinal sin ningún efecto perjudicial, es más, esta levadura está presente en uno o más partes del cuerpo hasta en un 70% de individuos sanos (Kam y Xu, 2002). Sin embargo, es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, convirtiéndose en el principal patógeno fúngico en los seres humanos (Calderone, 2002b). Esta levadura produce infecciones superficiales leves y transitorias en individuos con sistema inmune normal, pero puede causar infecciones mucocutáneas, así como infecciones sistémicas con riesgo vital, en pacientes inmunocomprometidos, onco-hematológicos o que sufren de otra patología subyacente, o bien en pacientes que se recuperan de cirugía mayor, recién nacidos, prematuros, pacientes quemados, entre otros (Calderone, 2002b; Cheng *et al.*, 2006).

## **2. Diagnóstico de Laboratorio**

El diagnóstico macroscópico determina la morfología de las colonias, es decir, su tamaño, forma, número, color, textura, etc. El diagnóstico microscópico, por medio de micromorfología, permite observar las características de las hifas, pseudohifas y blastoconidios, entre otras estructuras.

## **2.1 Examen Microscópico Directo.**

Este examen se realiza con la preparación en fresco, con o sin soluciones clarificadoras como KOH 10 ó 20%, posicionada en un portaobjeto y cubierta por un cubreobjeto. La solución clarificadora puede contener tinta para aumentar el contraste. Al microscopio es posible observar determinada especie en forma de levadura, pseudohifa o hifa, según corresponda. Además permite observar otras estructuras como son los blastoconidios. Si se desea observar con el lente de inmersión, se recomienda utilizar la tinción Gram o Giemsa (Hermosilla *et al.*, 2005).

## **2.2 Cultivo.**

**2.2.1 Aislamiento.** Se utiliza más de un tipo de medio de cultivo para aislar levaduras desde regiones colonizadas, como son el Agar Sabouraud-Glucosa 2% y algún medio cromogénico, para diferenciar distintas especies de levadura gracias a características fenotípicas (color) fácilmente distinguibles. Estos medios de cultivo se incuban a 37 °C. En el caso de levaduras aisladas de micosis invasoras, se siembran varias placas con uno o ambos medios de cultivo y se incuban a 25 y 37 °C. Los cultivos crecen entre 24 a 72 horas (Hermosilla *et al.*, 2005; Silva, 2006).

**2.2.2 Identificación de Especie.** Antes de identificar la especie, primero se identifica el género analizando las características de la colonia, como son textura, forma, color, tamaño, etc. La identificación de la especie se realiza a través de los métodos estándares clásicos como son la prueba del tubo germinal, el microcultivo y el auxanograma, pudiendo combinarlos con sistemas comerciales (Hermosilla *et al.*, 2005; Silva, 2006).

### **a) Prueba Fisiológica de Producción del Tubo Germinal.**

La prueba del tubo germinal sirve como “screening” para *C. albicans*, ya que sólo esta levadura es capaz de desarrollar esta estructura.

Un primer paso es la inoculación de la levadura fresca, a partir de cultivos de 24 a 48 horas, en un tubo eppendorf con plasma o suero fresco humano, para luego incubarlo a 37 °C por 2 a 3 horas. La prueba resulta positiva cuando se observa al microscopio la presencia de un tubo fino de paredes paralelas, sin punto de contricción en la unión con la célula madre (Hermosilla *et al.*, 2005; Silva, 2006). Aunque esta prueba nos orienta con respecto a la especie de levadura aislada, se debe acompañar de microcultivo y pruebas bioquímicas.

### **b) Microcultivo para Levaduras.**

En el microcultivo, la muestra de levadura es sembrada en estrías paralelas sobre agar maíz o arroz con Tween 80 al 1%, en cámara húmeda, incubándose a 25 °C entre 2 a 3 días. Cuando la especie aislada en el microcultivo es *C. albicans*, ésta se presenta como levadura o pseudohifa, observándose además racimos de blastoconidios y clamidoconidios (Hermosilla *et al.*, 2005).

### **c) Pruebas Bioquímicas.**

Un último paso para la identificación de especie, es la realización de estas pruebas. El método clásico consiste en la detección de la asimilación de hidratos de carbono (auxanograma) y de fuentes de nitrógeno e hidrólisis de urea. En el método comercial, que consiste en galerías comerciales con substratos deshidratados en pocillos, se prepara un inóculo de levadura comparable con un estandar de turbidez proporcionado por el fabricante. Del inóculo se extraen 100 µl y se depositan en cada posillo. La galería se incubaba a 25 °C por 24 a 48 horas. Para interpretar los resultados, el fabricante proporciona un código numérico que se compara con el código obtenido de la galería (Hermosilla *et al.*, 2005; Silva, 2006). En el caso de *C. albicans*, ésta fermenta la glucosa y la maltosa, produciendo ácido y gas, genera ácido de la sacarosa y no ataca la lactosa (Calderone, 2002a; Silva, 2006).

### 3.- Epidemiología de la Infección por *Candida* spp.

La epidemiología de la infección por *Candida* spp., es controversial y compleja (Shin *et al.*, 2005; Bassetti *et al.*, 2006; Odds *et al.*, 2006). Es habitualmente aceptado que estas infecciones son resultado de una invasión producida por la microbiota endógena de cada paciente y que, por lo tanto, estas cepas de *Candida* spp., que causan infección son las mismas que aquellas encontradas previamente en pacientes colonizados (Hedderwick *et al.*, 2000; Magill *et al.*, 2006). Con respecto a esto último, en el estudio realizado por la European Confederation of Medical Mycology (ECMM) sobre la epidemiología de la candidemia, se registró que la misma especie de *Candida* spp., encontrada previamente en el tracto gastrointestinal, fue aislada de sangre, en el 80% de los pacientes que presentaron posteriormente candidemia por *C. albicans* y por *C. glabrata* (Tortorano *et al.*, 2004).

La importancia clínica de la colonización por *Candida* spp. en diferentes lugares del cuerpo también es controversial. Algunos autores discuten si las cepas que colonizan distintos lugares anatómicos, causarían subsecuentemente candidemia.

Uno de los primeros estudios que abordaron este tema fue realizado por Reagan *et al.*, 1990, arrojando como resultado que cepas de *Candida* spp., colonizantes y subsecuentemente infectantes, eran genéticamente idénticas en el 94% de los pacientes analizados mediante RED (digestión de ADN cromosomal mediante endonucleasas de restricción). Resultados similares presentan Voss *et al.*, 1994, quienes encontraron que el 84% de los pacientes con candidemia presentaron cepas colonizantes e infectantes idénticas, a través de cariotipo electroforético y REAG (análisis del ADN genómico mediante endonucleasas de restricción). Un estudio posterior, realizado mediante hibridación por “southern blot” con sonda repetitiva Ca3, registró que los aislados de sangre y de sitios colonizados eran idénticos en el 90% de los pacientes (Marco *et al.*, 1999). Tavanti *et al.*, 2001., realizaron un estudio en pacientes transplantados que sufrieron candidiasis invasora. En este estudio encontraron que las cepas colonizantes, aisladas previo al trasplante, y las cepas infectantes eran idénticas genéticamente en el 72% de los pacientes, utilizando la hibridación por “southern blot” con sonda repetitiva 27A.

De acuerdo con estos resultados, la colonización de sitios periféricos tales como piel, tracto gastrointestinal, mucosa oral y respiratoria ha sido identificada como un factor de riesgo independiente de candidemia en neonatos, pacientes con trasplante de médula, neutropénicos y pacientes críticamente enfermos (Cheng *et al.*, 2006; Fanello *et al.*, 2006; Magill *et al.*, 2006). Con respecto a esto, estudios iniciales sobre la importancia de la colonización, determinaron que uno de los factores de riesgo independiente asociado a candidemia, junto con la cateterización venosa, el uso de antibióticos y la estadía en UCI, era la colonización previa por *Candida* spp., en distintos lugares del cuerpo (Wey *et al.*, 1988; Pittet *et al.*, 1994). Esto último también lo señalan estudios posteriores en el mismo tema (Yazdanparast *et al.*, 2001; Magill *et al.*, 2006), es más, uno de estos estudios reporta un aumento en la incidencia de candidiasis invasora, en relación con el número de lugares anatómicos colonizados (Yazdanparast *et al.*, 2001). Sin embargo, un solo factor de riesgo de forma aislada, es improbable que pueda predecir la posterior infección por *Candida* spp., ya que el valor predictivo positivo de cada uno de estos factores es bajo, como lo señalan distintos investigadores (Pittet *et al.*, 1994; Magill *et al.*, 2006).

Estos antecedentes sugieren que cepas de distintos lugares anatómicos de un mismo individuo provienen de una única cepa progenitora, que se ha adaptado a diversas condiciones ecológicas propias de cada individuo (Hossain *et al.*, 2003). El problema comenzaría cuando una persona experimenta una cierta alteración en las barreras anatómicas de distintos órganos o sistemas, en la microbiota del cuerpo, en la fisiología normal y en la inmunidad celular, debido a una enfermedad hematológica, neutopenia, cáncer, diabetes *mellitus* y nacimientos prematuros o bajo peso al nacer (Calderone, 2002b; Galván y Mariscal, 2006). Distinto es lo encontrado por otros investigadores, los que señalan que en su estudio les fue imposible establecer la relación entre colonización y una subsiguiente candidiasis invasora (Viudes *et al.*, 2002; Charles *et al.*, 2005).

Contrario a lo señalado anteriormente, varios reportes sobre brotes de infecciones producidas por *Candida* spp., sostienen además, la adquisición exógena de levaduras, tras la colonización de catéteres y dispositivos intravasculares, por contaminación de medicamentos e infusiones, o debido a la transmisión cruzada a través de las manos del

personal hospitalario y también paciente-paciente (Hedderwick *et al.*, 2000; Boccia *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003a; Shin *et al.*, 2005). Aunque no ha sido comprobado, estas cepas exógenas podrían ser más agresivas y derivadas de un solo grupo de prevalencia ubicuo. Además podrían ser responsables aproximadamente de un tercio de todas las infecciones por *Candida* spp., en todo el mundo. La evidencia sugiere que pueden no sólo ser más virulentas sino también ser más resistentes a drogas antifúngicas (Jain *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002).

En relación a la adquisición exógena de cepas infectantes, se ha encontrado evidencia de reducida diversidad genética entre cepas de *C. albicans* de cavidad bucal de distintos pacientes infectados con VIH que sufren candidiasis oral, sugiriendo la posibilidad de que la cepa comensal es reemplazada por cepas genéticamente más uniformes, antes del establecimiento de la candidiasis (Pizzo *et al.*, 2002). Esto también se ha descrito en pacientes que presentan candidemia por *C. albicans*, independiente de su estado de portador de VIH, en los cuales un mismo genotipo es encontrado entre los distintos pacientes (Boccia *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2005). Por otra parte, el análisis de cepas de *C. albicans* de distintos sitios anatómicos colonizados, realizado por otros investigadores, sugiere que los distintos sitios anatómicos pueden seleccionar ciertos genotipos y que estos genotipos serían causales de infección (Schmid *et al.*, 1999; Tavanti *et al.*, 2005).

Estas dos hipótesis ofrecen diferentes escenarios con respecto a las poblaciones de *C. albicans*. La hipótesis del reemplazamiento, de cepas comensales por cepas más uniformes genéticamente, predice un grado significativamente más bajo de diversidad genética y un alto grado de similaridad genética entre cepas asociadas con sitios anatómicos específicos, con ciertos lugares geográficos y/o con ciertos tipos de hospedero (Schmid *et al.*, 1999). En contraste, la hipótesis de persistencia de cepas comensales, puede predecir que cepas de cada sitio anatómico de distintos pacientes, pueden presentar un importante nivel de diversidad genética (Xu *et al.*, 1999).

En resumen, la epidemiología de la infección por *C. albicans* es compleja, existiendo varios escenarios posibles en el origen de la infección por esta levadura, por ejemplo, ha sido demostrado que cepas de *C. albicans* pueden ser reemplazadas unas por otras en

infecciones recurrentes, que diferentes lugares del cuerpo de un mismo individuo sano pueden hospedar cepas comensales relacionadas entre sí (clonales) o no relacionadas entre sí, que un mismo lugar anatómico puede portar distintas especies o cepas diferentes de la misma especie, que las cepas pueden ser transferidas de un individuo a otro (transmisión exógena), que existe una determinada localización geográfica para ciertas cepas y que las cepas colonizantes pueden sufrir “genotypic o substrain shuffling”, debido a fenómenos microevolutivos, principalmente en episodios de infección recurrente. El fenómeno de “substrain shuffling” se define como la presencia de subcepas o subgenotipos, los cuales pueden coexistir en un mismo sitio anatómico (Samaranayake *et al.*, 2003; Odds *et al.*, 2006).

#### **4.- Clonalidad y Microevolución**

En el sentido de origen genético de una población, clonalidad se refiere a que la progenie es genéticamente idéntica a la célula parental. Esto puede ser considerado una situación normal para la mayoría de los microorganismos, ya que como bien es sabido, estos últimos, incluida *C. albicans*, presentan propagación mitótica (Tibayrenc, 1997; Xu y Mitchell, 2002). Debido a que un estado sexual no es conocido en *C. albicans*, su estructura poblacional es primariamente clonal (Fundyga *et al.*, 2002; Odds *et al.*, 2006). Sin embargo varios investigadores señalan que esta levadura presenta una considerable variación genética natural, debido principalmente a fenómenos de microevolución (Shin *et al.*, 2004; Sampaio *et al.*, 2005; Odds *et al.*, 2006). Ante ésto, tres escenarios son los más frecuentes en la genotipificación de cepas de *C. albicans*: clonalidad, microevolución y reemplazo de cepas, fenómeno conocido como “strain replacement” (Sampaio *et al.*, 2005; Odds *et al.*, 2006).

Con respecto a clonalidad, estudios iniciales sobre el tema presentaron evidencia de una estructura poblacional primariamente clonal en *C. albicans*. Este hecho fue demostrado mediante MLEE (electroforesis de multilocus enzimáticos), técnica que registró falta de segregación y falta de recombinación en un set de *C. albicans* aisladas de pacientes VIH positivos (Pujol *et al.*, 1993).

Algo similar se presenta en un trabajo posterior, en el cual, utilizando el RAPD (amplificación al azar del ADN polimórfico), las cepas aisladas de distintos lugares del cuerpo de un mismo paciente, tanto superficiales como profundas, presentaron perfiles idénticos a tiempos distintos de aislamiento, inclusive los patrones obtenidos entre aislados de *C. albicans* de distintos pacientes, son similares unos a otros (Robert *et al.*, 1995). Un estudio reciente, realizado mediante MLST (tipificación por secuenciamiento de multilocus), obtuvo como resultado que 36/44 grupos de aislados de *C. albicans*, mostraron cepas indistinguibles entre aislados de distintos lugares o del mismo lugar del cuerpo, recogidas a distinto tiempo desde cada paciente (Odds *et al.*, 2006).

Otros investigadores también registraron que la población en estudio era primariamente clonal, ya que aislados de un mismo paciente presentaron el mismo genotipo o genotipos altamente relacionados, incluso algunos aislados de distintos pacientes resultaron ser idénticos o alta a medianamente relacionados clonalmente (Sampaio *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

El concepto de microevolución se refiere a la existencia de variaciones menores, presentes en ciertas cepas de la misma especie, aisladas de un mismo paciente o de pacientes distintos (Odds *et al.*, 2006). En años recientes se ha clarificado el hecho de que *C. albicans* produce variantes genéticamente alteradas en altas tasas. La mayoría de las poblaciones comensales e infectantes de *C. albicans* de un mismo individuo son clonales en origen, pero sufren microevolución en el sitio de colonización y también a través de episodios recurrentes de infección (Xu *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2004).

En un estudio inicial realizado por Lockhart *et al.*, 1995, en el cual utilizaron “southern blot” con sonda repetitiva Ca3, los resultados demostraron que las nueve poblaciones de *C. albicans* analizadas eran clonales en origen, es decir, evolucionaron desde un único progenitor, pero en muchos casos producto de eventos de microevolutivos, encontraron la presencia de subgenotipos un mismo sitio anatómico, pudiendo cualquiera de estas subcepas dominar frente a las otras en determinadas condiciones del hospedero.

Sampaio *et al.*, 2005, tipificaron 72 cepas de *C. albicans*, no relacionadas entre sí, con el fin de testear sus amplificaciones específicas y polimorfismo, mediante PCR múltiple de regiones microsatélite. Ellos encontraron una significativa desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual soporta previos hallazgos de que las poblaciones de *C. albicans* infectantes son clonales. Sin embargo, cambios microevolucionarios también fueron encontrados. Diversos investigadores señalan que en un mismo paciente puede existir microevolución de la cepa persistente, en distintos lugares del cuerpo, durante la colonización o en episodios recurrentes de infección (Chen *et al.*, 2006; Odds *et al.*, 2006). Por otro lado, en aislados no relacionados entre sí (de distintos pacientes), pero sí relacionados epidemiológicamente, por ejemplo, en el caso de cepas endémicas, también pueden ocurrir fenómenos microevolutivos (Sampaio *et al.*, 2005, Shin *et al.*, 2005).

Los cambios microevolucionarios, en poblaciones clonales, son producidos principalmente por reorganización genómica que envuelve entre otros, al elemento repetitivo RPS (Shin *et al.*, 2004; Odds *et al.*, 2006) y por pérdida de heterozigosis (Tavanti *et al.*, 2004; Odds *et al.*, 2006). Estos cambios genéticos, ocurren en frecuencias suficientemente altas como para ser importantes en la transición de *C. albicans* desde un organismo comensal a uno patogénico (Forche *et al.*, 2003). Un análisis de los eventos microevolucionarios realizado por Sampaio *et al.*, 2005, sugiere que dos eventos mutacionales distintos pueden ocurrir: falta de unión entre la hebra templado y la hebra que está siendo sintetizada, durante la replicación del ADN, fenómeno conocido como “strand slippage” de la ADN polimerasa y pérdida de heterozigosis, como resultado de cambios en los cromosomas, ya sea por delección o pérdida de éstos, por fenómenos de recombinación o por conversión génica, como también señalan otros autores (Fundyga *et al.*, 2002; Tavanti *et al.*, 2004).

El fenómeno de microevolución en infecciones del torrente sanguíneo causadas por *Candida* spp., no ha sido completamente explorado. Marco *et al.*, 1999., reportaron microevolución de las cepas colonizantes en un tercio de los pacientes con candidemia causada por *C. albicans*. Sin embargo, la relación entre microevolución de *C. albicans* y el desarrollo de una subsiguiente infección del torrente sanguíneo permanece incierta, ya que *C. albicans* comúnmente produce colonización de largo término en distintos sitios

anatómicos, de individuos sanos y además, la mayoría de las candidemias son producidas por la propia microbiota endógena del paciente (Shin *et al.*, 2004).

La ocurrencia de microevolución depende no sólo de la duración de la colonización o infección, sino que también de la estabilidad genética de la cepa, en el ambiente ofrecido por el hospedero. Esto es respaldado por los hallazgos de Shin *et al.*, 2004, donde en candidemias relacionadas con catéter, la microevolución ocurre en algunas cepas de *C. albicans* aisladas desde catéter durante la colonización de este último, pero no ocurre en cepas aisladas de sangre, orina u otro sitio anatómico del mismo paciente. Por lo tanto, microevolución puede ocurrir durante la colonización de catéteres o de superficies mucosas del paciente, en las manos del personal de la salud o en el ambiente hospitalario. Una vez que una cepa genéticamente estable se instaura en un individuo, puede ser responsable de invasión sanguínea y luego esparcirse a orina u a otros lugares en el mismo paciente o diseminarse por transmisión nosocomial entre diferentes pacientes, a través del tiempo, sin presentar cambios microevolutivos significantes (Shin *et al.*, 2004).

Con respecto al reemplazo de cepas, Odds *et al.*, 2006, registró mediante MLST, que en algunos episodios recurrentes de infección, en todos los sitios muestreados del paciente ocurrió reemplazo de cepas, ya que los aislados de ambos episodios se encuentran ampliamente distanciados entre sí desde el punto de vista genético. Este fenómeno se debe a que distintos clones pueden coexistir en los distintos lugares del cuerpo, especialmente en sitios no estériles (Chen *et al.*, 2006). Sin embargo, la población infectante en cada lugar del cuerpo es monoclonal, existiendo algunos aislados que presentan la capacidad de invadir distintos microhábitat (Sampaio *et al.*, 2005).

## **5.- Candidemia**

Diversos programas de vigilancia de infecciones del torrente sanguíneo (ITS), señalan que aproximadamente un 50% de éstas son nosocomiales (Edmond *et al.*, 1999) y que el factor de riesgo de infección más común, es la presencia de catéter intravenoso (Diekema *et al.*, 2003; Wisplinghoff *et al.*, 2004).

La incidencia de estas infecciones ha aumentado progresivamente desde la década de los ochenta, presentándose unos 250.000 casos anualmente en USA (Pittet *et al.*, 1997). Las ITS presentan una alta morbilidad y mortalidad (mortalidad atribuida, 23%; mortalidad cruda 30% aproximadamente), siendo la décima causa de mortalidad en USA (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Investigaciones realizadas en USA desde mediados de la década de los noventa, hasta inicios de la presente década, señalan que aproximadamente un 50% de estas infecciones ocurren en pacientes hospitalizados en UCI (Edmond *et al.*, 1999; Wisplinghoff *et al.*, 2004), y es en estas unidades donde se registra un mayor impacto, con una mortalidad atribuida entre 16 a 40% y una mortalidad cruda de 35 a 53% (DiGiovine *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2001).

Evaluando la década de los ochenta, un estudio realizado en pacientes de 124 hospitales norteamericanos detectó un crecimiento significativo de las ITS, destacándose un aumento importante del género *Candida* spp., como agente causal, del orden de 219% en hospitales básicos y 487% en hospitales universitarios de gran tamaño (Banerjee *et al.*, 1991). Lo más llamativo fue el hecho de que estas fungemias presentaron 29% de mortalidad atribuible, *versus* 17% del resto de los patógenos, diferencia estadísticamente significativa. Estudios ulteriores sobre prevalencia de ITS nosocomiales, han determinado que las infecciones por hongos, principalmente del género *Candida* spp., han seguido aumentado sustancialmente desde la década de los ochenta, pasando de un 8% en 1995 a un 12% en 2002, encontrándose estas levaduras, en el cuarto a quinto lugar entre las causas más comunes de ITS hospitalaria, tras las producidas por *Staphylococcus* coagulasa negativa, *S. aureus* y Enterococos (Edmond *et al.*, 1999; Wisplinghoff *et al.*, 2004). Este cuarto a quinto lugar, representa aproximadamente un 10% de todas las ITS nosocomiales (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

En Chile, el Ministerio de Salud proporciona datos procedentes de la red de vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. En infecciones del torrente sanguíneo asociadas a catéter venoso central en pediatría, *Candida* spp., ocupa el cuarto lugar con un 7,4% entre 1997-1998 (Otaíza y Brenner, 1999).

En infecciones sanguíneas asociadas a nutrición parenteral, fue la primera causa con un 30% en pediatría y en adultos ocupa el cuarto lugar, entre los años 1999 y 2000 (Otaíza y Brenner, 2001).

Por otro lado, la Red de Diagnóstico de Micosis Invasoras en Chile, registró durante el año 2000 a 130 pacientes con diagnóstico comprobado de infección invasora y aislamiento de hongo, identificándose levaduras en 118 de ellos (92.4%), de los cuales 79 (67%) representaron aislamientos de levaduras en hemocultivos, notificándose la mayoría como infección nosocomial (Silva *et al.*, 2004).

La candidemia, definida como la infección del torrente sanguíneo en donde al menos un cultivo sanguíneo positivo arroja *Candida* spp., en un paciente con fiebre u otro signo clínico de infección (Tortorano *et al.*, 2004; Bassetti *et al.*, 2006), puede derivar en la diseminación de la infección a múltiples órganos, determinando la formación de microabscesos, lesiones cutáneas embólicas, abscesos renales y hepatoesplénicos, endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis y endoftalmitis. Estas infecciones ocurren con mayor frecuencia en pacientes que presentan condiciones de base tales como ser neonatos, prematuros, presentar patología oncológica, pacientes transplantados recibiendo terapia inmunosupresora, pacientes sometidos a cirugía mayor y pacientes afectados por enfermedades severas, que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos (Calderone, 2002b).

En la década de los ochenta, el “National Nosocomial Infections Surveillance System” (NNIS), a cargo del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC; Atlanta,GA), en USA, confirma un crecimiento significativo en la incidencia de infecciones fúngicas que pasan de 2,0 a 3,8 infecciones/1000 pacientes (Banerjee *et al.*, 1991).

Resultados entregados por el proyecto SCOPE (“The Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance”) en USA, dan a conocer una incidencia de candidemia de 4.6 infecciones/10.000 admisiones entre 1993-2002 (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

En Europa, los estudios epidemiológicos comenzaron en la década del noventa. Desde 1997 hasta 1999 se llevó a cabo en Europa, un importante estudio multicéntrico promovido por la “European Confederation of Medical Mycology” (ECMM), en el que participaron 106 hospitales de 6 países. En este estudio, se registró un total de 2.089 casos de candidemia, lo que arrojó una incidencia de 0.20-0.38 casos/1.000 admisiones en Francia, Italia y Suiza, mientras que la incidencia en Alemania, Austria, Italia y el Reino Unido fue registrada como 3.0-4.4 casos/100.000 pacientes-día (Tortorano *et al.*, 2004). En España, en dos estudios realizados durante tres y cinco años, en hospitales de atención terciaria, la incidencia de candidemia fue de 7.6 casos/10.000 admisiones (Viudes *et al.*, 2002) y de 8.1 casos/10.000 admisiones (Alonso-Valle., *et al.*, 2003) respectivamente.

De estas infecciones invasoras causadas por *Candida* spp., un 75 a 80% son de origen nosocomial (75% en USA, 82% en Sudamérica y 93% en Canadá) y el 50% de ellas afectarían a pacientes de UCI (Pfaller *et al.*, 1998).

Estas infecciones son dinámicas y han experimentado un aumento continuo desde la década de 1980. Actualmente, *C. albicans* es aún considerada la especie más frecuente en pacientes con candidemia, siendo aislada en un 40 a 55% de los casos, tanto en pacientes inmunodeprimidos como en pacientes no neutropénicos (Pfaller *et al.*, 2001; Trick *et al.*, 2002; Tortorano *et al.*, 2004). Sin embargo, a partir de la mitad de la década de los noventa se comienza a observar un cambio etiológico continuo en los agentes que causan candidemia, de modo que *C. albicans* comienza a ser desplazada por la emergencia de otras especies de *Candida* spp., (Nguyen *et al.*, 1996). Varios investigadores han reportado una alta incidencia de infecciones fúngicas producidas por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* entre otras, sin embargo la distribución de estas especies varía marcadamente en cada país. Entre 1997 y 1999, la Red de Vigilancia Internacional de Infecciones del Torrente Sanguíneo causadas por *Candida* spp., a cargo del programa SENTRY, registró que en Sudamérica, aproximadamente la mitad de los casos reportados de candidemia son causados por especies de *Candida* no-*albicans* (55%), siendo *C. parapsilosis* (25%) y *C. tropicalis* (16%) las especies más frecuentemente aisladas, después de *C. albicans* (45%) (Pfaller *et al.*, 2001).

Otro estudio realizado en Latinoamérica mantiene a las *Candida* no-*albicans* como las principales causales de ITS, sin embargo *C. tropicalis* incrementa su participación en estas infecciones (24%), con respecto a *C. parapsilosis* (21%) (Godoy *et al.*, 2003). Distinto es el caso en Europa y Canadá, donde *C. albicans* es aislada, en aproximadamente, un 60% de los casos, mientras que las especies de *Candida* no-*albicans* más frecuentemente aisladas son *C. parapsilosis* (18%) y *C. glabrata* (11%). En USA, *C. albicans* también es el agente más comúnmente aislado (55%), sin embargo, el porcentaje de infecciones producidas por *C. glabrata* (21%) es significativamente mayor que en las otras regiones, mientras que *C. parapsilosis* ocupa el tercer lugar con un 11% (Pfaller *et al.*, 2001). En Chile el agente más prevalente es *C. albicans* (48%), seguida por *C. parapsilosis* (17,7%) y *C. tropicalis* (13,9%), sin embargo *C. albicans* no supera el 50% (Silva *et al.*, 2004). El cambio de patrón etiológico de la candidemia nosocomial ha sido atribuido en gran parte a los avances de la medicina, con la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas y debido al uso de antimicóticos como el fluconazol, como medida profiláctica. Anexo a esto, se encuentra la presencia de enfermedades que condicionan alteraciones inmunológicas graves y la estadía en UCI que hacen a estos pacientes susceptibles a infecciones fúngicas (Colombo *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2006).

## **6.- Mortalidad Producida por Candidemia**

Las distintas especies de *Candida* spp., causan comúnmente infecciones sanguíneas nosocomiales, principalmente entre pacientes de UCI, y están asociadas con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Trick *et al.*, 2002; Bassetti *et al.*, 2006), por lo tanto, la seriedad de la candidemia se ve reflejada tanto en las tasas de mortalidad atribuible como cruda.

La mortalidad cruda se define como la suma de todos los pacientes que al fallecer padecían una infección sistémica por *Candida*; los controles son los pacientes que tienen las mismas condiciones, pero fallecen sin candidemia. Datos del proyecto SCOPE, publicados en el año 1999, presentan una mortalidad cruda de 40%, asociada a *Candida* spp. (Edmond *et al.*, 1999), manteniéndose este resultado en la publicación del año 2004 (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Algo similar es presentado por otros autores, los que determinaron una mortalidad cruda aproximada de 45% (Luzzati *et al.*, 2000; Alonso-Valle *et al.*, 2003; Diekema *et al.*, 2003).

La mortalidad atribuible, comprende a aquellos pacientes que fallecen debido a la infección por *Candida* spp., (Wenzel y Gennings, 2005). Con respecto a ésta, en el trabajo de Cheng *et al.*, 2005, de 130 pacientes cuya muerte fue asociada con candidemia, en el 42,3% (55) de los casos, la muerte fue considerada directamente causada debido a la infección por *Candida* spp. En dos estudios realizados en el Hospital de la Universidad de Iowa (University of Iowa Hospitals and Clinics, Iowa City) con 15 años de diferencia, en 1988 y 2003, se comprobó que la mortalidad atribuible no había variado de manera significativa, ya que en 1988 fue 38% (Wey *et al.*, 1988) y en 2003 fue 49% (Gudlaugsson *et al.*, 2003). En Europa, la ECMM registró una mortalidad cruda similar (38%) entre los años 1997-1999 (Tortorano *et al.*, 2004).

Una mortalidad atribuida menor (29%) fue registrada por Alonso-Valle *et al.*, 2003, quizás porque en el estudio existió una alta prevalencia de *C. parapsilosis*, la cual produce menor mortalidad, con respecto a otras especies de *Candida*. Una situación similar fue registrada por Viudes *et al.*, 2002, con una mortalidad atribuible de 30% y por Piazza *et al.*, 2004, los que encontraron una mortalidad atribuible de 27%. En resumen, se puede concluir que, aunque ha disminuido, la mortalidad atribuible no ha variado de manera significativa a través de los años.

Con respecto a la mortalidad de las infecciones causadas por *Candida* spp., en Chile, en un estudio multicéntrico sobre candidemia realizado en Santiago hasta el año 2002, en el cual participaron cinco hospitales, *C. albicans* presentó una mortalidad cruda de 66%, y una mortalidad atribuible de 33% (Silva *et al.*, 2002). Estos valores son similares a lo comunicado en el extranjero.

## 7.- Técnicas de Biología Molecular.

Hasta principios de la década de los noventa, poco era sabido sobre la epidemiología de la candidemia nosocomial. En el caso de *C. albicans*, a pesar de su conocida situación como comensal y de su importancia como patógeno fúngico mayor, poco era conocido sobre su homogeneidad genética, su evolución y sobre el mantenimiento o reemplazamiento de cepas durante el comensalismo y la infección. Esto se debía en parte a que los métodos de tipificación que permiten discriminar cepas dentro de una especie, no estaban fácilmente disponibles en esos años. Ante esta situación, varios métodos de tipificación molecular fueron desarrollados, con fines epidemiológicos, para permitir diferenciación a nivel genético (Pfaller, 2000; Soll, 2000).

Estudios iniciales sobre epidemiología de la candidiasis utilizaron propiedades fenotípicas de las levaduras para determinar la identidad de cepas (morfología macro y microscópica, serotipificación, pruebas bioquímicas y fisiológicas, perfiles de resistencia a agentes químicos y perfiles de sensibilidad a toxinas micóticas), sin embargo, al igual que cualquier otro método que utilice rasgos expresados externamente por los microorganismos, éstos son inestables, de baja sensibilidad y escaso poder discriminatorio (Soll, 2000). Con el desarrollo de la genética molecular, los métodos de estudio y tipificación del ADN genómico y extracromosómico se han convertido en una de las herramientas de mayor interés para la tipificación de hongos, constituyendo actualmente un proceso casi obligado.

Métodos de tipificación más poderosos, basados en el ADN, han emergido con fines clínicos y epidemiológicos. Estos métodos han sido usados extensamente en la detección y tipificación de cepas de *Candida* spp., principalmente de *C. albicans*. Además estas técnicas permiten a los investigadores examinar retrospectivamente supuestos brotes de candidiasis invasora y determinar los aspectos epidemiológicos de estos brotes y de la infección por *Candida* spp., (Pfaller, 2000; Soll, 2000).

Una variedad de técnicas moleculares de identificación han sido utilizadas para distinguir aislados de *C. albicans*, incluyendo métodos como cariotipo electroforético usando PFGE (análisis de fragmentos de restricción mediante electroforesis en campo pulsado), análisis del ADN genómico total con enzimas de restricción (RED y REAG), hibridación por “southern blot” con sonda repetitiva Ca3 o 27A (southern blot hybridization with the Ca3 or 27A probe), RFLP (análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción), electroforesis de multilocus enzimáticos (MLEE), la tipificación por secuenciamiento de multilocus (MLST) y el RAPD (Soll, 2000; Odds *et al.*, 2006). Sin embargo muchos de los métodos nombrados, no son sustentables en estudios epidemiológicos de rutina, ya que son laboriosos, caros y requieren equipamiento especializado. El RAPD, descrito inicialmente por Williams *et al.*, 1990 no tiene estos problemas.

Los métodos mencionados anteriormente, en su mayoría son sensibles, reproducibles y específicos, y han sido utilizados para determinar el origen de una infección, las rutas de adquisición y transmisión, la tipificación de cepas, la persistencia de una misma cepa en una infección, la microevolución de una misma cepa, como es el caso del RAPD (Abarca, 2001) y el apareamiento de cepas resistentes.

### **7.1 Amplificación al Azar del ADN Polimórfico o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).**

Los métodos de estudio del ADN genómico y extragenómico se han convertido en una de las herramientas de mayor interés en la tipificación de hongos patógenos (Pfaller, 2000; Soll, 2000). Las técnicas basadas en el uso de PCR o reacción en cadena de la polimerasa, han demostrado ser más simples, rápidas y sensibles en detectar secuencias específicas del ADN, además tienen un alto poder discriminatorio, si se generan las condiciones adecuadas (Soll, 2000). El uso de estas técnicas, para estimar variaciones genotípicas intraespecie, ha sido propuesto por varios estudios. Una de las técnicas basada en PCR más popular y actualmente en uso es el RAPD.

La técnica de RAPD está relacionada con la utilización de oligonucleótidos cortos, de 9 a 10 nucleótidos, con un contenido de guanina y citosina (GC) mayor al 40%, cuya secuencia de bases se ha determinado al azar, pero que selecciona fragmentos de ADN de una manera característica y repetitiva (Soll, 2000). Una de las características del RAPD es que usa temperaturas de hibridación bajas de aproximadamente 36 °C, a diferencia del PCR cuyas temperaturas de hibridación son mayores a 50 °C (Pfaller, 2000; Soll, 2000).

Este método es un marcador genético dominante que tiene la propiedad de rastrear el genoma completo y los polimorfismos obtenidos son resultado de la detección de cambios de bases en el ADN cromosomal, lo que causa un cambio en el perfil de los fragmentos de ADN (Abarca, 2001; Sullivan y Coleman, 2002). Los partidores utilizados detectan polimorfismos en ausencia de información sobre la secuencia nucleotídica (Valerio *et al.*, 2006). El RAPD posibilita la identificación a nivel de género, especie e identificación de subdivisiones de la misma en grupos, cepas o clones, como también genera perfiles consistentes, claros y repetitivos, todo esto dependiendo del poder discriminatorio del partidador arbitrario utilizado (Sullivan y Coleman, 2002; Bautista-Muñoz *et al.*, 2003). Con respecto a esto, los perfiles generados por el RAPD a partir de aislados de una misma especie, muestran diferencias intraespecie, generando polimorfismos (Sullivan y Coleman, 2002; Neppelenbroek *et al.*, 2006).

El RAPD es una técnica fácil, de bajo costo y simple de ejecutar e interpretar, no requiere del conocimiento previo del genoma y cumple con todas las características para ser una buena herramienta de genotipificación. El perfil de los fragmentos de ADN se mantiene estable a través del tiempo, permitiendo estudios comparativos para evaluar diferencias o similitudes entre cepas aisladas en distintos períodos de tiempo (Bautista-Muñoz *et al.*, 2003; Neppelenbroek *et al.*, 2006). Este método es efectivo, ya que permite en mayor o menor medida (i) identificar la misma cepa en aislados independientes, (ii) identificar cambios microevolucionarios en una cepa, (iii) agrupar aislados moderada y escasamente relacionados e (iv) identificar aislados completamente diferentes (Marco *et al.*, 1999; Sullivan y Coleman, 2002).

Para que el RAPD cumpla con las características señaladas anteriormente, se debe utilizar cierto número de partidores, de forma independiente, para luego comparar la información obtenida con los distintos partidores y así, poder interpretar los datos (Soll, 2000). Un ejemplo de esto es lo realizado por Pujol *et al.*, 1997, quienes utilizaron ocho partidores para genotipificar aislados de *C. albicans*. Cuando generaron el dendrograma, basado en los coeficientes de similitud generados por los datos combinados de los ocho partidores, el agrupamiento o “clustering” de los aislados fue similar al obtenido usando MLEE y la hibridación por “southern blot” con sonda repetitiva Ca3, las cuales son técnicas consideradas más sensibles y específicas. En resumen, los resultados obtenidos por Pujol *et al.*, 1997, sugieren que el RAPD posee un poder resolutivo similar a las pruebas anteriormente nombradas, lo que también señalan Giammanco *et al.*, 2005.

Sin embargo, ciertas advertencias se deben tener en mente, como por ejemplo, el problema de la reproducibilidad no solo entre laboratorios, sino dentro del mismo laboratorio. Potencialmente, cada aspecto de la reacción de RAPD puede afectar la reproducibilidad. Distintos autores han señalado que las concentraciones de reactivo, las temperaturas durante la amplificación, el equipo de termociclación, incluso la procedencia de algunos reactivos, afectarían la reproducibilidad de esta técnica, lo cual se ve reflejado principalmente en la variación de las bandas de baja intensidad (Soll, 2000; Neppelenbroek *et al.*, 2006), por esta razón, la estandarización de la técnica es esencial (Giammanco *et al.*, 2005).

Una vez solucionada la intervención de estas variables, y para lograr una interpretación apropiada de los resultados obtenidos con el RAPD, se debe incorporar una medida de similitud genética entre las cepas que están siendo estudiadas. Estas medidas de similitud, también conocidas como coeficientes de similitud ( $S_{AB}$ ), pueden ser obtenidas a través de distintas fórmulas, las cuales consideran la presencia y ausencia de bandas, como es el caso del Coeficiente de Dice (Dice, 1945). Una vez computados los valores de  $S_{AB}$  obtenidos entre todos los pares de una colección de aislados, se genera una matriz de similitud y a partir de ésta, se generan árboles de similitud o dendrogramas por análisis de “cluster” (Soll, 2000; Abarca, 2001), a través de distintos métodos, siendo el más utilizado el UPGMA (Sneath y Sokol, 1973).

Con respecto a estos coeficientes de similitud, es necesario determinar puntos de corte o umbrales de similitud, para poder establecer el tipo de relación existente entre los aislados que están siendo estudiados (Soll, 2000). Muchos estudios han considerado como  $S_{AB}$  umbral un valor de 0.8, ya que este valor se encuentra en medio de valores  $S_{AB}$  de cepas altamente relacionadas ( $S_{AB} \geq 0.9$ ) y de aislados no relacionados entre sí ( $S_{AB} < 0.7$ ), siendo este valor de 0.8, representativo de aislados moderadamente relacionados. Sin embargo, valores umbral sobre 0.8 han generado una mayor estabilidad de los cluster presentes en los dendrogramas (Pfaller, 2000, Soll, 2000). Con respecto a esto último, se ha señalado que un  $S_{AB}$  umbral de 0.9, marca el límite inferior de valores de  $S_{AB}$  de cepas que están altamente relacionadas y que han sufrido microevolución (Pfaller, 2000; Soll, 2000).

Para RAPD, se han reportado umbrales de  $S_{AB}$  entre 0.80 a 0.86, para considerar a dos cepas como altamente relacionadas, es decir, sobre este punto de corte se pueden considerar cepas, como genéticamente relacionadas, ya sean idénticas ( $S_{AB}$  de 1) o altamente similares pero no idénticas ( $S_{AB} \geq 0.80$ ). Sin embargo, para poder establecer este punto de corte, en estos estudios se consideraron sólo partidores que generaron patrones de banda intensos y reproducibles (Pujol *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Samaranayake *et al.*, 2003).

En un estudio orientado a elucidar los orígenes de candidemias nosocomiales, Marco *et al.*, 1999 analizaron cepas comensales, aisladas de diferentes sitios anatómicos de un mismo paciente, cepas infectantes y cepas aisladas del personal de salud, mediante hibridación por “southern blot” con sonda repetitiva Ca3. El umbral establecido fue de  $S_{AB} \geq 0.91$ , ya que en este punto de corte mejoraba la estabilidad de los “cluster” en el dendrograma. Otro estudio, que utilizó la técnica de hibridación por “southern blot” con sonda repetitiva 27A, determinó un umbral de similitud similar,  $S_{AB} \geq 0.9$ , en la genotipificación de cepas de *C. albicans* aisladas de un brote en una UCI neonatal (Boccia *et al.*, 2002).

## **7.2 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturante o Denaturing Gradient Gel Electroforesis (DGGE).**

El DGGE es una técnica altamente sensible, que se basa en las características de desnaturalación de diferentes moléculas de ADN de doble hebra, en una gradiente con incremento en la concentración de desnaturalantes (Hayes *et al.*, 1999). El comportamiento de desnaturalación de las distintas moléculas de ADN, depende fuertemente de la secuencia nucleotídica. Esta diferencia en el comportamiento, permite la discriminación entre fragmentos que difieren hasta en una base nucleotídica (Hayes *et al.*, 1999).

El fundamento de esta técnica recae en que fragmentos de ADN de igual tamaño, pero con distinta secuencia de pares de bases, pueden ser separados. Esta separación se basa en la movilidad electroforética de las moléculas de ADN parcialmente desnaturaladas, en un gel de poliacrilamida con condiciones de desnaturalación en aumento, obtenida por la mezcla de distintas concentraciones de urea y formamida (Gafan *et al.*, 2005). El fragmento de ADN se va desnaturalando a medida que avanza en el gel con gradiente desnaturalante, por lo tanto, su conformación cambia, lo que reduce dramáticamente la movilidad del fragmento. La región desnaturalada de la molécula de ADN se deposita en la matriz del gel y no se mueve más (Hayes *et al.*, 1999; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001). La separación completa del ADN es prevenida por la incorporación de un “clamp” de múltiples copias de GC, en uno de los extremos del ADN. Este “clamp” es acoplado durante el PCR, utilizando un partidor que presenta una secuencia adicional de 40 pb de GC en su extremo 5' (Hayes *et al.*, 1999). Otra función de este “clamp” de GC es incrementar el porcentaje de detección de un cambio de base en el fragmento, teóricamente a un 100% (Hayes *et al.*, 1999).

Con más detalle, la teoría detrás del DGGE se basa en que las dos hebras del ADN se separan o desnaturalan, cuando calor o desnaturalantes químicos son aplicados. La concentración a la cual la doble hebra de ADN es desnaturalada es influenciada por dos factores; primero, los puentes de hidrógeno formados entre pares de base complementarios (regiones ricas en GC se desnaturalan a concentraciones más altas de desnaturalantes, que regiones ricas en AT); segundo, la atracción entre bases vecinas de la misma hebra.

El DGGE explota el hecho de que fragmentos idénticos de ADN, los cuales difieren incluso en un nucleótido dentro del dominio de desnaturación, se desnaturan a distintas concentraciones de desnaturalante.

Aunque la teoría y metodología del DGGE es relativamente simple, una significativa cantidad de trabajo previo debe ser realizado antes de usar la técnica, además, el éxito de la técnica es altamente dependiente del perfil de desnaturación de los fragmentos de ADN a evaluar, de la elección de los partidores, de las condiciones del gel que se va a utilizar y de las condiciones en que se efectúa la electroforesis (Hayes *et al.*, 1999).

La mayoría de los estudios, en los que se ocupa al DGGE para detectar diferencias en ciertos fragmentos de ADN o de ADN ribosomal, se han realizado para el análisis de poblaciones bacterianas ambientales (McAuliffe *et al.*, 2003) y del cuerpo humano (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001; Gafan *et al.*, 2005), en microbiología de los alimentos (Divol *et al.*, 2006) y en la detección de mutaciones causales de enfermedad en humanos. Muchos de los estudios que analizan poblaciones microbianas se basan en la amplificación de secuencias conservadas en el ADN de cada uno de estos organismos (por ejemplo, la región 16S del ADN ribosomal en bacterias y la región 28S en levaduras), para así poder diferenciarlos. Sin embargo, si se desea identificar cambios en organismos pertenecientes a una misma especie, se recomienda también la amplificación de regiones con mayor variabilidad en el genoma, como son las regiones ITS o espacios inter transcripcionales, ubicados entre las distintas secuencias conservadas del ADN ribosomal (Anexo 1, Item 5).

Pocos estudios existen en relación a la genotipificación de levaduras mediante DGGE, en especial del género *Candida* spp. Uno de los pocos estudios existentes evaluó la dinámica poblacional de distintas levaduras involucradas en procesos de fermentación de alimentos. En este estudio, las principales levaduras estudiadas pertenecían al género *Saccharomyces* y *Candida*, donde el DGGE sólo se utilizó para diferenciar entre distintos géneros y dentro del género, para diferenciar entre distintas especies, en ningún caso se utilizó esta técnica para evaluar diferencias entre cepas de una misma especie (Divol *et al.*, 2006).

En relación a los antecedentes presentados, este estudio pretende evaluar la relación clonal entre cepas patógenas y comensales de *C. albicans*, aisladas de pacientes con candidemia, a través de dos métodos de genotipificación como son el RAPD y el DGGE. Este estudio ayudará a determinar si las cepas patógenas de *C. albicans*, aisladas de sangre, comparten un origen clonal con las cepas saprófitas que forman parte de la microbiota y además determinará que método posee una mayor aplicabilidad en la epidemiología molecular de estos microorganismos.

## OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar clonalidad entre cepas patógenas y comensales de *Candida albicans*, obtenidas, a partir de un mismo paciente humano con candidemia, desde hemocultivo y desde sitios anatómicos colonizados, por medio de dos técnicas moleculares.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Tipificar genotípicamente las cepas de *C. albicans* por RAPD.
- Analizar los patrones de amplificación aleatoria del ADN genómico generados por RAPD, para determinar el grado de similitud genética entre cepas patógenas y comensales aisladas de un mismo paciente.
- Tipificar genotípicamente las mismas cepas de *C. albicans* por DGGE.
- Analizar los patrones de migración generados por DGGE, para determinar el grado de similitud genética entre cepas patógenas y comensales aisladas de un mismo paciente.
- Analizar visualmente los resultados obtenidos por DGGE y compararlos con los datos obtenidos por RAPD.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 1.- Material

**1.1 Cepas en Estudio:** las cepas de este estudio, se obtienen a partir del proyecto “Expresión molecular *in vitro* e *in vivo*, de genes vinculados a adhesión y filamentación en cepas patógenas y comensales isogénicas de *C. albicans*, aisladas de pacientes con candidemia”. Se trabajó con un total de 35 cepas de *C. albicans*, de ocho pacientes con candidemia (Cuadro 1), 13 cepas patógenas aisladas de hemocultivo y 22 comensales recuperadas de boca (6), recto (6), orina (5), vagina (3), labio vulvar (1) y piel (1).

**1.2 Cepas de Referencia o Control:** se incluyeron tres cepas control, una cepa de *C. albicans* proveniente de la “American Type Culture Collection” (ATCC 90028), una cepa de *C. dubliniensis* proveniente del “Central Bureau Voor Schimmelcultures” (CBS 9787) y una cepa de *C. glabrata* (55 sv) perteneciente a la colección del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Cuadro 1. Procedencia de las Cepas en Estudio por Paciente.

Paciente	Lugar de Aislamiento de Cepas
1	Sangre, boca, recto.
2	Sangre (2), boca, orina, recto.
3	Sangre, boca, recto, vagina.
5	Sangre (2), boca, orina, recto, vagina
7	Sangre (2), boca, orina.
8	Sangre, boca, orina, recto.
9	Sangre (3), piel, recto.
11	Sangre, orina, labio vulvar, vagina.

## **2.- Método**

### **2.1 Identificación de Especie.**

Previo al estudio, se realizó la identificación de especie mediante la metodología estándar: formación de tubo germinal en plasma fresco humano, de clamidoconidios en microcultivo y perfil bioquímico mediante galerías comerciales (API Candida de BioMérieux<sup>®</sup> y Fungichrom I de International Microbio<sup>®</sup>), empleando cultivos de 24 a 48 horas en agar Sabouraud-Glucosa al 2% (Kurtzman y Fell, 1998).

En el transcurso del estudio, se reidentificaron las cepas de un paciente. Cuatro cepas, de un total de cinco, fueron identificadas como *C. dubliniensis* a través de cultivo en Sabouraud-Glucosa 2%, a 42°C por 24 horas, y por medio de PCR diagnóstico para *C. dubliniensis* utilizando los partidores Cd2F (forward) y Cd3RC (reverse), diseñados por Madrid, 2004 y sintetizados por IDT<sup>®</sup> USA (Anexo 1, Item 6).

### **2.2 Repique de Cepas.**

De los aislados originales se repicaron las cepas de *C. albicans* procedentes de las distintas muestras clínicas de cada paciente, según correspondiese. De cada cepa crecida en tubo con agar Sabouraud-Glucosa 2%, se tomo una “muesca” de levadura la cual fue traspasada a un frasco con 25 ml de caldo YPD (Yeast Nitrogen Base), el cual contiene 1% de extracto de levadura, 2% de Bacto-Peptona y un 2% de dextrosa. El caldo fue incubado a 30 °C en estufa FOC 225E con agitación constante a 200 r.p.m (Velp Scientifica<sup>®</sup>) por 20 horas o durante toda la noche.

### **2.3 Extracción de ADN.**

Se realizó la extracción de ADN con el sistema comercial Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega<sup>®</sup>), siguiendo el protocolo estandarizado en el laboratorio de Micología Médica (Anexo 2) y modificado por la incorporación de beta-mercaptoetanol y sorbitol EDTA, para potenciar la acción de la liticasa sobre la pared de las levaduras.

Para esto, en tubos Eppendorf de 1ml, se agregó una pequeña cantidad del caldo incubado y se introdujeron en la centrifuga Biofuge Fresco (Heraeus Instruments®) por dos minutos a 13.000 r.p.m. Una vez eliminado el sobrenadante se agregó la liticasa (SIGMA®) en conjunto con el sorbitol EDTA y con el beta-mercaptoetanol (Promega®) para romper la pared de la levadura. Los tubos se dejaron por 60 minutos en una estufa a 37 °C (Velp Scientifica®). Después de una segunda centrifugación, se agregaron en forma separada la solución de lisis de membrana celular y la solución de precipitación de proteínas, incluidas en el kit de extracción de ADN (Promega®). Posteriormente se agregó isopropanol (Vetec®) para precipitar el ADN. Al “pellet” de ADN precipitado se le agregó etanol 70% para lavarlo, se centrifugaron los tubos y se aspiró el etanol. Luego se rehidrató el ADN con agua milique por dos horas o más, para finalmente agregar la RNAsa (Invitrogen®), la cual elimina los residuos de ARN. Por último, se evaluó la presencia y cantidad de ADN por electroforesis en agarosa 0.8% (LAFKEN®), utilizando como marcador de peso molecular Lambda/Hind III (Invitrogen®).

La concentración y calidad de ADN se determinó al medir su densidad óptica (D.O) a una longitud de onda de 260 y 280 nm con el espectrofotómetro modelo Genova (Jenway®). A una longitud de onda de 260 nm, se mide la proporción de ácidos nucleicos (principalmente ADN) y a los 280 nm, se miden proteínas contaminantes (anillos aromáticos). La concentración final de ADN genómico de cada cepa se ajustó a 10 ng/μl con agua bidestilada estéril. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

#### **2.4 Determinación de Clonalidad mediante RAPD.**

La reacción de amplificación se realizó en el termociclador Eppendorf MasterCycler®, utilizando una mezcla de reacción con 10ng/μl de ADN; dNTP's (Gibco BRL®) a 2,5mM; partidores a 5μM (IDT®, Invitrogen®); Taq polimerasa (Invitrogen®) a 5U/μl; Buffer Taq 10x (Invitrogen®); MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®) a 50mM y agua bidestilada estéril. El volumen final de la mezcla fue de 25μl.

El termociclador se programó para usar las siguientes condiciones de amplificación: una etapa de desnaturación inicial a 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturación a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 36 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 2 minutos, y una etapa de extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Se utilizaron cinco partidores de secuencia arbitraria con capacidad discriminativa intraespecie, de 10 nucleótidos cada uno, con un contenido de GC de 60%, provenientes de IDT<sup>®</sup> e Invitrogen<sup>®</sup>. Estos son OPBA 9, OPBA 10, OAA 14, OPBA 03, OPBA 13 (Anexo 1, Item 3) y cumplen con características como: alto número total de bandas, alto polimorfismo entre cepas de una misma especie y bajo coeficiente de similitud entre cepas aisladas de distintos pacientes y cepas control no relacionadas. Estos partidores fueron evaluados previamente en el laboratorio de Micología Médica (Abarca, 2001).

Los fragmentos de ADN resultantes fueron separados por electroforesis en buffer TAE 1x, a través de un gel de agarosa (LAFKEN<sup>®</sup>) 1,5% teñido con bromuro de etidio (Plusone<sup>®</sup>), a una concentración de 0,5µg/ml, y el tamaño molecular de los productos de amplificación se determinó utilizando como estándar de tamaño molecular, DNA Ladder 100 pb (Promega<sup>®</sup>). La electroforesis se realizó a 70 volt durante 70 minutos. Luego, los perfiles de RAPD fueron visualizados mediante un transiluminador de luz U.V y se registraron con el equipo KODAK EDAS 290, utilizando el software KODAK 1D v3.6 (Anexo 1, Item 2).

## **2.5 Determinación de Clonalidad mediante DGGE.**

La reacción de amplificación se realizó en el termociclador Eppendorf MasterCycler<sup>®</sup>, utilizando una mezcla de reacción con 10ng/µl de ADN; dNTP's (Gibco BRL<sup>®</sup>) a 2,5mM; partidores (IDT<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>®</sup>) a 5µM; Taq polimerasa (Invitrogen<sup>®</sup>) a 5U/µl; Buffer Taq 10x (Invitrogen<sup>®</sup>); MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>) a 50mM y agua bidestilada estéril. El volumen final de la mezcla fue de 30µl.

El termociclador se programó para usar las siguientes condiciones de amplificación: una etapa de desnaturación inicial a 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturación a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 57 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por 1 minuto, y una etapa de extensión final a 72 °C por 10 minutos. Se amplificaron por PCR el final de la región 18S, seguido de todo el ITS1, la región 5.8S y parte del ITS2, utilizando los partidores Ca1F (forward) y Ca3RC (reverse), con un “clamp” de 40pb GC en su cola 5’(Anexo 1, Item 4). En conjunto amplifican un fragmento de 724 pb. Las regiones 18S y 5.8S son regiones conservadas del ADN ribosomal, en cambio las ITS son regiones variables entre cepas de una misma especie (Anexo 1, Item 5).

En un gel de poliacrilamida 40% (BioRad<sup>®</sup>) se cargaron las soluciones de urea y formamida (SIGMA<sup>®</sup>) con persulfato de amonio (Plusone<sup>®</sup>), para formar un gradiente desnaturalante de 20 a 60%. Luego de cargar los productos de amplificación por PCR en el gel, éstos se corrieron en tampón de corrida TAE 0.5x, en una cámara electroforética vertical a 60°C, por 15 horas. La electroforesis se realizó a 80 volt. Posteriormente, se tiñó el gel con bromuro de etidio (Plusone<sup>®</sup>) y se visualizó la movilidad de los fragmentos generados para cada cepa de *C. albicans* (incluyendo la cepa ATCC), de acuerdo a su secuencia nucleotídica, observando las bandas con transiluminador U.V. La similitud en la ubicación de las bandas de las distintas cepas de un mismo paciente se comparó con la similitud entre cepas obtenida por el RAPD en cada paciente.

En la realización de ambos métodos se utilizaron, como norma de bioseguridad y de protección personal, guantes para biología molecular (Premium<sup>®</sup>), delantal, antiparras, mascarilla y mecheros, por el hecho de trabajar con patógenos oportunistas y por manejar reactivos de biología molecular potencialmente cancerígenos como el bromuro de etidio, el persulfato de amonio y la formamida, pero además para mantener las condiciones de esterilidad necesarias en la realización del estudio.

## **2.6 Análisis de Resultados.**

### **2.6.1 Análisis de Resultados de la Genotipificación por RAPD.**

Inicialmente se evaluaron los perfiles electroforéticos generados por el RAPD para las cepas patógenas y comensales de cada paciente y para las cepas control (ATCC 90028, CBS 7989, 55sv), registrando manualmente el tamaño (en pares de bases) y el número de bandas generado por cada partidor.

Posteriormente, para determinar el grado de similitud genética entre cepas de *Candida* spp., aisladas de un mismo paciente más las cepas control, se determinó el Coeficiente de Dice (Anexo 1, Item 1), incluido en el programa TreeCon<sup>®</sup> (Van de Peer y De Wachter, 1994). El Coeficiente de similitud de Dice mide la proporción de bandas electroforéticas comunes (del mismo tamaño), presentes en los perfiles genéticos obtenidos con el mismo partidor, entre 2 cepas. Para un análisis global de los Coeficientes de Dice, derivados de todas las comparaciones posibles entre cepas, se confeccionó una matriz de similitud en el programa block de notas, bajo el formato \*.txt, la que se analizó mediante el método UPGMA “Unweighted Pair Group Method Whit Arithmetic Averages”, también incluido en el programa TreeCon<sup>®</sup> (Van de Peer y De Wachter, 1994). Finalmente, se presentaron los datos gráficamente a través de un dendrograma generado con ayuda de este mismo programa. Para poder establecer el tipo de relación entre dos aislados, se determinó como punto de corte o umbral de similitud un  $S_{AB} \geq 0.9$ .

### **2.6.2 Análisis de Resultados de la Genotipificación por DGGE.**

Para determinar el grado de similitud genética entre cepas patógenas y comensales aisladas de un mismo paciente más la cepa control de *C. albicans* (ATCC 90028), se evaluó visualmente el patrón de migración de las distintas cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes junto con la cepa control, para agruparlas en distintos genotipos, según corresponda.

### **2.6.3 Comparación entre RAPD y DGGE.**

Para evaluar el rendimiento del DGGE como método para determinación de clonalidad entre cepas de *C. albicans*, se realizó una tabla de contingencia de 2X2, la cual determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de este método (Anexo 1, Item 7). En esta tabla de contingencia se utilizó al RAPD como “gold standard” ya que esta técnica se ha utilizado con anterioridad en la genotipificación de *C. albicans*.

### **2.6.4 Método Estadístico.**

El DGGE no ha sido utilizado hasta hoy como técnica habitual en la genotipificación de levaduras, a diferencia del RAPD que es una técnica ya estandarizada y utilizada con anterioridad en estudios de epidemiología molecular de cepas de *Candida* spp. Por esta razón, se comparó al DGGE con el RAPD, como método de determinación de clonalidad. Con este fin, se planteó como hipótesis nula, que los resultados de la genotipificación de *C. albicans* no varían significativamente de acuerdo al método de determinación utilizado. Para validar o rechazar esta hipótesis se realizó el Test de McNemar ( $\chi^2$  corregido).

## RESULTADOS

### 1.- Genotipificación por RAPD.

Se genotipificaron 38 aislados de levaduras pertenecientes al género *Candida* spp., mediante RAPD. De estos aislados, 35 fueron obtenidos desde los ocho pacientes en estudio y los otros tres corresponden a cepas de referencia o control de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. dubliniensis* (CBS 7989) y *C. glabrata* (55sv), como se muestra en el Cuadro 2. La tipificación molecular de los aislados en estudio y de los controles, se realizó utilizando cinco partidores de secuencia arbitraria (Anexo 1, Item 3).

Cuadro 2. Códigos de cepas de *Candida* spp., por paciente y códigos de cepas control.

	CÓDIGO:						TOTAL
Paciente 1	P1S	P1B	P1R				3
Paciente 2	P2S1	P2S2	P2B	P2O	P2R		5
Paciente 3	P3S	P3B	P3R	P3V			4
Paciente 5	P5S1	P5S2	P5B	P5O	P5R	P5V	6
Paciente 7	P7S1	P7S2	P7B	P7O			4
Paciente 8	P8S	P8B	P8O	P8R1			4
Paciente 9	P9S1	P9S2	P9S3	P9P	P9R		5
Paciente 11	P11S	P11O	P11LV	P11V			4
ATCC *	ATCC						
<i>C. albicans</i>	90028						1
CBS **	CBS						
<i>C. dubliniensis</i>	7989						1
<i>C. glabrata</i> ***	55 sv						1
<b>TOTAL</b>							<b>38</b>

Sitio de aislamiento: S, sangre; B, boca; O, orina; R, recto; V, vagina; LV, labio vulvar; P, piel; sv, secreción vaginal.

\* ATCC (American Type Culture Collection).

\*\* CBS (Central Bureau Voor Schimmelcultures).

\*\*\* 55sv (Colección del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile)

Las Figuras 1 a la 6, muestran un ejemplo de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante RAPD, con cada uno de los partidores utilizados. En los perfiles generados se observa que las cepas comensales y patógenas aisladas de cada paciente, generan un perfil genético común y fácilmente diferenciable de las cepas de *Candida* spp., de los otros pacientes. Anexo a esto, las cepas del paciente dos presentan un patrón de bandas aún más diferente que el de otros pacientes (Figura 1 y 4).

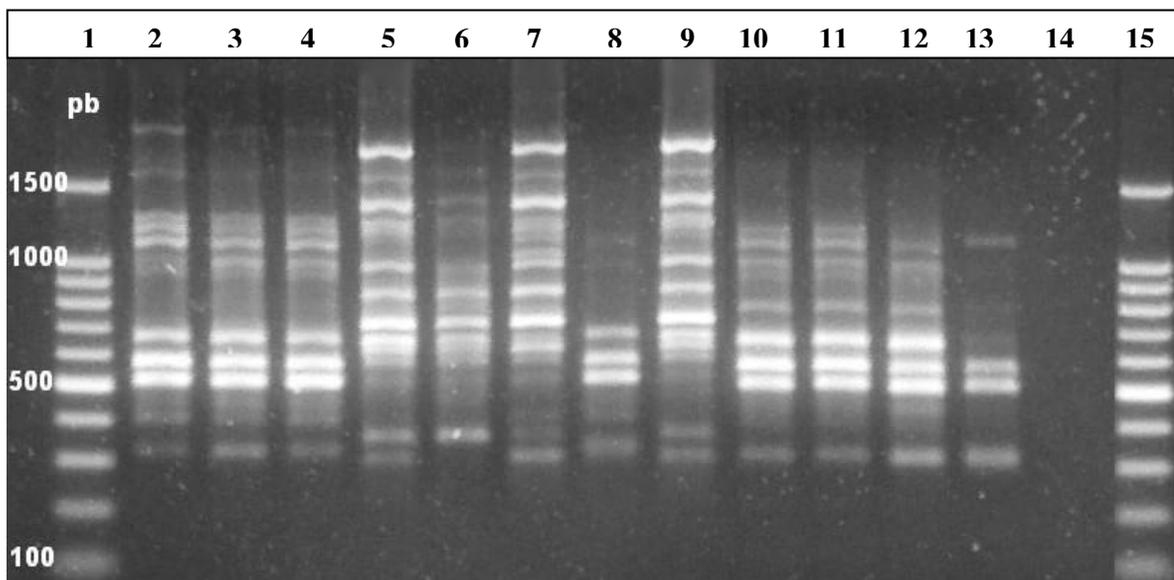


Figura 1:  
Perfil electroforético de RAPD de doce cepas de *Candida* spp., (pacientes uno, dos y tres), obtenido con el partidor OPBA 03. Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2: P1S; carril 3: P1B; carril 4: P1R; carril 5: P2S1; carril 6: P2S2; carril 7: P2B; carril 8: P2O; carril 9: P2R; carril 10: P3S; carril 11: P3B; carril 12: P3R1; carril 13: P3V; carril 14: control negativo.

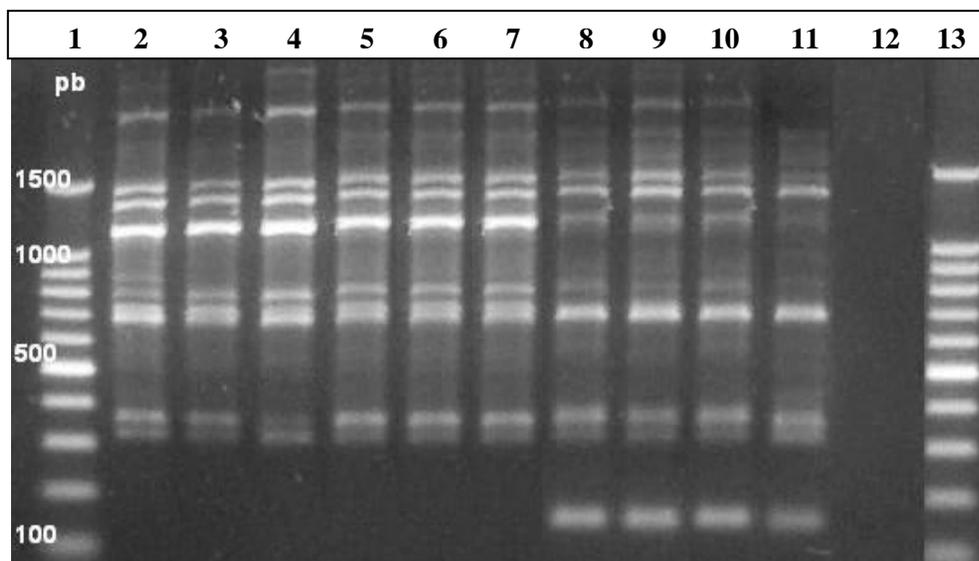


Figura 2:  
 Perfil electroforético de RAPD de diez cepas de *Candida* spp., (pacientes cinco y siete), obtenido con el partidor OPBA 09. Carriles 1 y 13: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2: P5S1; carril 3: P5S2; carril 4: P5B; carril 5: P5O; carril 6: P5R; carril 7: P5V; carril 8: P7S1; carril 9: P7S2; carril 10: P7B; carril 11: P7O; carril 12: control negativo.

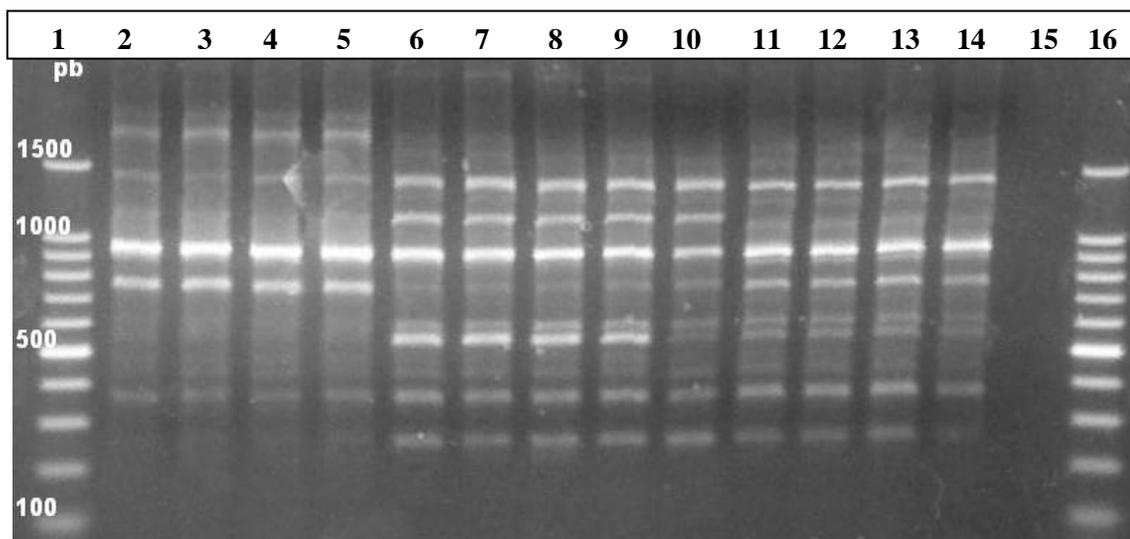


Figura 3:  
 Perfil electroforético de RAPD de trece cepas de *Candida* spp., (pacientes ocho, nueve y once), obtenido con el partidor OPBA 10. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2: P8S; carril 3: P8B; carril 4: P8O; carril 5: P8R1; carril 6: P9S1; carril 7: P9S2; carril 8: P9S3; carril 9: P9P; carril 10: P9R; carril 11: P11S; carril 12: P11O; carril 13: P11LV; carril 14: P11V; carril 15: control negativo.

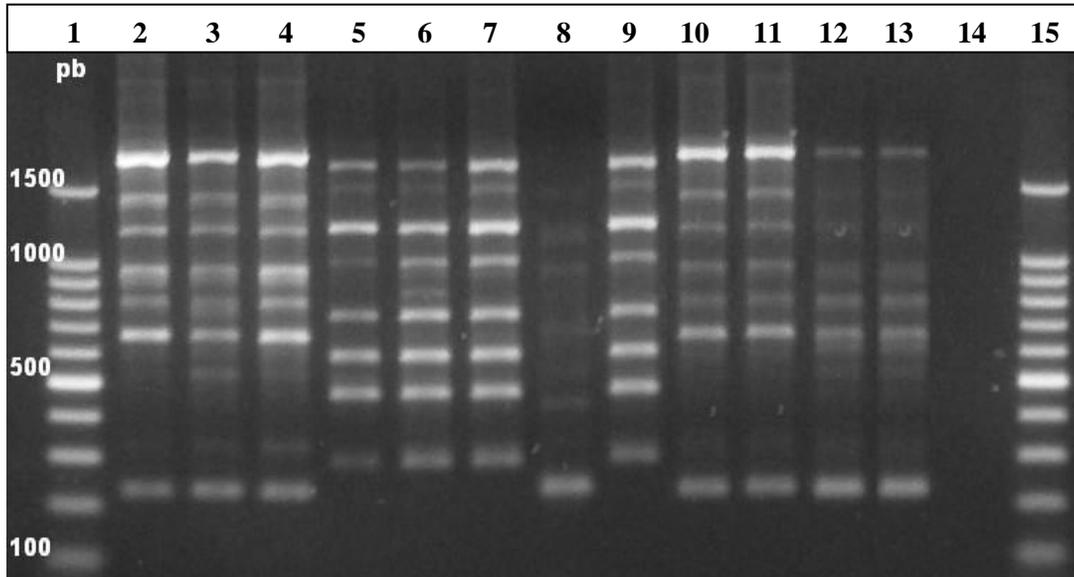


Figura 4:  
 Perfil electroforético de RAPD de doce cepas de *Candida* spp., (pacientes uno, dos y tres), obtenido con el partidor OPBA 13. Carriles 1 y 15: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2: P1S; carril 3: P1B; carril 4: P1R; carril 5: P2S1; carril 6: P2S2; carril 7: P2B; carril 8: P2O; carril 9: P2R; carril 10: P3S; carril 11: P3B; carril 12: P3R; carril 13: P3V; carril 14: control negativo.

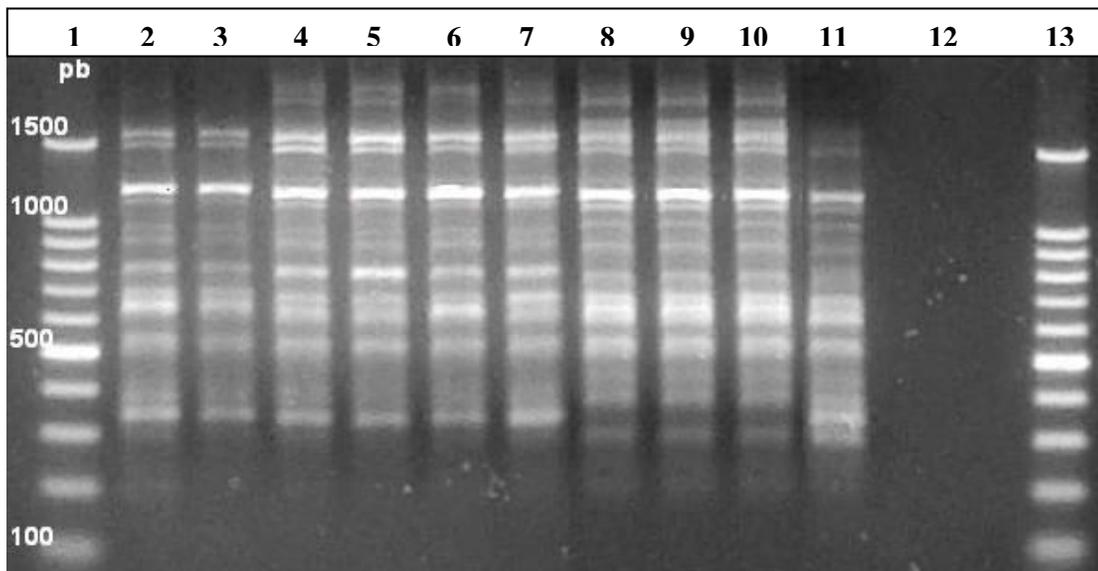


Figura 5  
 Perfil electroforético de RAPD de diez cepas de *Candida* spp., (pacientes cinco y siete), obtenido con el partidor OAA 14. Carriles 1 y 13: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2: P5S1; carril 3: P5S2; carril 4: P5B; carril 5: P5O; carril 6: P5R; carril 7: P5V; carril 8: P7S1; carril 9: P7S2; carril 10: P7B; carril 11: P7O; carril 12: control negativo.

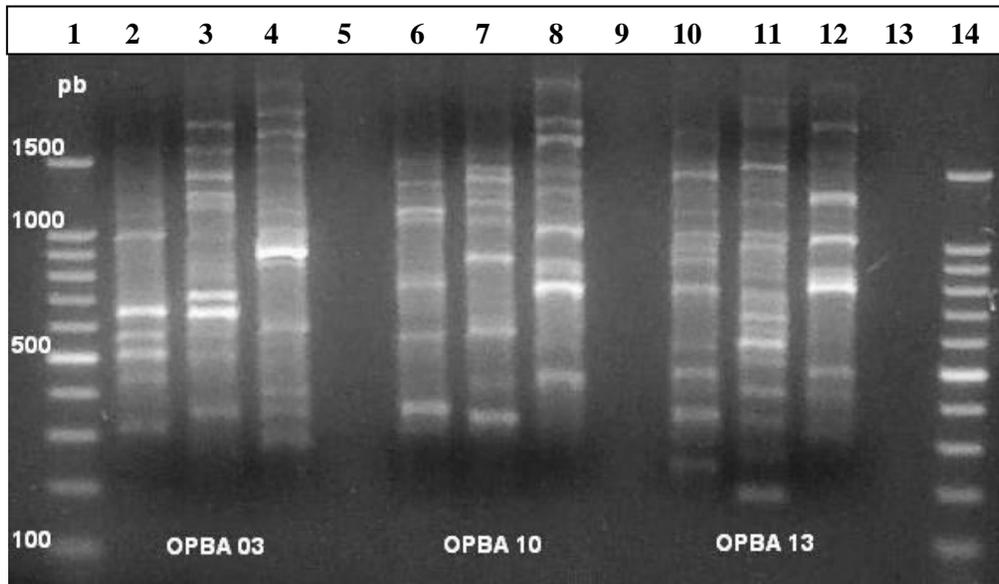


Figura 6:

Perfil electroforético de RAPD de cepas de referencia de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. glabrata*, obtenido con el partidor OPBA 03, OPBA 10 y OPBA 13. Carriles 1 y 14: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2, 6 y 10: ATCC 90028 de *C. albicans*; carril 3, 7 y 11: CBS 7989 de *C. dubliniensis*; carril 4, 8 y 12: 55 sv de *C. glabrata*. Carriles 5, 9 y 13: control negativo.

Al genotipificar las 35 cepas de *Candida* spp., aisladas de los pacientes en estudio más las cepas control, la mayor cantidad de bandas se generó con los partidores OPBA 03 y OAA 14 (Ej. Figura 1 y 5) y la menor cantidad corresponde al partidor OPBA 13 (Ej. Figura 4), como se muestra en el Cuadro 3. Al evaluar el tamaño de bandas generado, los rangos de tamaño molecular (pb) fueron similares para cada partidor (Cuadro 3).

Con respecto a las cepas control, estas generaron los patrones de bandas esperados, es decir, presentaron el tamaño y el número de bandas correspondiente a cada especie.

Cuadro 3. Número total de bandas y rango de tamaño molecular (pb) obtenido con cada partidor para las 35 cepas de *Candida* spp., aisladas de pacientes y para las tres cepas control.

<b>Partidor</b>	<b>Nº Total de Bandas</b>	<b>Tamaño Molecular (pb)</b>
OPBA 03	44	300-2.300
OPBA 09	42	180-2.350
OPBA 10	43	200-2.400
OPBA 13	41	220-2.400
OAA 14	44	220-2.450

## **2.- Cálculo Coeficientes de Similitud ( $S_{AB}$ ) y Análisis de Cluster.**

A partir de los perfiles obtenidos con los cinco partidores, se realizó un análisis de similitud basado en la presencia o ausencia de bandas de moderada y alta intensidad (alta estrictez). El análisis se llevó a cabo verificando visualmente el patrón de bandas generado por cada partidor. Este análisis permitió generar una matriz en el programa block de notas, extensión \*.txt, en la cual se tradujo la presencia y ausencia de bandas, generadas por los cinco partidores, a valores de 1 y 0 respectivamente. Esta matriz incluye el patrón de bandas de todas las cepas, tanto de pacientes como las cepas controles.

Posteriormente, utilizando el programa TreeCon<sup>®</sup> (Van de Peer y De Wachter, 1994), se calcularon los Coeficientes de Similitud ( $S_{AB}$ ), mediante el Coeficiente de Dice. A partir de los valores  $S_{AB}$  obtenidos entre las cepas de hemocultivo, de cepas de sitios colonizados y de las cepas control, se realizó un análisis de “cluster” mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Whit Arithmetic Averages), presentando los resultados gráficamente en dendrogramas de similitud.

Para una mejor interpretación de los resultados, se elaboró una pauta para describir la relación existente entre las cepas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Relación genética entre cepas de *Candida* spp., a partir de valores  $S_{ab}$  (Marco *et al.*, 1999; Boccia *et al.*, 2002)

Valores $S_{AB}$	Relación Genética entre Cepas de <i>Candida</i> spp.
1	Cepas clonales o isogénicas.
$\geq 0.9 < 1$	Cepas altamente relacionadas clonalmente.
$\geq 0.8 < 0.9$	Cepas moderadamente relacionadas, sin origen clonal común.
$\geq 0.7 < 0.8$	Cepas escasamente relacionadas, sin origen clonal común.
$\geq 0.5 < 0.7$	Cepas no relacionadas.
$\leq 0.4$	Cepas pertenecientes a distintas especies.

En la Figura 7, se presenta el dendrograma principal construido a partir de los  $S_{AB}$  de las 35 cepas aisladas de pacientes y de las 3 cepas control, considerando los datos obtenidos con los cinco partidores. En esta figura, se observa la presencia de dos grandes “cluster”, los cuales muestran entre sí, un  $S_{AB} < 0.2$ , distinguiéndose claramente la relación existente entre cada “cluster” y las cepas de referencia de *C. albicans* (ATTC 90028) y *C. dubliniensis* (CBS 7989) respectivamente.

Se observó además que cada “cluster” presenta sub grupos, destacándose que los aislados pertenecientes a un mismo paciente se agruparon en “cluster” únicos, quedando excluidos de éstos, los aislados de otros pacientes y la cepa control correspondiente. Con respecto a esto, los aislados de un mismo paciente muestran un  $S_{AB}$  mayor ( $S_{AB} \geq 0.9$ ) que el calculado entre aislados de pacientes no relacionados ( $S_{AB} < 0.9$ ), entregando este resultado los cinco partidores utilizados. En relación con la cepa control de *C. glabrata*, ésta fue empleada como “outgroup” en el dendrograma de la Figura 7.

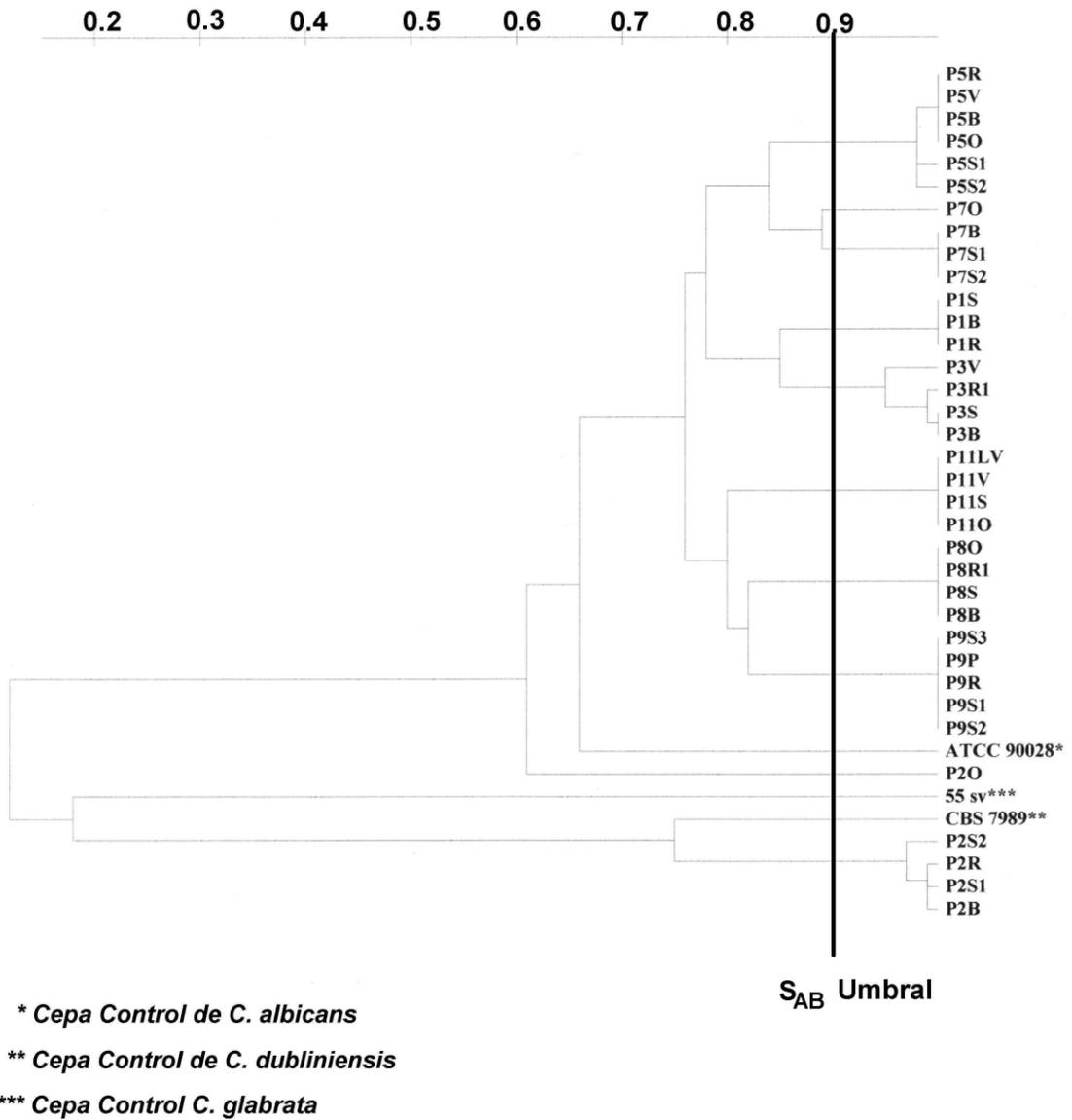


Figura 7.  
 Dendrograma realizado con el programa TreeCon<sup>®</sup> a partir de los Coeficientes de Similitud generados de las 35 cepas de *Candida* spp., y de las tres cepas control (ATCC 90028, CBS 7989 y 55 sv), utilizando los partidores OPBA 03, OPBA 9, OPBA 10, OPBA 13 Y OAA 14. Umbral de similitud genética, S<sub>AB</sub> ≥ 0.9.

Con respecto a la asociación encontrada entre las cepas del paciente dos y la cepa control de *C. dubliniensis* (CBS 7989), ésta sugiere que las cepas de este paciente estarían relacionadas genéticamente, a nivel de especie, con la cepa control.

Ante esta situación, se decidió verificar esta información realizando un diagnóstico fenotípico diferencial para *C. dubliniensis*, cuyas características morfológicas (formación de tubo germinal, clamidoconidios e hifas verdaderas) son muy similares a *C. albicans*, pero que sin embargo, difiere en cuanto a su crecimiento a elevadas temperaturas, ya que *C. dubliniensis* no crece a 42 °C (Sullivan y Coleman, 1998; Calderone, 2002a)

Se realizó, como prueba fisiológica, el crecimiento de esta levadura a 42 °C por 24 horas. Para esto, se sembraron en agar Sabouraud-Glucosa 2% las cepas del paciente dos más la cepa control de *C. albicans* (ATCC 90028). Luego de su incubación, se observó que las cepas del paciente dos, exceptuando la cepa de orina (P2O), no crecieron a esta temperatura, a diferencia de la cepa ATCC como se muestra en la Figura 8. Esto indicaría que las cepas del paciente dos corresponden a *C. dubliniensis*, exceptuando a la cepa de orina que corresponde a *C. albicans*.

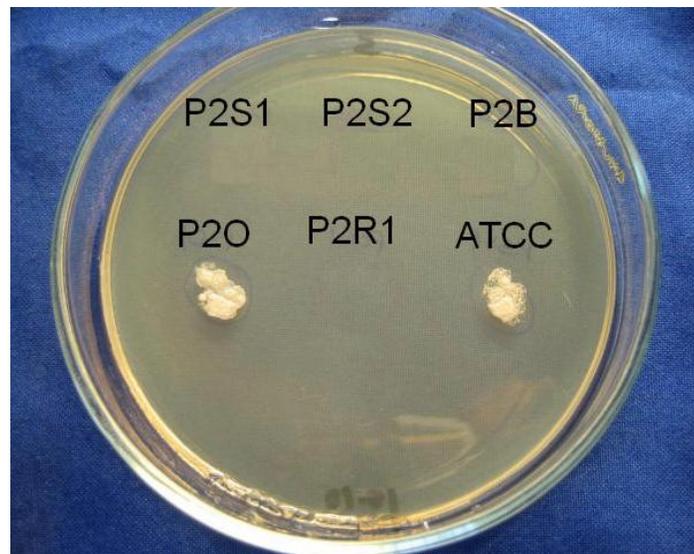


Figura 8. Crecimiento cepas del paciente dos más cepa control de *C. albicans* (ATCC 90028) a 42 °C en agar Sabouraud-Glucosa 2%.

Para confirmar este hallazgo microbiológico, se realizó un PCR diagnóstico para *C. dubliniensis*, utilizando partidores especie-específicos para esta levadura. Estos partidores fueron desarrollados previamente por el laboratorio de Micología Medica de la Facultad de medicina de la Universidad de Chile y corresponden al partidor forward Cd2F y al partidor reverse Cd3RC (Madrid, 2004).

Este juego de partidores dió como resultado un amplificado de 354 pb., que corresponde a parte del ITS1, la región 5.8S completa y parte del ITS2, sólo para las cepas de *C. dubliniensis* (Figura 9), lo que confirmó el hallazgo reportado, luego del crecimiento de las mismas cepas a 42°C.

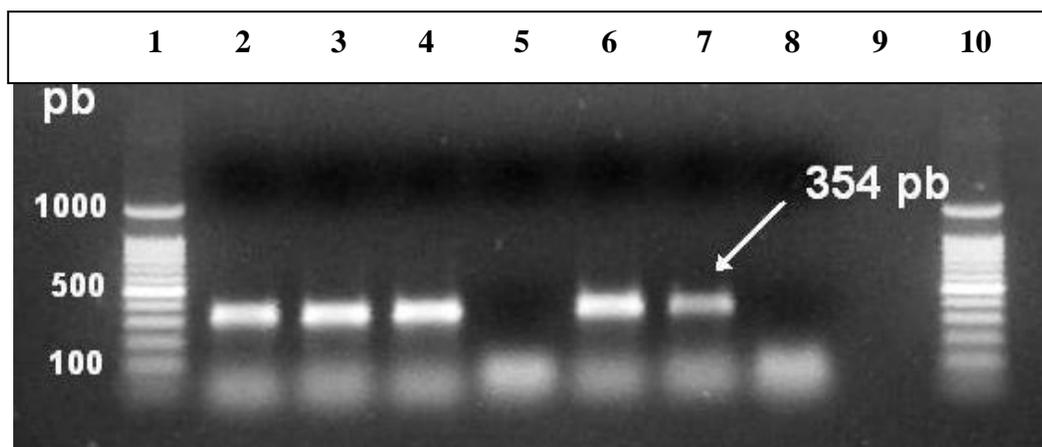


Figura 9.

PCR diagnóstico para *C. dubliniensis*. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb. Carril 2: P2S1; carril 3: P2S2; carril 4: P2B; carril 5: P2O; carril 6: P2R1; carril 7: CBS 7989 de *C. dubliniensis*; carril 8: ATCC 90028 de *C. albicans*; carril 9: control negativo.

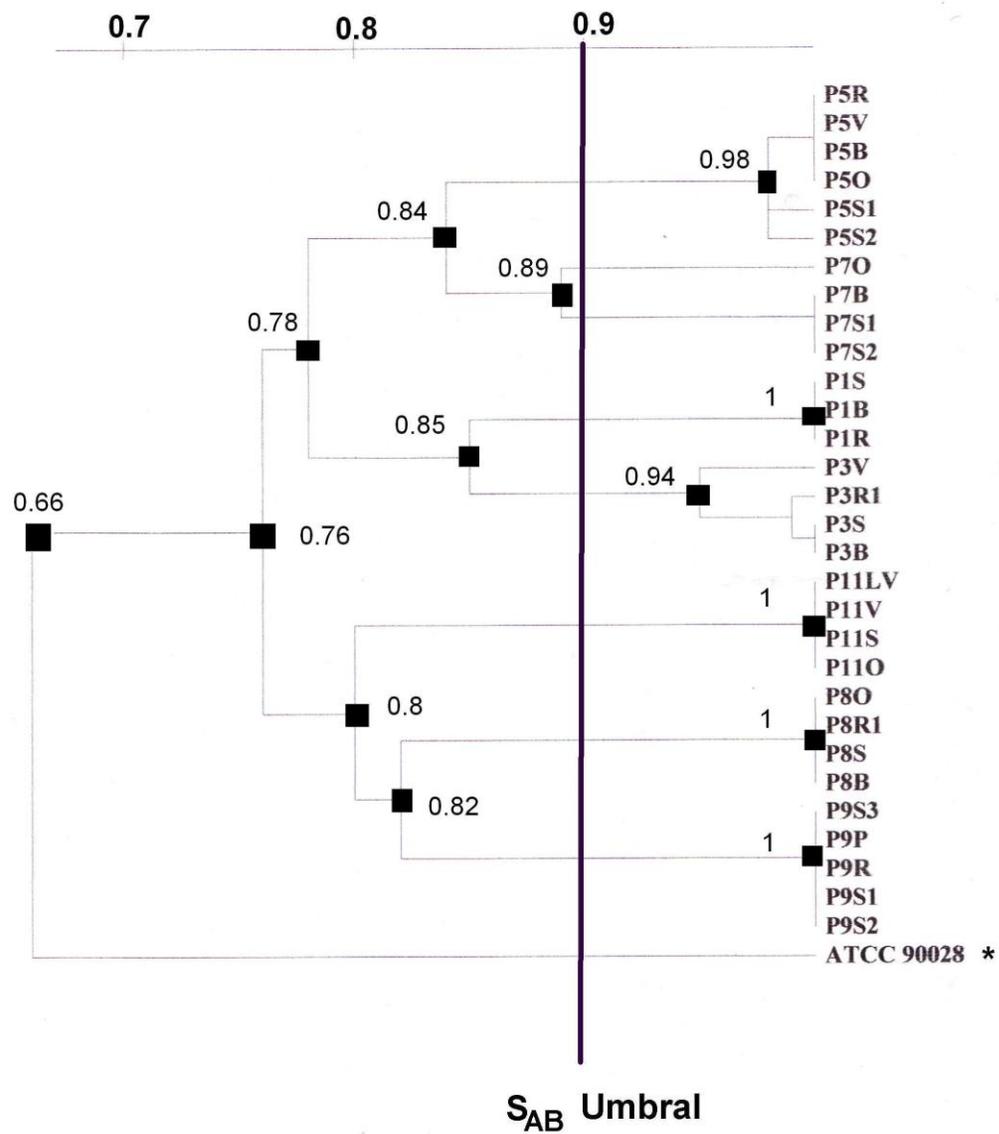
Una vez confirmado que las cepas del paciente dos, exceptuando la cepa de orina, correspondían a *C. dubliniensis*, se realizaron dos dendrogramas que agruparon las cepas de cada especie más su cepa control, según correspondiese (Figura 10 y 11). Estos dendrogramas conservaron los datos obtenidos en el dendrograma principal (Figura 7).

Para *C. albicans*, la Figura 10 muestra que la mayoría de los pacientes forman su propio “cluster”, de esta manera todos los aislados provenientes de un mismo paciente muestran un  $S_{AB} > 0.9$ , es decir, presentan un  $S_{AB}$  mayor al umbral de similitud genética ( $S_{AB} \geq 0.9$ ).

Esta situación no ocurre a cabalidad en el paciente siete, ya que al considerar la cepa de orina, los aislados de este paciente presentan un  $S_{AB}$  bajo el umbral de similitud, aunque muy cercano a éste. Como muestra la Figura 10, en el paciente siete casi la totalidad de los aislados presentan un  $S_{AB}$  de 1, sin embargo al incluir el aislado de orina (P7O), el cual presenta diferencias en su patrón de bandas, se obtiene un  $S_{AB}$  aproximado de 0.89. Este valor se encuentra en el rango de valores  $S_{AB}$  para aislados moderadamente relacionados genéticamente ( $S_{AB} \geq 0.8 < 0.9$ ).

Otro hecho importante de destacar en la Figura 10, es que en los pacientes uno, ocho, nueve y once, tanto las cepas patógenas como las aisladas de sitios colonizados, presentan un  $S_{AB}$  de 1, ya que los perfiles de RAPD no presentan diferencias en el patrón de bandas dentro de cada paciente. En el caso de los aislados del paciente cinco, se observa un  $S_{AB}$  aproximado de 0.98, ya que los aislados de sangre (P5S1, P5S2) presentan diferencias menores en el patrón de bandas generado, con respecto al resto de los aislados del paciente. Este valor de 0.98 se encuentra en el rango de valores  $S_{AB}$  para aislados altamente relacionados genéticamente ( $S_{AB} \geq 0.9 < 1$ ).

Analizando la relación existente entre los siete pacientes que presentan candidemia causada por *C. albicans*, en la Figura 10, se puede observar que existen dos “cluster” que presentan una escasa relación de similitud ( $S_{AB}$  de 0.76), es decir, presentan un  $S_{AB} \geq 0.7 < 0.8$ . Sin embargo, en cada uno de estos “cluster” existe una similitud moderada ( $S_{AB} \geq 0.8 < 0.9$ ) entre ciertos pacientes, como es el caso de los pacientes uno y tres ( $S_{AB}$  0.85), cinco y siete ( $S_{AB}$  0.84), y de los pacientes ocho, nueve y once ( $S_{AB}$  0.80). Al incluir en este análisis la cepa ATCC 90028 de *C. albicans*, se obtiene un  $S_{AB}$  aproximado de 0.66, lo que indica que esta cepa de referencia no se encuentra relacionada genéticamente con los aislados de los pacientes ( $S_{AB} \geq 0.6 < 0.7$ ).



\* Cepa Control de *C. albicans*

Figura 10.

Dendrograma realizado con el programa TreeCon<sup>®</sup> a partir de los Coeficientes de Similitud generados por las 30 cepas de *C. albicans* más la cepa control (ATCC 90028), utilizando los partidores OPBA 03, OPBA 09, OPBA 10, OPBA 13 Y OAA 14. Umbral de similitud genética,  $S_{AB} \geq 0.9$ .

En resumen, al observar los  $S_{AB}$  registrados en los dendrogramas de las Figuras 7 y 10, se obtiene un valor de  $S_{AB}$  promedio de 0.97, para los pacientes que presentaron *C. albicans* en hemocultivo y sitios colonizados (Cuadro 5).

Cuadro 5.  $S_{AB}$  promedio por paciente y entre pacientes, correspondiente a cepas de *C. albicans*.

<b>Paciente</b>	<b><math>S_{ab}</math> paciente</b>
Uno	1
Tres	0.94
Cinco	0.98
Siete	0.89
Ocho	1
Nueve	1
Once	1
<b><math>S_{ab}</math> promedio</b>	<b>0.97</b>

Por otra parte, el dendrograma generado para el paciente dos muestra que los aislados de *C. dubliniensis* presentan un  $S_{AB}$  aproximado de 0,98, hecho que también ocurre en *C. albicans*. Sin embargo, al incluir la cepa de orina (P2O), que corresponde a *C. albicans*, se obtiene un  $S_{AB} < 0.1$  (Figura 11). Por otro lado, al comparar los aislados de *C. dubliniensis* con la cepa control (CBS 7989), se presenta un  $S_{AB}$  aproximado de 0.75, lo que señala que estos aislados más la cepa CBS pertenecen a la misma especie, sin embargo, no comparten un origen clonal común (Figura 11).

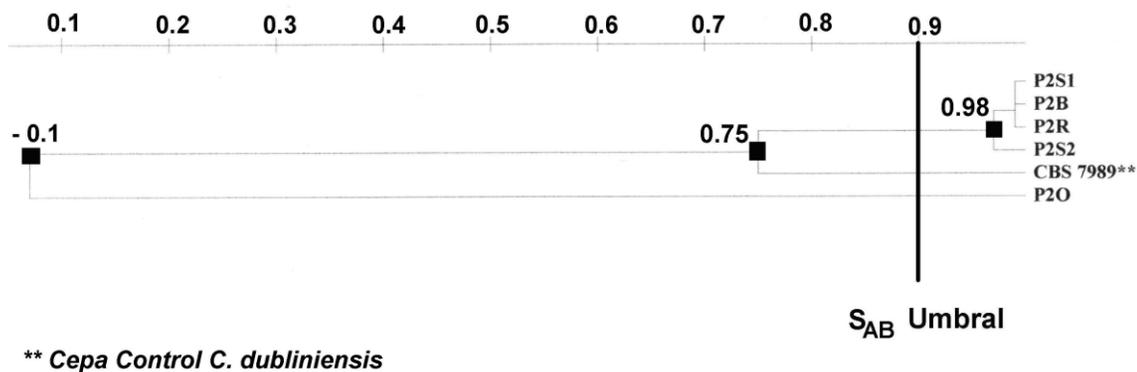


Figura 11.

Dendrograma realizado con el programa TreeCon<sup>®</sup> a partir de los coeficientes de similitud generados por las cuatro cepas de *C. dubliniensis* y la cepa de *C. albicans* (P2O) del paciente dos más la cepa control (CBS 7989), utilizando los partidores OPBA 03, OPBA 09, OPBA 10, OPBA 13 Y OAA 14. Umbral de similitud genética,  $S_{AB} \geq 0.9$ .

Los aislados de *C. dubliniensis* del paciente dos, así como las cepas de referencia, sirvieron como control en el estudio, ya que permitieron determinar la diferencia entre cepas alta y moderadamente relacionadas, entre aislados escasamente relacionados, entre aislados no relacionados entre sí y entre aislados pertenecientes a distintas especies. De acuerdo con esto último, la Figura 7 muestra que las cepas de *C. dubliniensis* del paciente dos, presentan un valor  $S_{AB} < 0.4$ , en relación con las cepas de *C. albicans* de los otros siete pacientes. La misma situación ocurre con las cepas control de *C. dubliniensis* (CBS 7989) y de *C. glabrata* (55 sv).

### 3.- Genotipificación por DGGE.

Luego de comprobar que cuatro de las cinco cepas del paciente dos correspondían a *C. dubliniensis*, sólo se continuó con la tipificación molecular de las 30 cepas de *C. albicans* más la cepa control ATCC 90028, dejando a un lado las cepas de otras especies.

El DGGE se realizó utilizando una combinación de dos partidores, Ca1F con “clamp” o cola de GC y Ca3RC, los que generaron como amplificado un fragmento de 724 pb. Este fragmento incluye la porción final del 18S, todo el ITS1 y el 5.8S y parte del ITS2 del rADN. En la Figura 12, se muestra un ejemplo de los fragmentos de 724 pb., obtenidos para el paciente tres, cinco, siete y ocho, más la cepa control ATCC.

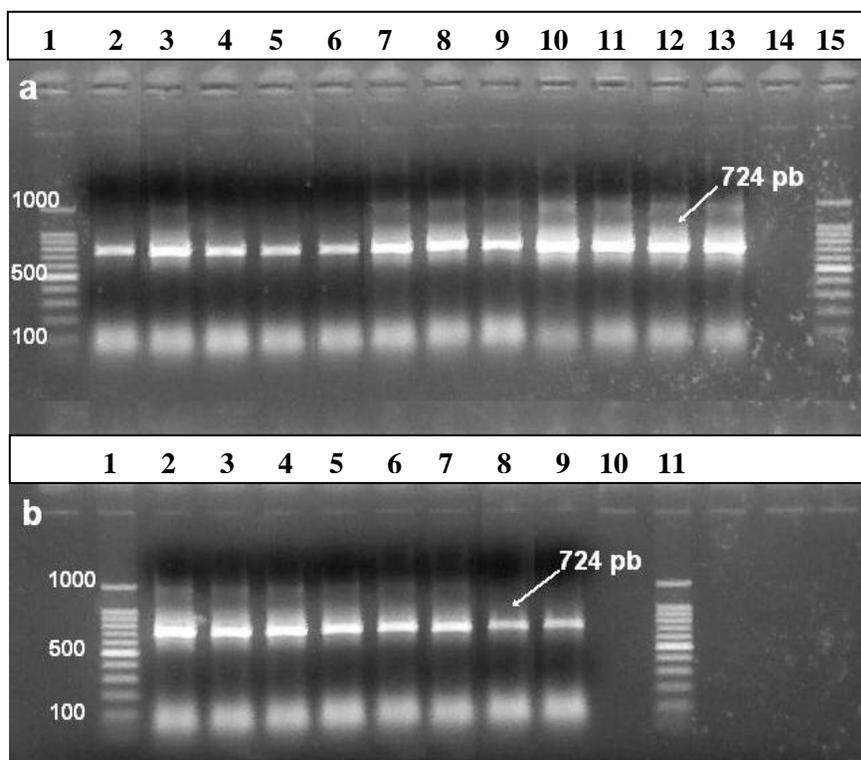


Figura 12. PCR para *C. albicans*, utilizando los partidores Ca1F con “clamp” de GC y Ca3RC. Figura 12a; carriles 1 y 15: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb.; carril 2: P3S; carril 3: P3B; carril 4: P3R1; carril 5: P3V; carril 6: P5S1; carril 7: P5S2; carril 8: P5B; carril 9: P5O; carril 10: P5R; carril 11: P5V; carril 12 y 13: ATCC 90028 de *C. albicans*; carril 14: control negativo. Figura 12b; carriles 1 y 11: marcador de peso molecular, Ladder 100 pb., carril 2: P7S1; carril 3: P7S2; carril 4: P7B; carril 5: P7O; carril 6: P8S; carril 7: P8B; carril 8: P8O; carril 9: P8R1; carril 10: control negativo.

La gradiente utilizada en el gel de poliacrilamida fue de 20-60%, para encontrar variaciones más pequeñas en la secuencia del fragmento amplificado. Una vez realizada la técnica, se obtuvo sólo un patrón de migración característico para las 30 cepas evaluadas y para la cepa de referencia. La migración de los distintos fragmentos generados por PCR no muestra diferencias entre los distintos aislados evaluados, ya sea entre aislados de un mismo paciente, como tampoco entre aislados de distintos pacientes y con la cepa de referencia, ya que estos migraron a la misma altura en el gel. Este patrón se observa en las Figuras 13 y 14.

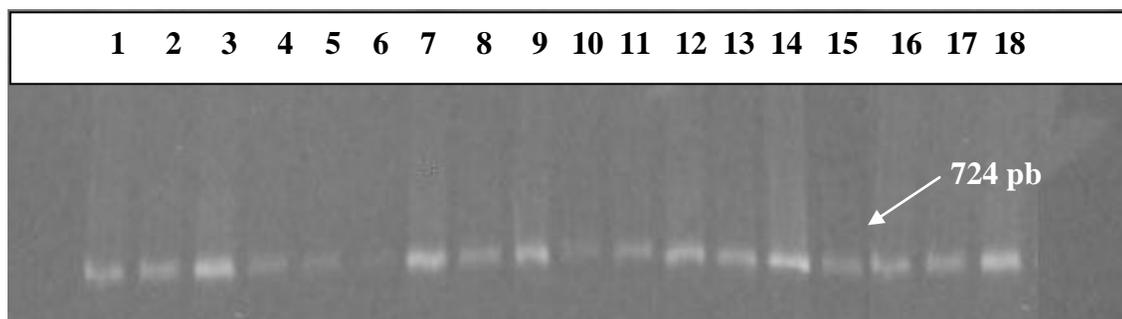


Figura 13:

Perfil de migración por DGGE de los fragmentos amplificados por PCR, correspondientes a las cepas de *C. albicans* de los pacientes uno, tres, cinco y siete, más la cepa de referencia ATCC 90028 de *C. albicans*. Carriles 1, 2 y 3: paciente uno; carriles 4, 5, 6 y 7: paciente tres; carriles 8, 9, 10, 11, 12 y 13: paciente cinco; carriles 14, 15, 16 y 17: paciente siete; carril 18: cepa ATCC 90028.

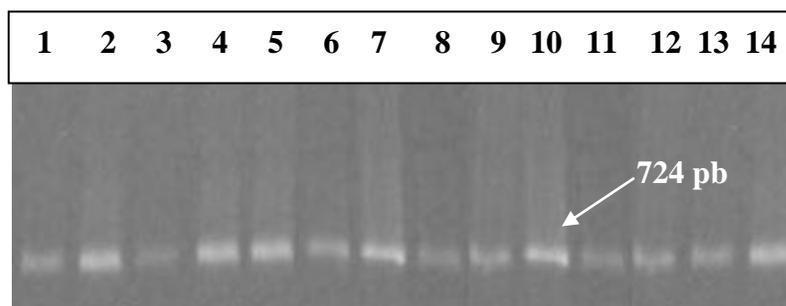


Figura 14:

Perfil de migración por DGGE de los fragmentos amplificados por PCR, correspondientes a las cepas de *C. albicans* de los pacientes ocho, nueve y once, más la cepa de referencia ATCC 90028 de *C. albicans*. Carriles 1, 2, 3 y 4: paciente ocho; carriles 5, 6, 7, 8 y 9: paciente nueve; carriles 10, 11, 12 y 13: paciente once; carril 14: cepa ATCC 90028.

#### **4.- Comparación entre RAPD y DGGE.**

Utilizando el método de RAPD como “gold standard”, el DGGE, bajo las presentes condiciones experimentales, presentó una sensibilidad del 100% y un valor predictivo positivo de 0,78. Por otro lado, no presentó especificidad (0%), mientras que el valor predictivo negativo fue de 0 (Anexo 1, Item 7). Ante estos resultados, se observa que la técnica de DGGE no fue capaz de discriminar similitud real entre aislados de *C. albicans* de un mismo paciente y diferenciar entre los aislados de distintos pacientes.

#### **5.- Método estadístico**

El test de Mc Nemar o  $\chi^2$  corregido arrojó un valor de 6. El valor tabular de  $\chi^2$ , con un error de 5% (0.05) y un grado de libertad, es de  $\chi^2 \geq 3.84$ . Por lo tanto, se puede apreciar que la probabilidad de ocurrencia de un valor de  $\chi^2$  como el obtenido, considerando la hipótesis nula como verdadera, es menor que 0.05 ( $p < 0.05$ ). Es decir, dado que 6 es mayor que 3.84, el valor calculado cae en la región de rechazo de la hipótesis nula. Por lo tanto, se puede concluir que entre los dos métodos comparados, existe una diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a la genotipificación de cepas de *C. albicans*, siendo mejor la técnica de RAPD.

## DISCUSIÓN

Las infecciones fúngicas nosocomiales han aumentado significativamente desde la década de los ochenta, siendo las levaduras del género *Candida* spp., los principales agentes etiológicos. *C. albicans* es la especie aislada en un 40-70% de las infecciones del torrente sanguíneo (Pfaller *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004). Estas infecciones están asociadas a altas tasas de morbilidad y mortalidad, por lo tanto, el esclarecimiento de las vías de transmisión de estos agentes es de suma importancia, más aún si el agente involucrado es *C. albicans*, debido a que la epidemiología de esta levadura es aún más controversial, ya que está presente como comensal, en seres humanos sanos, en un 40-80% (Kam y Xu, 2002).

Diversos estudios muestran resultados contradictorios en cuanto a la relación de origen de cepas comensales y patógenas aisladas de un mismo paciente, siendo la hipótesis más aceptada, el origen endógeno de la infección por *Candida* spp., (Voss *et al.*, 1994; Marco *et al.*, 1999; Tortorano *et al.*, 2004; Magill *et al.*, 2006), aunque también se ha comprobado la adquisición exógena de cepas infectantes a partir del personal de la salud, entre pacientes o a través de dispositivos médicos y soluciones contaminadas (Boccia *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003a; Shin *et al.*, 2005).

Gracias al advenimiento de la biología molecular, diversos métodos de genotipificación han surgido como alternativa, para el estudio de las rutas epidemiológicas de la infección por *Candida* spp., especialmente la infección hematógena o candidemia. Dentro de estos métodos, el RAPD surge como una alternativa importante ya que es una técnica fácil de realizar, rápida y sustentable para estudios epidemiológicos de rutina, sin embargo, posee un poder discriminatorio un tanto menor que otras técnicas y además presenta inconvenientes en cuanto a su reproducibilidad (Soll, 2000; Neppelenbroek *et al.*, 2006).

Por las razones mencionadas anteriormente, para que el RAPD pueda ser usado como herramienta de genotipificación, se deben utilizar varios partidores con actividad intraespecie y también se debe estandarizar la técnica, lo que mejora sustancialmente el poder discriminatorio y la reproducibilidad (Soll, 2000; Giammanco *et al.*, 2005).

Una vez corregidas estas limitantes, el RAPD es una técnica capaz de discriminar entre cepas genéticamente idénticas, aislados altamente similares, aislados moderada y escasamente relacionados y cepas no relacionadas (Pujol *et al.*, 1997). Todas las sugerencias antes mencionadas fueron consideradas en este estudio.

Por otro lado, el DGGE, técnica poco utilizada en levaduras, surge como alternativa en la genotipificación de *Candida* spp., ya que presenta una alta sensibilidad, alto poder discriminatorio y alta reproducibilidad (Hayes *et al.*, 1999; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001; Gafan *et al.*, 2005), además esta técnica ha sido utilizada con éxito en bacterias y en la tipificación de algunas levaduras (Mc Auliffe *et al.*, 2003; Divol *et al.*, 2006).

Se genotipificó mediante RAPD y DGGE, levaduras del género *Candida* spp., aisladas de hemocultivo y de sitios colonizados, desde pacientes con candidemia internados en UCI, con el propósito de determinar si las cepas aisladas de estos sitios colonizados y de sangre, tienen un origen clonal.

Con respecto al RAPD, los cinco partidores utilizados fueron polimórficos, es decir, discriminaron entre aislados de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, generando perfiles de RAPD propios para cada especie. Estos partidores mostraron además, patrones característicos para cepas aisladas de un mismo paciente y diferenciables de los encontrados para cepas de otros pacientes y cepas de referencia o control, como se observa en las figuras que muestran los perfiles electroforéticos generados por el RAPD (Figuras 1 a la 6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores, los cuales a través de este mismo método, han logrado discriminar entre cepas de distintas especies y cepas de la misma especie aisladas de distintos sitios (Robert *et al.*, 1995; Steffan *et al.*, 1997; Abarca, 2001). Otras características importantes de esta técnica, es que al igual que lo señalado por otros investigadores (Steffan *et al.*, 1997; Bautista-Muñoz *et al.*, 2003; Neppelenbroek *et al.*, 2006), en este caso el RAPD también fue un método poco laborioso, rápido, de bajo costo y fácil de interpretar.

Para lograr que los resultados del RAPD fueran comparables con otros estudios y para realizar una interpretación adecuada de éstos, se incorporó una medida de similitud genética ( $S_{AB}$ ) para determinar la relación entre cepas. Esta medida fue obtenida a través de la fórmula descrita por Dice, 1945., que considera la presencia y ausencia de bandas. Una vez computados los valores de  $S_{AB}$  entre todos los pares de la colección de aislados, se realizó un dendrograma principal (Figura 7) y dos dendrogramas menores (Figura 10 y 11), generados a través del método UPGMA.

Para interpretar los datos generados de los dendrogramas, se determinó un punto de corte o umbral de similitud  $S_{AB} \geq 0.9$ , para establecer el tipo de relación existente entre los aislados, ya que para *C. albicans*, se han reportado umbrales  $S_{AB}$  cercanos o iguales a 0.9 (Pujol *et al.*, 1997; Marco *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Boccia *et al.*, 2002), que consideran niveles crecientes de similitud, o en su efecto, para determinar si dos cepas son isogénicas o clonales ( $S_{AB} = 1$ ).

Al analizar el dendrograma principal generado en el estudio, se observa la presencia de dos grandes “cluster”, los cuales muestran por separado, ambas especies de *Candida* spp., aisladas desde pacientes. Esto concuerda con el hecho de que *C. dubliniensis* es una especie genotípicamente distinta a *C. albicans*, a pesar de su gran similitud fenotípica (Silva *et al.*, 2003b; Neppelenbroek *et al.*, 2006). En este estudio, esta diferencia encontrada en el dendrograma principal fue ratificada por los resultados obtenidos en el PCR diagnóstico para *C. dubliniensis* (Figura 9).

En el dendrograma principal se observó además, el agrupamiento de los aislados de un mismo paciente en “cluster” únicos o independientes, sugiriendo una alta relación genética entre ellos. Los aislados de otros pacientes y de las cepas control quedaron excluidos de estos “cluster”. Esto coincide en cierta medida con el hecho de que todos los pacientes presentaron colonización, en distintos lugares del cuerpo, por cepas de la misma especie aislada en sangre, lo que sugiere que la población infectante y comensal es monoclonal y que además el principal origen de la infección por *Candida* spp., es endógeno, lo que también señalan otros estudios (Voss *et al.*, 1994; Odds *et al.*, 2006).

De acuerdo al umbral  $S_{AB} \geq 0.9$  escogido, los aislados de un mismo paciente pertenecen a cepas genéticamente muy relacionadas, por lo que compartirían un origen clonal, pero son distinguibles de cepas de otros pacientes y de cepas control. Esto fue así para seis de los siete pacientes en los que se aislaron cepas de *C. albicans* y para el paciente en el que se recuperaron cepas de *C. dubliniensis*. En forma más detallada, en los pacientes uno, ocho, nueve y once, tanto la cepa patógena como las comensales son isogénicas o idénticas, presentando un  $S_{AB} = 1$ . En el caso del paciente cinco, se presenta un  $S_{AB}$  aproximado de 0.98, ya que los aislados de sangre (P5S1, P5S2) presentan diferencias menores en el patrón de bandas generado, con respecto al resto de los aislados, lo que sugiere que estos aislados han sufrido un fenómeno conocido como microevolución (Sampaio *et al.*, 2005; Odds *et al.*, 2006).

Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores, los cuales señalan que el principal escenario en la tipificación de *C. albicans*, es la reproducción clonal de cepas colonizantes y la posterior infección, por diseminación de estas cepas endógenas, encontrándose también cambios esporádicos a nivel del ADN de estas cepas, lo que se conoce como microevolución o microvariación (Marco *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2005; Odds *et al.*, 2006).

En el caso del paciente siete, casi la totalidad de los aislados son isogénicos, exceptuando el aislado de orina (P7O), el cual no presenta un mismo origen clonal con el resto ( $S_{AB}$  0.89). Este hecho ha sido reportado por otros investigadores, quienes señalan que un mismo individuo puede estar colonizado por múltiples especies o múltiples cepas de una misma especie, en el mismo o en diferentes sitios anatómicos (Xu *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006) y que estas pueden ser reemplazadas unas por otras, fenómeno conocido como “strain replacement” (Sampaio *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005).

El hecho de que la cepa de *C. albicans* obtenida de orina no esté relacionada con el resto de las cepas del paciente siete, presenta la interrogante de que esta cepa pueda haberse transmitido exógenamente, sin embargo, existen dos factores que desafían esta interrogante.

Por un lado, la obtención de la muestra de orina se realizó de forma aséptica mediante cateterización vesical, tomando todas las precauciones necesarias en este tipo de procedimiento y segundo, aunque la cepa de orina no está relacionada clonalmente, si se encuentra moderadamente relacionada genéticamente ( $S_{AB} \geq 0.8 < 0.9$ ) con las otras cepas de este paciente.

Al analizar la relación existente entre pacientes que presentan candidemia por *C. albicans*, se presenta un mayor grado de relación entre algunos de ellos, como ocurre entre el paciente uno y tres, cinco y siete y entre los pacientes ocho, nueve y once, observándose que estos aislados se encuentran moderadamente relacionados, aunque no comparten un mismo origen clonal, presentando valores  $S_{AB}$  entre 0.8 y 0.89, como se observa en el dendrograma principal y en el dendrograma menor que agrupa las cepas de *C. albicans* (Figura 7 y 10). La relación existente entre pacientes puede deberse a que los aislados de estos pacientes presentan un mismo origen geográfico y temporalidad, ya que fueron recolectados en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, en Santiago, en el transcurso del año 2005, y por lo tanto, tendrían un ancestro común.

Al determinar la relación existente entre la cepa control de *C. albicans* (ATCC 90028) y el aislado de orina del paciente dos con el resto de las cepas de *C. albicans*, se observa que las dos primeras no se encuentran relacionadas con las otras cepas de pacientes. En el caso de la cepa control, esto se debe a que fue aislada en otro país y en un año distinto.

En el caso del paciente dos, los aislados de *C. dubliniensis* se encuentran altamente relacionados ( $S_{AB}$  0.98), sin embargo, al agrupar estos aislados con el aislado de orina (P2O), que corresponde a *C. albicans*, se obtiene un  $S_{AB} < 0.2$ , lo que confirma que, a pesar de su alta similitud fenotípica, estos aislados pertenecen a distintas especies ( $S_{AB} < 0.4$ ), ya que presentan grandes diferencias genéticas (Silva *et al.*, 2003b; Neppelenbroek *et al.*, 2006). En este caso se repite el fenómeno observado en la cepa de orina del paciente siete, sin embargo, como no podemos comparar este aislado de *C. albicans* con ningún otro aislado del paciente dos, la adquisición exógena de esta cepa no se puede descartar.

La relación clonal observada entre las cepas patógenas y comensales de cada paciente coincide con los antecedentes reportados en la literatura, los que señalan que la infección hematológica por *Candida* spp., es mayoritariamente endógena, donde un clon de una cepa que coloniza los distintos lugares anatómicos de una persona, bajo ciertas condiciones, puede acceder al torrente sanguíneo y producir infección. Ante estos resultados podemos señalar que la colonización por *Candida* spp., es un factor que se debe tener en cuenta en pacientes con alto riesgo de sufrir infección por estas especies. Con respecto a esto último, este estudio aporta en cierta medida al conocimiento de la epidemiología de la infección por *Candida* spp., en nuestro país y pone como antecedente a la colonización, como factor de riesgo de estas infecciones.

Con respecto al DGGE, la migración de los distintos fragmentos generados por PCR, a partir de las 30 cepas de *C. albicans* más la cepa control, no muestra diferencias entre los distintos aislados evaluados, ya sea entre aislados de un mismo paciente, como tampoco entre aislados de distintos pacientes, ni con la cepa control.

Que los distintos fragmentos se observen a una misma altura dentro del gel, permitiría suponer que existe clonalidad entre todos los aislados evaluados. Sin embargo, como los resultados del RAPD no concuerdan con los obtenidos con el DGGE, lo más probable es que esta técnica no permita registrar pequeñas variaciones en el fragmento amplificado a partir de los aislados de *C. albicans*, al menos bajo las condiciones utilizadas en este estudio. Con respecto a este último punto, varias condiciones fueron evaluadas durante la realización del DGGE, siempre bajo los parámetros señalados en la literatura (Hayes *et al.*, 1999; Gafan *et al.*, 2005). Una de las condiciones que se evaluó fue la gradiente de desnaturación, la cual se sometió a prueba utilizando distintas concentraciones de desnaturante, por ejemplo, 20-80%, 20-70% y 20-60%, sin embargo ninguna de estas concentraciones permitió detectar diferencias dentro de los aislados de cada paciente como tampoco entre pacientes. Otra condición evaluada fue el voltaje al cual se realizó la electroforesis. Se testearon voltajes de 120, 100 y 80, sin embargo, ninguno de estos evidenció mejorías en la técnica.

Una tercera condición evaluada fue la duración de la electroforesis. Para esto se utilizaron dos tiempos, 18 y 15 horas, pero esta condición tampoco modificó los resultados. Ante esta situación se podría pensar que quizás el tamaño del fragmento amplificado no era el adecuado, ya que aunque la literatura señala que el DGGE puede realizarse con amplificadores de hasta 1.000 pb (Hayes *et al.*, 1999), un tamaño óptimo varía entre las 300 y 500 pb, y el tamaño del fragmento utilizado en este estudio fue de 724 pb, lo que podría haber dificultado el desarrollo de la técnica.

Estos resultados se ven reflejados con mayor claridad una vez que se calculó el rendimiento de esta técnica, es decir, su sensibilidad, especificidad y valores predictivos. La especificidad nula presentada por el DGGE, señala que esta técnica no permitió registrar variaciones en el fragmento amplificado, aún cuando el fragmento incluye las regiones ITS que son las que presentan mayor variabilidad en el rADN fúngico, mientras que la técnica de RAPD sí permite registrar pequeñas variaciones en el genoma fúngico.

En cuanto al valor predictivo positivo, este arrojó un valor de 0.78, mientras que el valor predictivo negativo fue de 0. Estos resultados señalan el hecho de que el DGGE es una técnica que no es capaz de discriminar entre aislados altamente similares, aunque sí entre aislados clonales.

Finalmente, después de comparar las dos técnicas mediante el test de Mc Nemar o  $\chi^2$  corregido, se pudo concluir que entre los dos métodos existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), en cuanto a la determinación de clonalidad de cepas de *C. albicans*, siendo mejor la técnica de RAPD para determinar clonalidad.

## CONCLUSIONES

- Las cepas patógenas y comensales de *C. albicans* provenientes de un mismo paciente con candidemia, están en su gran mayoría, relacionadas clonalmente, lo que confirmaría el origen endógeno de esta infección invasora en los siete pacientes que presentaron esta levadura en sangre.
- Las cepas patógenas y comensales de *C. dubliniensis* en un paciente, también se encuentran relacionadas clonalmente, sin embargo, y como es de esperar, no comparten relación alguna con los aislados de otras especies.
- El paciente dos presentó colonización mixta por *C. dubliniensis* y por *C. albicans*, pudiendo ser ésta última adquirida exógenamente.
- El RAPD es una excelente herramienta para genotipificación en *Candida* spp., ya que discrimina entre cepas genéticamente idénticas (clonales o isogénicas), altamente relacionados pero no idénticas, cepas moderada y escasamente relacionadas y cepas no relacionadas entre sí.
- El DGGE no permitió discriminar entre cepas de *C. albicans* aisladas de un mismo paciente como tampoco entre cepas de distintos pacientes, ya que no fue capaz de detectar variaciones en los fragmentos amplificados.
- Con respecto a ambas técnicas, existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la determinación de clonalidad, entre cepas de *C. albicans*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ABARCA, C. Genotipificación de Cepas de *Candida* spp. Aisladas de Secreción Vaginal y Orina en Pacientes con Catéter Vesical Internadas en UCI. Tesis Profesional para Optar al Título de Tecnólogo Médico con Mención en Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, 2001. 62 h.
2. ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCIA-PALOMO, J.D.; FARINAS-ALVAREZ, C.; FERNANDEZ-MAZARRASA, C.; FARINAS, M.C. 2003. Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology and Factors Influencing Mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22 (4): 254-257.
3. BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. 1991. Secular Trends in Nosocomial Primary Bloodstream Infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am. J. Med.* 91 (3B): 86S-89S.
4. BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A., FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F.B.; VISCOLI, C. 2006. Epidemiological Trends in Nosocomial Candidemia in Intensive Care. *BMC Infect. Dis.* 6: 21.
5. BAUTISTA-MUÑOZ, C.; BOLDO, X. M.; VILLA-TANACA, L.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. 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 (1): 414-420.
6. BOCCIA, D.; POSTERARO, B.; LA SORDA, M.; VENTO, G.; MATASSA, P.G.; TEMPERA, A.; PETRUCCI, S.; FADDA, G. 2002. Genotypic Analysis by 27A DNA Fingerprinting of *Candida albicans* Strains Isolated during an Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 23 (5): 281-284.
7. CALDERONE, R.A. Sección I, History and General Properties of *Candida*. Capítulo 2. Taxonomy and Biology of *Candida*. *In: Candida and Candidiasis*, 1º edición. Washington D.C., Estados Unidos. Editorial ASM Press. 2002a. pp. 3 a 15.
8. CALDERONE, R.A. Sección VI, Diseases Caused by *Candida* spp. *In: Candida and Candidiasis*, 1º edición. Washington D.C., Estados Unidos. Editorial ASM Press. 2002b. pp. 307 a 349.
9. CHARLES, P.E.; DALLE, F.; AUBE, H.; DOISE, J.M.; QUENOT, J.P.; AHO, L.S.; CHAVANET, P.; BLETTERY, B. 2005. *Candida* spp. Colonization Significance in Critically ill Medical Patients: A Prospective Study. *Intensive Care Med.* 31 (3): 393-400.

10. CHEN, K.W.; CHEN, Y.C.; LO, H.J.; ODDS, F.C.; WANG, T.H.; LIN, C.Y.; LI, S.Y. 2006. Multilocus Sequence Typing for Analyses of Clonality of *Candida albicans* Strains in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 44 (6): 2172-2178.
11. CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. 2005. Risk Factors for Fatal Candidemia Caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida* Species. *BMC Infect. Dis.* 5 (1): 22.
12. CHENG, Y.R.; LIN, L.C.; YOUNG, T.G.; LIU, C.E.; CHEN, C.H.; TSAY, R.W. 2006. Risk Factors for Candidemia-Related Mortality at a Medical Center in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39 (2): 155-161.
13. COLOMBO, A. L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N. 2003. Global Distribution and Outcomes for *Candida* Species Causing Invasive Candidiasis: Results from an International Randomized Double-Blind Study of Caspofungin versus Amphotericin B for the Treatment of Invasive Candidiasis. 2003. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22 (8): 470-474.
14. DICE, L. 1945. Measures of the Amount of Ecological Association between Species. *Ecology.* 26: 297-300
15. DIEKEMA, D.J.; BEEKMANN, S.E.; CHAPIN, K.C.; MOREL, K.A.; MUNSON, E.; DOERN, G.V. 2003. Epidemiology and Outcome of Nosocomial and Community-Onset Bloodstream Infection. *J. Clin. Microbiol.* 41 (8): 3655-3660.
16. DIGIOVINE, B.; CHENOWETH, C.; WATTS, C.; HIGGINS, M. 1999. The Attributable Mortality and Cost of Primary Nosocomial Bloodstream Infections in the Intensive Care Unit. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 160 (3): 976-981.
17. DIVOL, B.; MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A. 2006. Genetic Characterization of Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Responsible for 'Refermentation' in *Botrytis*-Affected Wines. *J. Appl. Microbiol.* 100: 516-526.
18. EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; MCCLISH, D.K.; PFALLER, M.A., JONES, R.N.; WENZEL, R.P. 1999. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29 (2): 239-244.
19. FANELLO, S.; BOUCHARA, J. P.; SAUTERON, M.; DELBOS, V. ; PAROT, E. ; MAROT-LEBLOND, A. ; MOALIC, E., LE FLOHIC, A. M. ; BRANGERD, B. 2006. Predictive Value of Oral Colonization by *Candida* Yeast for the Onset of a Nosocomial Infection in Elderly Hospitalized Patients. *J. Med. Microbiol.* 55 (Pt. 2): 223-228.

20. FORCHE, A.; MAY, G.; BECKERMAN, J.; KAUFFMAN, S.; BECKER, J.; MAGEE, P. T. 2003. A System for Studying Changes in *Candida albicans* during Infection. *Fungal. Genet. Biol.* 39 (1): 38-50.
21. FUNDYGA, R.E., LOTT, T.J.; ARNOLD, J. 2002. Population Structure of *Candida albicans*, a Member of the Human Flora, as Determined by Microsatellite Loci. *Infect. Genet. Evol.* 2 (1): 57-68.
22. GAFAN, G.P.; LUCAS, V.S.; ROBERTS, G.J.; PETRIE, A.; WILSON, M.; SPRATT, D.A. 2005. Statistical Analyses of Complex Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles. *J. Clin. Microbiol.* 43 (8): 3971-3978.
23. GALVAN, B.; MARISCAL, F. 2006. Epidemiología de la Candidemia en UCI. *Rev. Iberoam. Micol.* 23: 12-15.
24. GIAMMANCO, G.M.; LOPES, M.M.; COIMBRA, R.S.; PIGNATO, S.; GRIMONT, P.A.; GRIMONT, F.; FREITAS, G.; GIAMMANCO, G. 2005. Value of Morphotyping for the Characterization of *Candida albicans* Clinical Isolates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100 (5): 483-490.
25. GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L.P.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. 2003. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. Bloodstream Isolates from Latin American Hospitals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98 (3): 401-405.
26. GUDLAUGSSON, O; GILLESPIE, S; LEE, K; VANDE BERG, J; HU, J; MESSER, S; HERWALDT, L; PFALLER, M; DIEKEMA, D. 2003. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. *Clin. Infect. Dis.* 37 (9): 1172-1177.
27. HAYES, V.M.; WU, Y.; OSINGA, J.; MULDER, I.M.; VAN DER VLIES, P.; ELFFERICH, P.; BUYS, CH.; HOFSTRA, R.M. 1999. Improvements in Gel Composition and Electrophoretic Conditions for Broad-Range Mutation Analysis by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Nucleic. Acids. Res.* 27 (20): e29.
28. HEDDERWICK, S.A.; LYONS, M.J.; LIU, M.; VAZQUEZ, J.A., KAUFFMAN, C.A. 2000. Epidemiology of Yeast Colonization in the Intensive Care Unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19 (9): 663-670.
29. HERMOSILLA, G.; SILVA, V.; DÍAZ, M. C. 2005. Diagnóstico de Laboratorio. *In: IV Curso Internacional de Micología Médica 2005: Manual Teórico del Curso Internacional de Micología Médica: 4 al 29 de Julio de 2005.* Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Medicina e Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Microbiología y Micología. pp. 90 a 95.

30. HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N.; WETZEL, W.E.; CHAKRABORTY, T.; DOMANN, E. 2003. Clonal Identity of *Candida albicans* in the Oral Cavity and the Gastrointestinal Tract of Pre-School Children. *Oral Microbiol. Immunol.* 18 (5): 302-308.
31. JAIN, P.; KHAN, Z.K., BHATTACHARYA, E.; RANADE, S.A. 2001. Variation in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Profiles Specific to Fluconazole-Resistant and- Sensitive Strains of *Candida albicans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41 (3): 113-119.
32. KAM, A.P.; XU, J. 2002. Diversity of Comensal Yeast within and among Healthy Host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43 (1): 19-28.
33. KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. Definition, Classification and Nomenclature of the Yeast. *In: The Yeast: A Taxonomic Study.* 4<sup>o</sup> Ed. Amsterdam, Holanda. Elsevier Science B.V. 1998; 1055p.
34. LOCKHART, S.R.; FRITCH, J.J.; MEIER, A.S.; SCHRÖPPEL, K.; SRIKANTHA, T.; GALASK, R.; SOLL, D.R. 1995. Colonizing Populations of *Candida albicans* Are Clonal in Origin but Undergo Microevolution through C1 Fragment Reorganization as Demonstrated by DNA Fingerprinting and C1 Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 33 (6): 1501-1509.
35. LUZZATI, R., AMALFITANO, G.; LAZZARINI, L.; SOLDANI, F.; BELLINO, S.; SOLBIATI, M.; DANZI, M.C.; VENTO, S., TODESCHINI, G.; VIVENZA, C.; CONCIA, E. 2000. Nosocomial Candidemia in Non-Neutropenic Patients at an Italian Tertiary Care Hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19 (8): 602-607.
36. MCAULIFFE, L.; ELLIS, R.J.; AYLING, R.D.; NICHOLAS, R.A.. 2003. Differentiation of *Mycoplasma* Species by 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10): 4844- 4847.
37. MADRID, H. Desarrollo de un Método de Diagnóstico Molecular por PCR para Diferenciar *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Tesis Profesional para Optar al Título de Tecnólogo Médico con Mención en Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, 2004. 64 h.
38. MAGILL, S.S.; SWOBODA, S.M.; JOHNSON, E.A.; MERZ, W.G.; PELZ, R.K.; LIPSETT, P.A.; HENDRIX, C.W. 2006. The Association between Anatomic Site of *Candida* Colonization, Invasive Candidiasis, and Mortality in Critically ill Surgical Patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 55 (4): 293-301.

39. MARCO, F.; LOCKHART, S.R.; PFALLER, M.A.; PUJOL, C.; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; WIBLIN, T.; BLUMBERG, H.M.; EDWARDS, J.E.; JARVIS, W.; SAIMAN, L.; PATTERSON, J.E.; RINALDI, M.G.; WENZEL, R.P.; SOLL, D.R. 1999. Elucidating the Origins of Nosocomial Infections with *Candida albicans* by DNA Fingerprinting with the Complex Probe Ca3. *J. Clin. Microbiol.* 37 (9): 2817-2828.
40. NEPPELENBROEK, K.H.; CAMPANHA, N.H.; SPOLIDORIO, D.M.; SPOLIDORIO, L.C.; SEO, R.S.; PAVARINA, A.C. 2006. Molecular Fingerprinting Methods for the Discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral. Dis.* 12 (3): 242-253.
41. NGUYEN, M.H., PEACOCK, J.E. Jr.; MORRIS, A.J.; TANNER, D.C.; NGUYEN, M.L.; SNYDMAN, D.R.; WAGENER, M.M.; RINALDI, M.G.; YU, V.L. 1996. The Changing Face of Candidemia: Emergence of Non-*Candida albicans* Species and Antifungal Resistance. *Am. J. Med.* 100 (6): 617-623.
42. ODDS, F.C.; DAVIDSON, A.D.; JACOBSEN, M.D.; TAVANTI, A.; WHYTE, J.A.; KIBBLER, C.C.; ELLIS, D.H.; MAIDEN, M.C.; SHAW, D.J.; GOW, N.A. 2006. *Candida albicans* Strain Maintenance, Replacement, and Microvariation Demonstrated by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 44 (10): 3647-3658.
43. OTAÍZA, F.; BRENNER, P. 1999. Informe de la Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Intrahospitalarias, Chile 1997-1998. Ministerio de Salud de Chile.
44. OTAÍZA, F.; BRENNER, P. 2001. Informe de la Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Intrahospitalarias, Chile 1999-2000. Ministerio de Salud de Chile.
45. PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A. 1998. International Surveillance of Bloodstream Infections due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7): 1886-1889.
46. PFALLER. 2000. Epidemiology of Nosocomial Candidiasis: The Importance of Molecular Typing. *Braz. J. Infect. Dis.* 4 (4): 161-167.
47. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; SADER, H.S.; FLUIT, A.C.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A. and the SENTRY Participant Group. 2001. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and in Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 39 (9): 3254-3259.

48. PIAZZA, O.; BOCCIA, M.C.; IASIELLO, A.; STORTI, M.P.; TUFANO, R.; TRIASSI, M. 2004. Candidemia in Intensive Care Patients. Risk Factors and Mortality. *Minerva Anesthesiol.* 70 (1-2): 63-69.
49. PITTET, D; MONOD, M; SUTER, P.M.; FRENK, E; AUCKENTHALER, R. 1994. *Candida* Colonization and Subsequent Infections in Critically ill Surgical Patients. *Ann. Surg.* 220 (6): 751-758.
50. PITTET, D.; LI, N.; WOOLSON, R.F.; WENZEL, R.P. 1997 Microbiological Factors Influencing the Outcome of Nosocomial Bloodstream Infections: a 6-year Validated, Population-Based Model. *Clin. Infect. Dis.* 24 (6): 1068-1078.
51. PIZZO, G.; BARCHIESI, F.; FALCONI DI FRANCESCO, L.; GIULIANA, G., ARZENI, D., MILICI, M.E., D'ANGELO, M.; SCALISE, G. 2002. Genotyping and Antifungal Susceptibility of Human Subgingival *Candida albicans* Isolates. *Arch. Oral. Biol.* 47 (3): 189-196.
52. PUJOL, C.; REYNES, J.; RENAUD, F.; RAYMOND, M.; TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J.; JANBON, F.; MALLIE, M.; BASTIDE, J.M. 1993. The Yeast *Candida albicans* Has a Clonal Mode of Reproduction in a Population of Infected Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (20): 9456-9459.
53. PUJOL, C.; JOLY, S.; LOCKHART, S.R., NOEL, S.; TIBAYRENC, M.; SOLL, D.R. 1997. Parity among the Randomly Amplified Polymorphic DNA Method, Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Southern blot Hybridization with the Moderately Repetitive DNA Probe Ca3 for Fingerprinting *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 35 (9): 2348-2358.
54. REAGAN, D.R., PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; WENZEL, R.P. 1990. Characterization of the Sequence of Colonization and Nosocomial Candidemia Using DNA Fingerprinting and DNA Probe. *J. Clin. Microbiol.* 28 (12): 2733-2738.
55. ROBERT, F.; LEBRETON, F.; BOUGNOUX, M.E.; PAUGAM, A.; WASSERMANN, D.; SCHLOTTERER, M.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. 1995. Use of Random Amplified Polymorphic DNA as a Typing Method for *Candida albicans* in Epidemiological Surveillance of a Burn Unit. *J. Clin. Microbiol.* 33 (9): 2366-2371.
56. SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; DASSANAYAKE, R.S.; YAU, J.Y.; TSANG, W.K.; CHEUNG, B.P.; YEUNG, K.W. 2003. "Genotypic Shuffling" of Sequential Clones of *Candida albicans* in HIV-infected Individuals with and without Symptomatic Oral Candidiasis. *J. Med. Microbiol.* 52 (Pt. 4): 349-359.

57. SAMPAIO, P.; GUSMAO, L.; CORREIA, A.; ALVES, C.; RODRIGUES, A.G.; PINA-VAZ, C.; AMORIM, A.; PAIS, C. 2005. New Microsatellite Multiplex PCR for *Candida albicans* Strain Typing Reveals Microevolutionary Changes. *J. Clin. Microbiol.* 43 (8): 3869-3876.
58. SCHABEREITER-GURTNER, C.; MACA, S.; ROLLEKE, S.; NIGL, K.; LUKAS, J.; HIRSCHL, A.; LUBITZ, W.; BARISANI-ASENBAUER, T. 2001. 16S rDNA-Based Identification of Bacteria from Conjunctival Swabs by PCR and DGGE Fingerprinting. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (6): 1164-1171.
59. SCHMID, J.; HERD, S.; HUNTER, P.R.; CANNON, R.D.; YASIN, M.S.; SAMAD, S.; CARR, M.; PARR, D.; MCKINNEY, W.; SCHOUSBOE, M.; HARRIS, B.; IKRAM, R.; HARRIS, M.; RESTREPO, A.; HOYOS, G.; SINGH, K. P. 1999. Evidence for a General-Purpose Genotype in *Candida albicans*, Highly Prevalent in Multiple Geographical Regions, Patient Types and Types of Infection. *Microbiology.* 145 (Pt. 9): 2405-2413.
60. SHIN, J.H.; PARK, M.R.; SONG, J.W.; SHIN, D.H.; JUNG, S.I.; CHO, D.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. 2004. Microevolution of *Candida albicans* Strains during Catheter-Related Candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 42 (9): 4025-4031.
61. SHIN, J.H.; OG, Y.G.; CHO, D.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. 2005. Molecular Epidemiological Analysis of Bloodstream Isolates of *Candida albicans* from a University Hospital over a Five-Year Period. *J. Microbiol.* 43 (6): 546-554.
62. SILVA, V.; ZEPEDA, G.; ABARCA, C.; CABRERA, M.; CONTRERAS, L. 2002. Aspectos Epidemiológicos de las Infecciones del Torrente Sanguíneo por Levaduras. Confrontando Nuestra Realidad con el Mundo. *Rev. Ciencia y Salud.* 6: 51-58.
63. SILVA, V.; ZEPEDA, G.; RYBANK, M.E.; FEBRÉ, N. 2003a. Portación de Levaduras en Manos de Estudiantes de Medicina. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 41-45.
64. SILVA, V.; CABRERA, M.; DÍAZ, M.C.; ABARCA, C.; HERMOSILLA, G. 2003b. Prevalencia de Serotipos de *Candida albicans* en Aislamientos de Hemocultivo en Chile y Primer Caso de Candidemia por *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 46-51.
65. SILVA, V.; DIAZ, M.C.; FEBRE, N.; AND THE CHILEAN INVASIVE FUNGAL INFECTIONS. 2004. Invasive Fungal Infections in Chile: A Multicenter Study of Fungal Prevalence and Susceptibility during a 1-Year Study. *Med. Mycol.* 43: 333-339.

66. SILVA, V. 2006. Taller de Capacitación en Diagnóstico Micológico de IFI. “Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Fúngicas-IFI”. Programa de Microbiología y Micología-ICBM, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Septiembre 2006. pp. 38-49.
67. SNEATH, P.H.A.; SOKOL R.R. 1973. Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages. *In: Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco, U.S.A. Editorial W.H Freeman Co., 1973. pp. 573.
68. SOLL, D.R. 2000. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 13 (2): 332-370.
69. STEFFAN, P.; VAZQUEZ, J.A.; BOIKOV, D.; XU, C.; SOBEL, J.D.; AKINS, R.A. 1997. Identification of *Candida* Species by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of Colony Lysates. *J. Clin. Microbiol.* 35 (8): 2031-2039.
70. SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. 1998. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *J. Clin. Microbiol.* 36 (2): 329-334.
71. SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. Sección VII, Laboratory Work Up of Candidiasis. Capítulo 28. Molecular Approaches to Identification and Typing of *Candida* Species. *In: CALDERONE, R.A., Candida and Candidiasis*, 1° edición. Washington D.C., Estados Unidos. Editorial ASM Press. 2002. pp. 427-441.
72. TAVANTI, A.; LUPETTI, A.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; DAVINI, P.; FILIPPONI, F.; BOGGI, U.; BIANCOFIORE, G.; CAMPA, M.; SENESI, S. 2001. Molecular Monitoring of *Candida albicans* Infections in Liver Transplant Recipients. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (8): 544-553.
73. TAVANTI, A., GOW, N.A., MAIDEN, M.C., ODDS, F.C.; SHAW, D.J. 2004. Genetic Evidence for Recombination in *Candida albicans* Based on Haplotype Analysis. *Fungal Genet. Biol.* 41 (5): 553-562.
74. TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; FORDYCE, M.J.; GOW, N.A.; MAIDEN, M.C.; ODDS, F.C. 2005. Population Structure and Properties of *Candida albicans*, as Determined by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 43 (11): 5601-5613.
75. TIBAYRENC, M. 1997. Are *Candida albicans* Natural Populations Subdivided?. *Trends Microbiol.* 5 (7): 253-254.

76. TORTORANO, A.M.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C.C; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; and The ECMM Working Group on Candidemia. 2004. Epidemiology of Candidemia in Europe: Results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23 (4): 317-322.
77. TRICK, W.E.; FRIDKIN, S.K.; EDWARDS, J.R.; HAJJEH, R.A.; GAYNES, R.P. and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. 2002. Secular Trend of Hospital-Acquired Candidemia among Intensive Care Unit Patients in the United States during 1989-1999. *Clin. Infect. Dis.* 35 (5): 627-630.
78. VALERIO, H.M; WEIKERT-OLIVEIRA, R. DE C.; RESENDE, M.A. 2006. Differentiation of *Candida* Species Obtained from Nosocomial Candidemia Using RAPD-PCR Technique. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39 (2): 174-178.
79. VAN DE PEER, Y; DE WACHTER, R. 1994. TREECON for Windows: A Software Package for the Construction and Drawing of Evolutionary Trees for the Microsoft Windows Environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10 (5): 569-570.
80. VIUDES, A.; PEMAN, J.; CANTON, E.; UBEDA, P.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; GOBERNADO, M. 2002. Candidemia at a Tertiary-Care Hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21 (11): 767-774.
81. VOSS, A.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A., WENZEL, R.P.; DOEBBELING, B.N. 1994. Investigation of the Sequence of Colonization and Candidemia in Nonneutropenic Patients. *J. Clin. Microbiol.* 32 (4): 975-980.
82. WARREN, D.K.; ZACK, J.E.; ELWARD, A.M.; COX, M.J.; FRASER, V.J. 2001. Nosocomial Primary Bloodstream Infections in Intensive Care Unit Patients in a Nonteaching Community Medical Center: a 21-month Prospective Study. *Clin. Infect. Dis.* 33 (8): 1329-1335.
83. WENZEL, R.P.; GENNINGS, C. 2005. Bloodstream Infections Due to *Candida* Species in the Intensive Care Unit: Identifying Especially High-Risk Patients to Determine Prevention Strategies. *Clin. Infect. Dis.* 41 (Suppl. 6): S389-S393.
84. WEY, S.B.; MORI, M.; PFALLER, M.A.; WOOLSON, R.F.; WENZEL, R.P. 1988. Hospital-Acquired Candidemia. The Attributable Mortality and Excess Length of Stay. *Arch. Intern. Med.* 148 (12): 2642-2645.
85. WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids. Res.* 18 (22): 6531-6535.

86. WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. 2004. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin. Infect. Dis.* 39 (3): 309-317.
87. XU, J.; BOYD, C.M.; LIVINGSTON, E.; MEYER, W.; MADDEN, J.F.; MITCHELL, T.G. 1999. Species and Genotypic Diversities and Similarities of Pathogenic Yeast Colonizing Women. *J. Clin. Microbiol.* 37 (12): 3835- 3843.
88. XU, J.; MITCHELL, T.G. Sección I, History and General Properties of *Candida*. Capítulo 5. Population Genetic Analyses of *Candida*. *In:* CALDERONE, R.A., *Candida* and Candidiasis, 1º edición. Washington D.C., Estados Unidos. Editorial ASM Press. 2002. pp. 55-64.
89. YAZDANPARAST, K.; AUGER, P.; MARCHAND, R.; CARRIER, M.; CARTIER, R. 2001. Predictive Value of *Candida* Colonization Index in 131 Patients Undergoing Two Different Cardiovascular Surgical Procedures. *J. Cardiovasc. Surg.* 42 (3): 339-343.

## ANEXO 1

### Item 1.- Ecuaciones

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.

Dice L. 1945. Measures of the Amount of Ecological Association between Species. *Ecology* 26: 297-300

### Item 2.- Software Utilizado

Kodak 1D v3.6

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

### Item 3.- Partidores RAPD

Identificación	Secuencia nucleotídica 5'→3'	% Guanina-Citosina
OPBA 03	GTGCGAGAAC	60
OPBA 09	GGA ACTCCAC	60
OPBA 10	GGACGTTGAG	60
OPBA 13	AGGGCGAATG	60
OAA 14	AACGGGCCAA	60

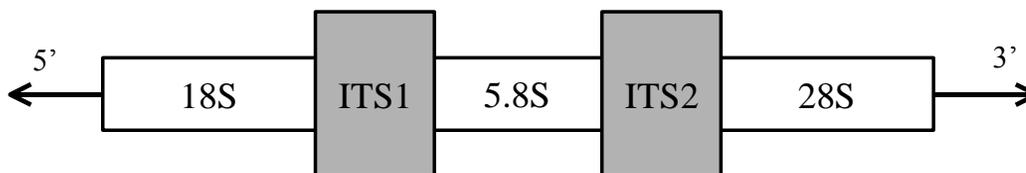
Fuente: IDT<sup>®</sup> e Invitrogen<sup>®</sup> (Abarca, 2001).

### Item 4.- Partidores DGGE

Identificación	Secuencia nucleotídica 5'→3'
CA 1F	TAC ACT GAC GGA GCC AGC
CA1F-GC	40 GC-TAC ACT GAC GGA GCC AGC
CA3RC	AAA GCG ATC CCG CCT TAC C
CA3RC-GC	40 GC-AAA GCG ATC CCG CCT TAC C

Fuente: IDT<sup>®</sup> e Invitrogen<sup>®</sup> (Madrid, 2004).

### Item 5.- Esquema Complejo Génico del ADN Ribosomal en Eucariontes, incluyendo los Espaciadores Internos de Transcripción (ITS).



**Item 6.- Partidores PCR Diagnóstico para *C. dubliniensis*.**

<b>Identificación</b>	<b>Secuencia nucleotídica 5'→3'</b>
Cd2F	TGTTCTGGACAAACTTGC
Cd3RC	CAAGCAATCTCCGCCTTAT

Fuente: IDT<sup>®</sup> (Madrid, 2004).

**Item 7.- Tabla de 2 X 2 Estadística.**

	<b>RAPD</b>		
<b>DGGE</b>	<b>Clonal</b>	<b>No clonal</b>	<b>Total</b>
<b>Clonal</b>	<b>A (25)</b> Verdaderos positivos	<b>B (7)</b> Falsos positivos	<b>A+B (32)</b>
<b>No clonal</b>	<b>C (0)</b> Falsos negativos	<b>D (0)</b> Negativos verdaderos	<b>C+D (0)</b>
<b>Total</b>	<b>A+C (25)</b>	<b>B+D (7)</b>	<b>N (32)</b>

Donde:

$$S = (A/(A+C) \times 100 \text{ (sensibilidad)})$$

$$E = (D/(B+D) \times 100 \text{ (especificidad)})$$

$$VP(+) = A/A+B \text{ (valor predictivo +)}$$

$$VP(-) = D/C+D \text{ (valor predictivo -)}$$

## ANEXO 2

### Protocolo de Extracción de ADN de Levaduras.

- 1.- Cultivar las levaduras en frascos de 75 ml con 25 ml de medio YPD líquido a 30 °C en agitación constante a 200r.p.m. por 20 horas (o toda la noche).
- 2.- Tomar 1 ml de medio desde la porción superior del tubo y pipetear hacia tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- 3.- Centrifugar a 13.000 g por 2 minutos (para concentrar células).
- 4.- Eliminar el sobrenadante por inversión, secando contra papel absorbente o gasa estéril.
- 5.- Resuspender el sedimento en 300 µl de una mezcla de 287 µl de Sorbitol EDTA, 3 µl de B-mercaptoetanol y 10 µl de liticasa. Resuspender todo el sedimento mezclando suavemente por inversión o golpeando con el dedo.
- 6.- Incubar a 37 °C por 60 o más minutos, agitando suavemente cada 30 minutos hasta percibir la aparición de una textura mucosa que indica la desaparición de la pared del hongo.
- 7.- Centrifugar a 13.000 g por 2 minutos.
- 8.- Eliminar el sobrenadante por inversión y secar el tubo en papel absorbente o gasa estéril.
- 9.- Agregar 300 µl de solución de lisis. Mezclar suavemente por 3 minutos (kit Promega®).
- 10.- Agregar 100 µl de solución de precipitación de proteínas. Mezclar vigorosamente por 20 segundos mínimo, idealmente usando vortex (kit Promega®).
- 11.- Colocar muestra en hielo por 5 minutos o en freezer a -20 °C.
- 12.- Centrifugar a 13.000 g por 2 minutos.
- 13.- Traspasar el sobrenadante, aproximadamente 300 µl, a otro tubo Eppendorf con 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar suavemente por inversión. En este punto se observan a trasluz hilos mucosos que corresponden al ADN precipitado).
- 14.- Centrifugar a 13.000 g por 2 minutos.
- 15.- Eliminar el sobrenadante por inversión y secar cuidadosamente contra papel absorbente, evitar que caiga el “pellet” de ADN al invertir el tubo.

- 16.- Añadir 300  $\mu$ l de etanol 70% a temperatura ambiente.
- 17.- Mezclar suavemente por inversión para lavar el ADN precipitado.
- 18.- Centrifugar a 13.000 g por 2 minutos.
- 19.- Eliminar el etanol por aspiración. Se debe aspirar hasta el fondo del tubo, apoyando la punta de la micropipeta en el extremo contrario al que contiene el “pellet” de ADN. Luego secar con papel absorbente cuidadosamente.
- 20.- Dejar los tubos abiertos secándose a 37 °C en cámara de bioseguridad o entre dos mecheros con su llama al máximo.
- 21.- Agregar 100  $\mu$ l de solución de rehidratación (agua milique).
- 22.- Dejar hidratando el ADN por un mínimo de 2 horas, o toda la noche, a 4 °C.
- 23.- Añadir 5  $\mu$ l de RNAsa (a 1mg/ml). Colocar en vortex un segundo e incubar por 30 minutos a 37 °C.
- 24.- Evaluar la calidad y cantidad de ADN por electroforesis en gel de azarosa 0.8% (corrida a 90 volt por 45 minutos).