



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Detección molecular de cuatro especies
comunes de *Candida* a partir de hemocultivos**

Tesis que presenta

José Oscar Arturo Hernández Carreón

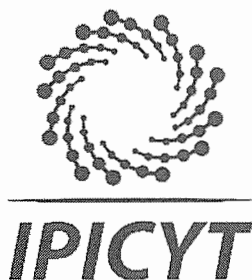
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Directora de tesis:

Dra. Irene Beatriz Cataño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre de 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Detección molecular de cuatro especies comunes de Candida a partir de hemocultivos**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Oscar Arturo Hernández Carreón** y aprobada el veintinueve de noviembre del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Director de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

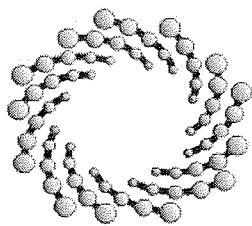
Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la **Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**, apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto No. CB-2014-239629 y el proyecto No. 161971 del Fondo Sectorial de Salud (FOSISS).

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 611321) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 184 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de noviembre del año 2018, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Oscar Arturo Hernández Carreón

sobre la Tesis intitulada:

Detección molecular de cuatro especies comunes de Candida a partir de hemocultivos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

El Jurado, después de deliberar, determinó

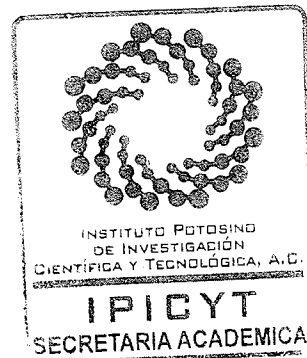
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:21 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de noviembre de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

*Para mis padres Juana Carreón y Gustavo Hernández
Para mis hermanos Dulce, Juan y Miriam
En memoria de los que partieron Martha y K.*

“Aprendí que el coraje no es la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él. El hombre valiente no es aquel que no siente miedo, sino que conquista ese miedo”

-Nelson Mandela

“Un poco más de persistencia, un poco más de esfuerzo, y lo que parecía irremediablemente un fracaso puede convertirse en un éxito glorioso”

-Elbert Hubbard

Agradecimientos

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Dra. Irene Castaño por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por su constante apoyo y dirección en mi formación profesional.

A mis sinodales el Dr. Sergio Casas Flores y el Dr. Rubén López Revilla por su asesoría y contribuciones en este trabajo.

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

A la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo por su apoyo técnico en este proyecto.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de generación y del Lab. 6 por su compañía, amistad y consejos durante mi estadía.

Al personal del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo técnico.

Al personal del Hospital General ISSSTE de San Luis Potosí y del Hospital Central "Ignacio Morones Prieto" por su colaboración y darme la oportunidad de ingresar en sus instituciones. En particular a los químicos Andrés, Julio, Susy y Rosalío.

Al LANBAMA y su personal por su apoyo técnico, especialmente a L.B. Verónica Zárate Chávez.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Copia del acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Abreviaturas	xi
Glosario	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MATERIAL Y MÉTODOS	5
2.1 Cepas	5
2.2 Extracción de DNA	5
2.3 Identificación de <i>Candida</i> spp.	6
2.4 Ensayo de amplificación aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD)	7
2.5 Secuenciación de la región ITS de aislados clínicos	7
2.6 Susceptibilidad a fluconazol (FCL)	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Detección de las especies de <i>Candida</i> por PCR	9
3.2 Estandarización del método para obtener DNAg	10
3.3 Detección de las especies de <i>Candida</i> a partir de hemocultivos	10
3.4 Detección de las especies de <i>Candida</i> en sangre	11
3.5 Variabilidad genética de los aislados de <i>Candida glabrata</i>	12
3.6 Susceptibilidad a fluconazol en aislados consecutivos de <i>Candida glabrata</i> en diversos pacientes	13
4. DISCUSIÓN	14
5. CONCLUSIONES	19
REFERENCIAS	20

Lista de tablas

Tabla 1. Lista de aislados clínicos y hemocultivos	25
Tabla 2. Aislados clínicos en los que el diagnóstico por Vitek-2® no concuerda con el diagnóstico molecular	29
Tabla 3. Resultados del diagnóstico de las especies de <i>Candida</i> a partir de DNAg de hemocultivos, extraído con los métodos FastPrep, QIAGEN y Mo-Bio	30
Tabla 4. Resultados de diagnóstico a partir de hemocultivos mediante FastPrep	31
Tabla 5. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular en hemocultivos con FastPrep	32
Tabla 6. Susceptibilidad a fluconazol de aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> que proceden de muestras consecutivas de diferentes pacientes	33

Lista de figuras

Figura 1. Distribución de las especies del género <i>Candida</i>	34
Figura 2. Detección de las especies del género <i>Candida</i> con DNAg extraído con FastPrep, Mo-Bio y QIAGEN	35
Figura 3. (concluye)	36
Figura 4. Límite de detección de células de <i>Candida</i> a partir de sangre	37
Figura 5. Dendrogramas y perfiles RAPD-PCR de aislados de <i>C. glabrata</i>	38
Figura 6. Dendrograma de aislados de <i>C. glabrata</i> usando el coeficiente de similitud con <i>OPA-18</i> , <i>OPE-18</i> y <i>OPA-09</i>	39
Figura 7. Ensayo de sensibilidad a fluconazol en aislados clínicos de <i>C. glabrata</i>	40

Anexos

Tabla S 1. Condiciones de PCR utilizadas en el diagnóstico de las especies de <i>Candida</i>	41
Tabla S 2. Número de colonias de levaduras viables en hemocultivos	42
Tabla S 3. Diagnósticos de Vitek-2® discordantes de los de PCR y <i>API ID32C</i> correspondientes a toda la colección de aislados del laboratorio	43
Tabla S 4. Métodos para la identificación de las especies de <i>Candida</i>	44
Figura S 1. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular y por Vitek-2® de 122 aislados clínicos, comparada con el estándar de oro <i>API ID32C</i>	45
Figura S 2. Algoritmo para determinar la especie causante de candidemia	46

Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico
FCL	Fluconazol
ITS	Internally transcribed spacer
O.D.	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RAPD	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico
RNA	Ácido ribonucleico
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages

Glosario

Antígeno. Cualquier sustancia extraña al cuerpo que evoca una respuesta inmune sola o después de formar un complejo con una molécula más grande y que es capaz de unirse a un producto de la respuesta inmunitaria.

Candida. Género de hongos patógenos oportunistas unicelulares que se asemejan a las levaduras. Se encuentran especialmente en la boca, la vagina y el tracto intestinal.

Candidemia. Infección del torrente sanguíneo por hongos del género *Candida*.

Especificidad. Capacidad de una prueba para dar un resultado negativo en una persona que se encuentra sana (verdaderos negativos), es decir confirma ausencia de enfermedad.

Fluconazol. Antimicótico del grupo de los triazoles, que actúa inhibiendo la enzima responsable de la conversión del lanosterol a ergosterol (14- α dimetilasa) que causa inhibición de la división mitótica e impide el crecimiento de los hongos.

Hemocultivo. Cultivo a partir de sangre para detectar la presencia de microorganismos patógenos.

Mortalidad. Número de muertes en un tiempo o lugar dado en relación con el total de la población.

Sensibilidad. Capacidad de una prueba para detectar positivamente la enfermedad en una persona que se encuentra enferma (verdaderos positivos), es decir detecta verdaderos enfermos.

Prueba serológica. Análisis en suero para detectar la presencia de anticuerpos contra un antígeno específico.

Unidad formadora de colonia (UFC). Unidad de medida empleada en la cuantificación de microorganismos viables, es decir, el número de células bacterianas o fúngicas vivas en una muestra líquida o sólida.

Resumen

Detección molecular de cuatro especies comunes de *Candida* a partir de hemocultivos

En este trabajo empleamos oligonucleótidos diseñados en el IPICYT para amplificar secuencias genómicas específicas de las cuatro especies principales causantes de candidemia. Realizamos la identificación de 194 aislados de 89 pacientes atendidos en el INCMNSZ y el INCAN. Encontramos que el 39.7% (n=33) de los casos correspondió a *C. albicans*, el 23.6% (n=21) a *C. glabrata*, el 19.1% a *C. tropicalis* (n=17) y el 12.4% *C. parapsilosis* (n=11).

Además, utilizamos el mismo método para identificar las especies de *Candida* a partir de hemocultivos positivos para *Candida* spp. Mediante el protocolo descrito por Ausubel (FP) para la extracción de DNA genómico logramos detectar hasta 10^5 células/mL con la mayoría de los oligonucleótidos empleados, con una sensibilidad y especificidad del 100%. También logramos detectar hasta 10^4 células de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y 10^5 células de *C. glabrata* y *C. albicans* a partir de muestras de sangre directamente sin cultivar.

Realizamos un análisis de relación genética en 39 aislados de *C. glabrata* de 15 pacientes con el método RAPD-PCR. Encontramos seis genotipos distintos (I-VI), de los cuales el genotipo I fue el más prevalente pues se encontró en aislados de seis pacientes. Todos los aislados del mismo paciente mostraron el mismo genotipo. Finalmente, analizamos la sensibilidad a fluconazol (FLC) donde el 51.3% (19/37) de los aislados de *C. glabrata* (algunos provenientes de muestras consecutivas del mismo paciente) fueron resistentes de manera dosis-dependiente a FLC, el 45.9% (17/37) fueron sensibles y solo uno fue resistente a FLC. Además, dos aislados mostraron menor sensibilidad a FLC que otros aislados del mismo paciente.

En conclusión, desarrollamos un método de PCR de punto final rápido, altamente sensible y específico para la detección de las cuatro principales especies del género *Candida* que causan candidemia en hemocultivos y en sangre. En el análisis de la población de *C. glabrata* observamos correlación genotípica entre los aislados de diferentes pacientes y que algunas cepas tienden a desarrollar resistencia a FLC.

PALABRAS CLAVE: *Candida* spp., PCR, Candidemia, Fluconazol, RAPD.

Abstract

Molecular detection of four common *Candida* species from blood cultures

In this study we used oligonucleotides designed at IPICYT to amplify species-specific genomic sequences of the four main species causing candidemia. We determined the distribution of *Candida* species in 194 clinical isolates from 89 patients from the INCMNSZ and the INCAN. We found that *C. albicans* corresponds to 39.7% (n=33) of the cases, *C. glabrata* to 23.6% (n=21), *C. tropicalis* to 19.1% (n=17) and *C. parapsilosis* to 12.4% (n=11).

We used a method described by Ausubel (FP) for the extraction of genomic DNA from blood cultures positive for *Candida* spp. With this method we detected 10^5 cells/mL with a sensitivity and specificity of 100%. We also detected 10^5 cells of *C. glabrata* and *C. albicans* and 10^4 cells of *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* directly from blood samples.

We then analyzed genetic relatedness using RAPD-PCR analysis on 39 *C. glabrata* isolates from 15 different patients. We found six different genotypes; genotype I was the most prevalent since it was found in clinical isolates from six different patients, and some genotypes were only found in one patient. All the isolates from the same patient showed the same genotype.

Finally, we found that 51.3% (19/37) of the *C. glabrata* isolates were Fluconazole (FLC) resistant in a dose-dependent manner (FLC^{dd}), 45.9% were sensitive to FLC and only one isolate was FLC resistant. In addition, two isolates displayed a decrease in sensitivity to FLC compared to the other isolates from the same patient.

In conclusion, we developed a fast, highly sensitive and specific PCR method for the detection of the four main *Candida* species that cause candidemia both, in blood cultures and whole blood. Genetic analysis by RAPD-PCR of *C. glabrata* isolates we observed genotypic relationship between isolates from different patients. In addition, we found that and that some isolates can develop resistance to FLC.

KEY WORDS: *Candida* spp., PCR, Candidemia, Fluconazole, RAPD-PCR.

Title

Molecular detection of four common *Candida* species from blood cultures

Authors

Oscar Hernández-Carreón, Alba Saucedo-Fuentes, Cesia Hernández-Howell, Blanca Eunice González-Gómez, Grecia Hernández-Hernández, Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo, Alejandro De Las Peñas and Irene Castaño-Navarro

Affiliations

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México

Corresponding author

Dr. Irene Castaño-Navarro, Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México. Phone: (+52) 444 8342000 Ext. 2038 Email: icastano@ipicyt.edu.mx

1. INTRODUCCIÓN

La candidemia es la invasión del torrente sanguíneo por diversas especies de hongos patógenos oportunistas del género *Candida* (Arenas 2011). Representa la cuarta causa de infecciones nosocomiales sanguíneas en Estados Unidos y aproximadamente el 10% de todas las infecciones sanguíneas en pacientes hospitalizados (Corzo-Leon, Alvarado-Matute et al. 2014, Riera, Medeot et al. 2014).

De las más de 200 especies del género *Candida* identificadas, alrededor de 18 son agentes etiológicos de candidemia. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son responsables de más del 90% de los casos de candidemia en todo el mundo (Pfaller and Diekema 2004, Gaona-Flores, Campos-Navarro et al. 2016).

La distribución de las especies de *Candida* depende de la zona geográfica donde son aisladas. En Estados Unidos, *C. glabrata* es la segunda especie más frecuente (23.2%) de casos de candidemia solo después de *C. albicans* (50.0%), *C. parapsilosis* se encuentra en el tercer lugar con un 12.2% y *C. tropicalis* en el cuarto con un 6.8%. Esta distribución es similar en Canadá, Japón y países del norte de Europa (Horn, Neofytos et al. 2009, Lortholary, Desnos-Ollivier et al. 2011, Pfaller, Andes et al. 2014, Ishikane, Hayakawa et al. 2016). Por otro lado, en México *C. albicans* se encuentra en el 43.1% de los casos de candidemia, seguido por *C. parapsilosis* en 27.6%, *C. glabrata* en 12.0% y finalmente *C. tropicalis* en 10.3% de los casos, la cual es una distribución similar a las de países de Latinoamérica y del Mediterráneo (Cortes, Reyes et al. 2011, Colombo, Guimaraes et al. 2014, Corzo-Leon, Alvarado-Matute et al. 2014, Puig-Asensio, Padilla et al. 2014, Riera, Medeot et al. 2014, Silvestri, Bassetti et al. 2014, Gaona-Flores, Campos-Navarro et al. 2016, Siri, Legarraga et al. 2017).

La diversidad en la distribución de las especies de *Candida* no solo se atribuye a la zona geográfica sino también a otros factores como la raza, los cuidados

médicos, el tratamiento recibido, el nivel socioeconómico de cada país o región e inclusive el clima (Ishikane, Hayakawa et al. 2016, Siri, Legarraga et al. 2017).

La candidemia está asociada a una tasa de mortalidad superior al 50%, la cual puede disminuir si el tratamiento adecuado se inicia tempranamente. El diagnóstico oportuno para iniciar el tratamiento adecuado depende de la especie causante, pues algunas especies presentan resistencia natural a ciertos antimicóticos (Garey, Rege et al. 2006, Chang, Neofytos et al. 2008, Riera, Medeot et al. 2014).

El hemocultivo es considerado el “estándar de oro” para el diagnóstico de la candidemia y se complementa con otras pruebas para determinar la especie causante de la infección. Estas pruebas son principalmente las basadas en la asimilación de fuentes de carbono y compuestos nitrogenados y son las que se emplean en los hospitales, tales como *API ID 32C*, *MicroScan™* o *Vitek-2®*. Sin embargo, requieren periodos de 24 a 48 h para dar resultados una vez que se ha obtenido el aislado y tienen una sensibilidad relativamente baja del 75% al 90% (Fricker-Hidalgo, Vandapel et al. 1996, Kaur, Dhakad et al. 2016).

Las pruebas serológicas emplean anticuerpos específicos que detectan en la sangre algunos antígenos que funcionan como marcadores biológicos para *Candida* spp., tales como β -1,3-D-glucano y manano, componentes de la pared celular. Los resultados de las pruebas serológicas se obtienen en corto tiempo (1 a 3 h), sin embargo, presentan baja sensibilidad de 40% al 88% y no permiten identificar la especie, por lo que sólo pueden ser utilizados para descartar candidemia. Además, pueden dar falsos positivos por contaminación con antibióticos o implementos médicos como membranas de diálisis, filtros de celulosa, algodón y algunos fármacos (lentinan, crestina, escleroglucano, esquizofilano). Su falta de disponibilidad y alto costo hacen complicada su implementación en centros clínicos de Latinoamérica (Alam, Mustafa et al. 2007, Ponton 2009, Colombo, Cortes et al. 2013, Held, Kohlberger et al. 2013).

Las pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (o pruebas moleculares) detectan secuencias genómicas específicas de *Candida* spp. mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En general se amplifican los genes que codifican RNAs ribosomales (5.8S y 18S) altamente conservados, o secuencias específicas para cada especie localizadas en la región ITS (internally transcribed spacer) (Colom, Jover et al. 2006).

Las pruebas moleculares han demostrado ser rápidas y de alta fidelidad con una sensibilidad del 70% al 100% y una especificidad del 98% al 100%. Además, se obtienen resultados en menos de 10 h utilizando cualquiera de sus variantes como PCR semi-anidada, PCR en tiempo real (qPCR) y PCR multiplex. El inconveniente con estos métodos es que los oligonucleótidos que utilizan son “universales” de manera que amplifican fragmentos de DNA de tamaños similares que están conservados en todas las especies de *Candida*, por lo que para identificar la especie se requiere un paso adicional, como análisis de restricción o secuenciación del fragmento amplificado (Ahmad, Khan et al. 2002, Alam, Mustafa et al. 2007, Fricke, Fricke et al. 2010, Ospina and Cortes 2011, Guo, Yang et al. 2016). La Tabla S4 muestra un comparativo de métodos para la identificación de las especies de *Candida*.

Por estas razones es importante el desarrollo e implementación de nuevas técnicas para el diagnóstico oportuno y preciso de la especie causante de la candidemia. Con ello sería posible administrar el tratamiento adecuado oportunamente, disminuir la mortalidad y reducir los costos generados por el internamiento en el hospital y los tratamientos fallidos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cepas

2.1.1 *Cepas de referencia.* Las cepas de referencia empleadas en este trabajo fueron: *C. glabrata* (BG14) aislado vaginal utilizado en varios laboratorios del mundo (Cormack and Falkow 1999), *C. glabrata* aislado de heces (ATCC 2001), *C. albicans* (ATCC MYA-2876), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) y *C. tropicalis* (ATCC 750).

2.1.2 *Aislados clínicos y hemocultivos.* Se utilizaron 194 aislados clínicos y 24 hemocultivos positivos para *Candida* spp. en medio BD BACTEC™ diagnosticados posteriormente con Vitek-2®. Estos aislados y hemocultivos son provenientes del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), ubicados en la Ciudad de México, durante el periodo de agosto de 2015 a mayo de 2017 (Tabla 1). Todas las cepas de aislados clínicos y hemocultivos se purificaron en cajas de medio YPD (Extracto de levadura 10 g/L, Peptona 20 g/L, Agar 20 g/L, Glucosa 2%) y se resguardaron a -80 °C en glicerol al 15%.

2.2 Extracción de DNA

2.2.1 *Extracción de DNA a partir de aislados clínicos.* Las levaduras se cultivaron en 3 mL de YPD líquido (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 2%) a 30 °C durante 24 h, con agitación continua. La extracción de DNA genómico (DNAg) se realizó mediante el método con fenol y precipitación con etanol descrito por Ausubel, modificado (Ausubel 2009) y acoplado a Fast Prep™ (FP) para el paso de lisis de las células. El DNAg se disolvió en un volumen final de 200 µL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8).

2.2.2 *Extracción de DNA a partir de hemocultivos.* Para la extracción de DNAg a partir de hemocultivos se emplearon tres métodos diferentes, el método descrito por Ausubel en 2003 modificado y dos kits comerciales, QIAGEN y Mo-Bio, descritos a continuación: **Ausubel (FP)** se tomaron 500 µL de hemocultivo y se

trataron con 500 μ L de buffer GB (Tris-HCl 10 mM pH 8, Triton X-100 1%, Sacarosa 11%) para lisar los glóbulos rojos (Riera, Rojas et al. 2010), se centrifugó a 15000 rpm durante 3 min. y se descartó el sobrenadante. Esto se realizó de tres a cuatro veces hasta no observar residuos de glóbulos rojos en el sedimento. Posteriormente se extrajo el DNAG con el método descrito por Ausubel 2009 y el DNAG obtenido se resuspendió en 50 μ L de buffer TE. **Mo-Bio (MB)** se tomaron 1000 μ L de hemocultivo y se extrajo el DNAG con el kit comercial UltraClean® Blood DNA Isolation Kit de Mo-BIO (Cat. 12000-100). El DNAG obtenido se resuspendió en 50 μ L de solución G4. **QIAGEN (Q)** se tomaron 1000 μ L de hemocultivo y se extrajo el DNAG empleando el kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit de QIAGEN (Cat. 51304), el DNAG obtenido se resuspendió en 50 μ L de solución AE.

2.2.3 Extracción de DNA a partir de sangre. Se recolectaron 1000 μ L de sangre periférica en un tubo con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer® con EDTA K₂ Cat. 368171) y se prosiguió a la extracción de DNAG igual que los hemocultivos con el método de Ausubel.

2.3 Identificación de *Candida spp.*

2.3.1 Diagnóstico por PCR con oligonucleótidos especie-específicos. Se emplearon diez pares de oligonucleótidos especie-específicos, que amplifican regiones únicas en el genoma de cada una de las cuatro principales especies causantes de candidemia (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*), diseñados en el laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos, DBM, IPICYT (Tesis de Maestría Cesia Hernández-Howell, 2014). Se utilizaron 50 ng de DNAG para cada reacción y las condiciones de la PCR utilizadas se especifican en la Tabla S1.

2.3.2 Diagnóstico por asimilación de nutrientes. El perfil de asimilación de nutrientes se realizó con el sistema para la identificación de levadura API ID 32 C (bioMérieux) y el perfil obtenido se comparó con la base de datos APIWeb™.

2.4 Ensayo de amplificación aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD)

El ensayo de RAPD se realizó empleando los oligonucleótidos *OPA-18* (5'-AGC TGA CCG T-3'), *OPE-18* (5'-GGA CTG CAG A-3') y *OPA-09* (5'-GGG TAA CGC C-3') (Baustista-Muñoz, Boldo et al. 2003). Para cada reacción se utilizaron 200 ng de DNAg en un volumen final de 20 µL por reacción, las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial de 94 °C por 4 min., seguido de 35 ciclos consistentes las etapas de desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento a 36 °C para *OPA-18* y *OPE-18* y 37°C para *OPA-09* por 1 min. cada una, extensión a 72 °C por 3 min. y la extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Con los patrones de bandas obtenidos en cada reacción se construyeron matrices binarias, empleando como criterios: 1 para presencia de banda y 0 para ausencia. Utilizando las matrices binarias se calculó el coeficiente de similitud con la fórmula de Jaccard, y mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages), se construyeron los dendrogramas empleando los programas FreeTree (Pavlicek, Hrda et al. 1999) y FigTree v1.4.0.

2.5 Secuenciación de la región ITS de aislados clínicos

Se amplificó la región ITS (Internal transcribed spacer) con los oligonucleótidos *S6RS* y *LR1* (Vilgalys and Hester 1990). El producto de PCR se purificó e insertó en el vector de clonación pMB11 (Sac^S, Cm^R), digerido con *Stu1* (Gallegos-García, Pan et al. 2012). Se utilizaron células de *E. coli DH10* para la transformación y clonación. La secuenciación se realizó mediante método de Sanger empleando el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en el LANBAMA (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental). Con las secuencias obtenidas se realizó un BLAST en la base de datos de NCBI para determinar la especie.

2.6 Susceptibilidad a fluconazol (FCL)

Ensayo fenotípico de sensibilidad. Se utilizaron cultivos en medio YPD en fase estacionaria (48 horas) y se ajustaron a una densidad óptica (O.D.) de 1, que corresponde a 2×10^7 células/mL de *C. glabrata*. Se realizaron diluciones logarítmicas, se tomó el mismo volumen (3 μ L) de cada dilución y se colocó la gota de cada cultivo en cajas de YPD con diferentes concentraciones de fluconazol (4, 8, 16, 32, 64 μ g/mL), se incubaron a 30 °C durante 48 h y se fotografiaron.

3. RESULTADOS

3.1 Detección de las especies de *Candida* por PCR

Para validar la especificidad y sensibilidad de los oligonucleótidos diseñados en el Laboratorio de Microbiología Molecular del IPICYT, para la detección de las cuatro especies principales de *Candida* y determinar la distribución de cada especie por paciente de la colección de que disponemos, inicialmente realizamos la extracción de DNAg a partir de cultivos provenientes de aislados clínicos. Utilizamos este DNAg para realizar el diagnóstico por PCR punto final con cada uno de los diez pares de oligonucleótidos (3 juegos específicos para *C. glabrata*, 2 para *C. albicans*, 3 para *C. tropicalis* y 2 para *C. parapsilosis*).

De 194 aislados logramos determinar la especie en el 86.6% (168 aislados), el resto correspondió a especies diferentes de las cuatro que nuestros oligonucleótidos detectan. La distribución observada fue: *C. albicans* 31.4% (61 aislados), *C. glabrata* 23.7 % (46 aislados), *C. tropicalis* 23.2% (45 aislados) y *C. parapsilosis* 8.2% (16 aislados) (Figura 1A). Los aislados no identificados (ND) corresponden a las especies: *Candida* spp., *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. intermedia* y *C. guilliermondii* de acuerdo con la prueba API ID 32C realizada en el laboratorio y el diagnóstico reportado por el hospital (Tabla S3).

Los 194 aislados provienen de 89 pacientes. Al analizar los datos tomando en cuenta sólo un aislado por paciente, encontramos una distribución similar al análisis del total de aislados: la especie más frecuente fue *C. albicans* con 39.7% (33 pacientes), seguida por *C. glabrata* con 23.6% (21 pacientes), *C. tropicalis* con 19.1% (17 pacientes) y *C. parapsilosis* con 12.4% (11 pacientes); en siete pacientes no se identificó la especie con los oligonucleótidos empleados (Figura 1B).

Todos los resultados de identificación molecular coincidieron con los reportados en el INMNSZ y el INCAN (que utilizaron Vitek-2®), a excepción de los aislados AN349, AN358 y AN578. AN349 y AN358 fueron identificados como *C. glabrata* y

C. albicans respectivamente por Vitek-2®. El diagnóstico molecular de AN349 resultó positivo para *C. albicans* y el de AN358 para *C. parapsilosis*; el diagnóstico molecular concordó con la prueba *API ID 32C*.

En cuanto al aislado AN578 reportado como *C. parapsilosis* por el hospital y la prueba *API ID 32C*, el método molecular no amplificó los fragmentos de DNA *Cp1* y *Cp2*, esperados para *C. parapsilosis*. Con un juego de oligonucleótidos universales amplificamos la región ITS de los genes que codifican RNA ribosomal (oligonucleótidos *S6RS* y *LR1*), clonamos los productos de amplificación en el vector pMB11 y la secuencia del fragmento de la región ITS del aislado AN578 correspondió a *C. orthopsilosis* (Tabla 2).

3.2 Estandarización del método para obtener DNAG

Para determinar el método más adecuado para la obtención de DNAG de levaduras, empleamos dos kits comerciales de las marcas Mo-BIO (**MB**) y QIAGEN (**Q**) y el método de Ausubel et al. (2001) acoplado al equipo Fast Prep™ (**FP**). Utilizamos cultivos de las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* de referencia, ajustamos el número de células para obtener 10^5 , 10^6 y 10^7 células/mL y realizamos las extracciones con los diferentes métodos para el diagnóstico por PCR con los pares de oligonucleótidos específicos para cada especie de *Candida*.

La extracción con el método de **FP** permitió detectar desde la suspensión celular correspondiente a 10^5 células/mL (equivalente a 1,300 células por reacción) con la mayoría de los juegos de oligonucleótidos. En cuanto a los kits comerciales se detectaron un mayor número de levaduras con **MB**, a excepción de los oligonucleótidos específicos para *C. tropicalis*, donde se observan mejor con **Q**, hasta 13,000 células (Figura 2).

3.3 Detección de las especies de Candida a partir de hemocultivos

De igual manera, para determinar cuál es el método más eficiente para la extracción de DNAG a partir de hemocultivos, empleamos los métodos **FP**, **MB** y **Q** a 12 hemocultivos positivos para *Candida* (diagnosticados en el hospital por medio

de Vitek-2®). A partir de estas extracciones de DNAg realizamos las reacciones de PCR con cada par de oligonucleótidos para cada especie.

En las extracciones con **FP** logramos detectar, con al menos un par de nuestros oligonucleótidos, la especie diagnosticada previamente en el hospital en cada hemocultivo. De los resultados obtenidos con **MB**, también logramos determinar la especie de todos los hemocultivos excepto los de AN358 y AN428 que correspondieron a *C. parapsilosis*, mientras que con la extracción por el método **Q** no detectamos ninguna especie (Tabla 3).

Posteriormente empleamos el método de **FP** para la extracción en 12 hemocultivos adicionales (en total 24), donde determinamos la especie presente con la mayoría de los oligonucleótidos. Los casos en los que no determinamos la especie se deben a que en esos hemocultivos la especie no correspondía a ninguna de las que los oligonucleótidos detectan (verdaderos negativos) (Tabla 4). Con los resultados de estos 24 hemocultivos diagnosticados (utilizando el método **FP**), obtuvimos una sensibilidad del 100%, por lo que el método solo detecta verdaderos positivos con una especificidad del 100%, y nuestros resultados negativos efectivamente son sólo verdaderos (Tabla 5).

3.4 Detección de las especies de *Candida* en sangre

Para determinar si es posible identificar las principales especies de *Candida*, directamente de sangre, empleamos cultivos de las cepas de referencia de cada especie de *Candida* y preparamos diluciones con 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 células, que resuspendimos directamente en 1 mL de sangre estéril. Posteriormente realizamos la extracción de DNAg con el método **FP** y el diagnóstico con los oligonucleótidos específicos para cada especie.

Logramos detectar las cuatro especies de *Candida* con el método **FP** y los oligonucleótidos a partir de muestras resuspendidas en sangre. Para las cepas de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* detectamos hasta la suspensión con 10^4 células/mL que corresponden a 330 células en la mezcla de PCR, mientras que para *C.*

albicans y *C. glabrata* solo detectamos hasta la suspensión celular que contiene 10^5 células/mL y corresponden a 3,300 células detectadas (Figura 3).

3.5 Variabilidad genética de los aislados de *Candida glabrata*

En 39 aislados clínicos de *C. glabrata* procedentes de 15 pacientes del INCMNSZ, realizamos el análisis RAPD para conocer la variabilidad genética y la relación de cada aislado inter-paciente empleando los marcadores *OPE-18*, *OPA-18* y *OPA-09*. Este método consiste en la amplificación aleatoria de productos de PCR utilizando sólo uno de los oligonucleótidos *OPA-18*, *OPE-18* y *OPA09* los cuales son cortos (de 10 nucleótidos) y emplean una temperatura de alineamiento baja (~36 °C).

El análisis con *OPA-18* generó ocho genotipos diferentes con once bandas en combinaciones distintas que producen diferentes patrones. El genotipo **IA** es el más común y se encuentra en el 40% los pacientes. Los pacientes Cg7 y Cg2 mostraron los genotipos más variables (**VIIA** y **VIIIA**) mientras que los pacientes Cg14 y Cg15 presentaron el mismo genotipo (**IIIA**) que la cepa de referencia *CBS138* (Figura 4A).

En el análisis con *OPE-18* se generaron seis genotipos diferentes con nueve bandas en diferentes patrones. El genotipo más común fue el **IB** que se encontró en siete pacientes, seguido por el **IVB** en cuatro pacientes. Ningún paciente compartió el genotipo con la cepa de referencia *CBS138* utilizando *OPE-18*. El paciente Cg7 con el genotipo **VIIIB** fue el más variable (Figura 4B).

El análisis con *OPA-09* generó 10 genotipos diferentes con 13 bandas en diferentes patrones. El genotipo **IC** fue el más común y se presentó en seis pacientes diferentes. El genotipo **XC** fue el más variable y corresponde al paciente 2 (Figura 4C).

Con estos datos construimos un dendrograma general de RAPD utilizando las matrices generadas con cada uno de los tres marcadores. Se generaron cuatro

genotipos principales utilizando 92% de similitud como punto de corte, el genotipo más común fue el número I, que se encontró en seis pacientes. Los pacientes Cg5, Cg14 y Cg15 son los más parecidos a la cepa CBS138, con el genotipo II. El genotipo III lo comparten los pacientes Cg1 y Cg8 y los pacientes Cg11 y Cg13 el genotipo IV. Todos los aislados correspondientes al mismo paciente mostraron el mismo genotipo (Figura 5). No observamos relación entre genotipo y fecha de aislamiento (Tabla 6).

3.6 Susceptibilidad a fluconazol en aislados consecutivos de *Candida glabrata* en diversos pacientes

Escogimos 15 pacientes de los cuales se obtuvieron aislados de muestras consecutivas y realizamos el ensayo fenotípico de sensibilidad a FLC para determinar la tendencia de sensibilidad en la población de estudio (37 aislados en total). Ocho de los 15 aislados de *C. glabrata* (53.3%) mostraron sensibilidad a FLC concentración-dependiente (16-32 µg/mL). Seis pacientes (40.0%) portaban cepas FLC-sensibles (<8 µg/mL) y solo el aislado AN556 del paciente Cg11 fue FLC resistente (>64 µg/mL). Los aislados AN517 y AN542 de los pacientes Cg7 y Cg8 respectivamente, mostraron menor susceptibilidad a FLC que los demás aislados del mismo paciente (Figura 6).

4. DISCUSIÓN

Los juegos de oligonucleótidos diseñados en el Laboratorio de Microbiología Molecular del IPICYT para identificar las principales especies de *Candida*, son altamente sensibles y específicos, ya que no dieron resultados falsos negativos ni falsos positivos. Además, pueden distinguir *C. parapsilosis* de otras especies estrechamente relacionadas (*C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*), a diferencia de la prueba *API ID 32* que no distingue estas especies. En cuanto a los aislados AN349 y AN358 donde el hospital reportó especies diferentes, la discrepancia puede deberse a contaminación al momento del cultivo o por una fuente externa que altere el perfil obtenido por Vitek-2®, debido a que el este ensayo se basa en la asimilación de nutrientes. Los oligonucleótidos omiten este tipo de contaminaciones ya que solo amplifican la secuencia específica de la especie para la que fueron diseñados.

Si analizamos la sensibilidad y especificidad de los resultados obtenidos en este trabajo junto con los de estudios previos del laboratorio (n=122), observamos que nuestro diagnóstico molecular muestra 100% de sensibilidad y especificidad. Por otro lado, al comparar los resultados con la prueba estándar de oro *API ID 32C*, en el diagnóstico por Vitek-2® realizado por el hospital la sensibilidad es del 73% y la especificidad del 33% (Figura S1).

En cuanto a la prevalencia, entre los aislados obtenidos en el periodo de 2015 a 2017 la especie más frecuente fue *C. albicans* (39.7%), seguida por *C. glabrata* (23.6%), *C. tropicalis* (19.1%) y *C. parapsilosis* (12.4%). En un estudio realizado en los mismos hospitales con aislados de 74 pacientes obtenidos de 2008 a 2010, las prevalencias fueron para *C. albicans* 46.0%, *C. tropicalis* 26.0%, *C. glabrata* 13.5% y *C. parapsilosis* 4.5% (Corzo-Leon, Alvarado-Matute et al. 2014). Ha habido por tanto un cambio en la prevalencia de las especies en el tiempo y un claro aumento de las infecciones por especies *no-albicans*, en particular por *C. glabrata*. En el Hospital Central de San Luis Potosí en el periodo de 2014 a 2015 observamos 58 casos de candidemia determinados con Vitek-2®, *C. albicans* se

identificó en el 55.2%, *C. tropicalis* y *C. glabrata* en 13.8% y *C. parapsilosis* en 10.3%, distribución similar a la encontrada en la Ciudad de México.

Los métodos actuales para el diagnóstico y detección de candidemia en los hospitales de México son imprecisos y lentos, por lo que es necesario el desarrollo e implementación de nuevas técnicas más eficientes. Nosotros proponemos utilizar el método **FP** para la extracción de DNAg que resultó más adecuado y eficiente que los kits comerciales (**Q** y **MB**), puesto que con él logramos determinar las especies de *Candida* no solo en cultivos de aislados sino también a partir de hemocultivos y sangre.

En los hospitales el tiempo requerido para el diagnóstico de candidemia es de aproximadamente siete días: de uno a cinco días para detectar crecimiento en el hemocultivo y tres días más para obtener el aislado y realizar su identificación (Figura S2). Si implementáramos la extracción con **FP** y la posterior detección con nuestros oligonucleótidos, lograríamos disminuir a menos de la mitad el tiempo requerido para el diagnóstico a partir de hemocultivo, donde la mayor parte del tiempo requerido depende de la detección del crecimiento en el hemocultivo.

En estudios previos se han logrado resultados favorables para la determinación de las especies de *Candida* con pruebas de detección molecular que tienen sensibilidad de 70-100% y especificidad de 98-99%, además de requerir corto tiempo para obtener resultados (<10 h). No obstante, emplean técnicas más complejas que la PCR punto final, como la PCR en tiempo real (qPCR) que puede detectar hasta dos equivalentes genómicos (Fricke, Fricke et al. 2010). Sin embargo, la qPCR tiene altos costos para el montaje y procesamiento de muestras por lo que no es factible realizarlo en los hospitales de forma rutinaria. Otras técnicas son la PCR multiplex y la PCR semi-anidada con oligonucleótidos universales que amplifican regiones ITS, como D1/D2 o ITS1/ITS4. El problema con esta estrategia es que las diferentes especies generan bandas de tamaños similares, lo que dificulta su identificación (Fujita, Senda et al. 2001, Page and Kurtzman 2005). En resumen, el protocolo propuesto además de ser altamente

sensible y específico es fácil de interpretar, es más barato y requiere menos tiempo para el diagnóstico de candidemia por lo que podría emplearse en el diagnóstico de rutina en los hospitales.

En cuanto a la detección a partir de muestras de sangre, solo se ha reportado el diagnóstico molecular de candidemia mediante qPCR, que detecta hasta 1 UFC/mL (Nabili, Ashrafi et al. 2013). Sin embargo, esta técnica tiene las desventajas mencionadas. Por otro lado, el protocolo que proponemos —FP y detección con PCR punto final— demostró ser eficiente para la detección de las principales especies de *Candida*, con lo cual podría realizarse el diagnóstico de candidemia en alrededor de 4 h, tiempo requerido para extracción de DNAg (2 h), PCR (1 h) y electroforesis (1 h). Sin embargo, la densidad mínima de células que alcanzamos a detectar ($\sim 10^4$ células/mL) es excesiva para un paciente con candidemia, por lo que podría optarse por un periodo de incubación en hemocultivo de 12 a 18 h, seguidas de la extracción del DNAg y la PCR, con lo cual requeriríamos posiblemente menos de 24 h para obtener el resultado.

La utilización de marcadores moleculares por medio de la técnica RAPD permite evaluar la similitud y diversidad genética entre aislados con el propósito de identificar, correlacionar y realizar análisis filogenético (Almeida, Nakamura et al. 2015). Pinto y colaboradores (2004) encontraron un perfil diferente de RAPD en un aislado de *C. albicans* obtenido 16 días después de la infección, por lo que el paciente pudo ser colonizado por especies con múltiples genotipos o infectado con una cepa genéticamente diferente. En nuestro análisis de RAPD donde obtuvimos hasta diez perfiles, los aislados de mismo paciente presentaron el mismo patrón de bandas, por lo que no observamos infección por cepas con diferente genotipo.

Paluchowska y colaboradores (2014) encontraron una similitud del 80 al 99% en cepas de *C. albicans* y *C. glabrata*, por lo que sugieren que existen posibles cambios microevolutivos ocurren durante la adaptación a las condiciones ambientales. Además, observaron correlación temporal al encontrar genotipos idénticos en aislados obtenidos de diferentes pacientes, se trata de una

transmisión a nivel local. En nuestro estudio de los seis genotipos obtenidos con los tres marcadores (Figura 5), los genotipos I-IV poseen una similitud de más del 90%, por lo que existe una estrecha relación entre estos aislados con pequeños cambios evolutivos. Los genotipos V y VI que corresponden a los pacientes Cg7 y Cg2 presentan una mayor variabilidad genotípica. El genotipo I fue el más frecuente y más persistente, pues se encontró en aislados obtenidos con más de un año de diferencia en diferentes pacientes (octubre de 2015 a diciembre de 2016). Este hallazgo puede deberse a infecciones inter-pacientes en el hospital, a que se encuentre como contaminante en el ambiente hospitalario, o bien a que es un genotipo común entre aislados clínicos de *C. glabrata*, con pequeños cambios evolutivos.

El conocimiento de la fuente de infección puede ayudar a prevenir la propagación de microorganismos que han desarrollado factores de virulencia como la resistencia a antimicóticos, producción de biopelículas, adhesión o, en el caso de *C. glabrata*, resistencia al estrés oxidante, así como conocer sus posibles rutas de transmisión. La limitante en este estudio es que solo analizamos cepas de *C. glabrata* aisladas a partir de hemocultivos, no tomamos en cuenta las cepas de aislados obtenidas de otros sitios anatómicos o muestras presentes en el hospital, por lo que puede haber un sesgo en la persistencia real de cada genotipo en el hospital.

Respecto al ensayo de sensibilidad a FLC, solo el 6.7% (1/15) de los pacientes tenían cepas resistentes, frecuencia similar a la de 11.1% (1/9) reportada por Corzo et al. (2014). La prevalencia de cepas resistentes a FLC aisladas de hemocultivos en el INCMNSZ es >10%, similar a la de centros médicos de Brasil (Colombo, Guimaraes et al. 2014). Sin embargo, en China e Italia se ha reportado resistencia a FLC hasta en el 60% de aislados de *C. glabrata* (Zhang, Yu et al. 2012, Silvestri, Bassetti et al. 2014). Esta diferencia puede deberse a los lineamientos de tratamiento propios de cada hospital, donde el uso indiscriminado de FLC como tratamiento profiláctico ha favorecido el incremento de cepas resistentes. Nuestra observación de que más de la mitad de los pacientes tuvieron

aislados resistentes a FLC de manera dosis-dependiente, podría indicar que se está propiciando la aparición de cepas cada vez más resistentes a FLC. Los aislados AN517 y AN542, mostraron un ligero aumento en la resistencia a FLC con respecto a los aislados previos de los mismos pacientes, por lo que estas cepas podrían estar desarrollando resistencia a FLC por mutaciones o rearrreglos cromosómicos.

Al comparar los resultados de sensibilidad a FLC con el análisis RAPD no encontramos correlación entre los genotipos y la susceptibilidad a FLC pues los aislados de cada genotipo tuvieron más de un patrón de sensibilidad.

5. CONCLUSIONES

Desarrollamos un método de PCR de punto final rápido, sensible y específico, para identificar las cuatro especies principales del género *Candida* que causan candidemia, a partir de muestras de hemocultivos y de sangre directamente.

La especie más frecuente asociada a candidemia en el INCMNSZ y el INCAN fue *C. albicans* (40%) seguida por *C. glabrata* (24%), *C. tropicalis* (19%) y finalmente *C. parapsilosis* (12%), que es una distribución similar a la reportada en Chile.

La prevalencia de candidemia por especies no-*albicans* han aumentado en los últimos años, especialmente las causadas por *C. glabrata*, que aumentaron del 14% al 24%.

Las candidemias en el INCMNSZ fueron causadas por cepas de *C. glabrata* cuyos genotipos tienen más del 90% de similitud.

De 37 aislados de *C. glabrata* del INCMNSZ, encontramos una prevalencia del 2.7% de aislados resistentes a fluconazol, lo cual es similar a la de otros centros médicos (por ejemplo, Brasil e India).

La alta prevalencia de aislados moderadamente resistentes a fluconazol (51.3%) sugiere hay una tendencia en el aumento de resistencia.

La sensibilidad a fluconazol es independiente del genotipo de los aislados.

REFERENCIAS

- Ahmad, S., Z. Khan, A. S. Mustafa and Z. U. Khan (2002). "Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification." J Clin Microbiol **40**(7): 2483-2489.
- Alam, F. F., A. S. Mustafa and Z. U. Khan (2007). "Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and Candida species-specific snPCR in patients with candidemia." BMC Infect Dis **7**: 103.
- Almeida, A. A., S. S. Nakamura, A. Fiorini, A. B. Grisolia, T. I. Svidzinski and K. M. Oliveira (2015). "Genotypic variability and antifungal susceptibility of Candida tropicalis isolated from patients with candiduria." Rev Iberoam Micol **32**(3): 153-158.
- Arenas, R. (2011). MICOLOGIA MEDICA ILUSTRADA, McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Ausubel, F. M. (2009). Current Protocols in Molecular Biology, Wiley.
- Baustista-Muñoz, C., X. M. Boldo, L. Villa-Tanaca and C. Hernandez-Rodriguez (2003). "Identification of Candida spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between Candida albicans and Candida dubliniensis by Direct PCR Methods." Journal of Clinical Microbiology **41**(1): 414-420.
- Colom, M. F., A. Jover and C. Ferrer (2006). "[Molecular biology in the diagnosis of deep-seated candidiasis in the critically ill non-neutropenic patient]." Rev Iberoam Micol **23**(1): 26-28.
- Colombo, A. L., J. A. Cortes, J. Zurita, M. Guzman-Blanco, T. Alvarado Matute, F. de Queiroz Telles, M. E. Santolaya, I. N. Tiraboschi, J. Echevarria, J. Sifuentes, L. Thompson-Moya, M. Nucci and N. Latin America Invasive Mycosis (2013). "Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Latin America Invasive Mycosis Network." Rev Iberoam Micol **30**(3): 150-157.
- Colombo, A. L., T. Guimaraes, T. Sukienik, A. C. Pasqualotto, R. Andreotti, F. Queiroz-Telles, S. A. Nouer and M. Nucci (2014). "Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period." Intensive Care Med **40**(10): 1489-1498.

Cormack, B. P. and S. Falkow (1999). "Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*." Genetics **151**(3): 979-987.

Cortes-Figueroa, A. A., A. Aguilar-Santana, O. Carrera-Martinez, A. Juarez, E. Bazán-Mora and L. R. Castañón-Olivares (2010). "Sensibilidad y especificidad entre dos medios cromogénicos para la identificación de *Candida* spp." Enf Infec Microbiol **30**(3): 78-82.

Cortes, J. A., P. Reyes, C. Gomez, G. Buitrago, A. L. Leal and G. Group (2011). "Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia." Rev Iberoam Micol **28**(2): 74-78.

Corzo-Leon, D. E., T. Alvarado-Matute, A. L. Colombo, P. Cornejo-Juarez, J. Cortes, J. I. Echevarria, M. Guzman-Blanco, A. E. Macias, M. Nucci, L. Ostrosky-Zeichner, A. Ponce-de-Leon, F. Queiroz-Telles, M. E. Santolaya, L. Thompson-Moya, I. N. Tiraboschi, J. Zurita and J. Sifuentes-Osornio (2014). "Surveillance of *Candida* spp bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals." PLoS One **9**(5): e97325.

Chang, A., D. Neofytos and D. Horn (2008). "Candidemia in the 21st century." Future Microbiol **3**(4): 463-472.

Fricke, S., C. Fricke, C. Schimmelpfennig, C. Oelkrug, U. Schonfelder, R. Blatz, C. Zilch, S. Faber, N. Hilger, M. Ruhnke and A. C. Rodloff (2010). "A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species." J Appl Microbiol **109**(4): 1150-1158.

Fricke-Hidalgo, H., O. Vandapel, M. A. Duchesne, M. A. Mazoyer, D. Monget, B. Lardy, B. Lebeau, J. Freney, P. Ambroise-Thomas and R. Grillot (1996). "Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species." J Clin Microbiol **34**(7): 1846-1848.

Fujita, S. I., Y. Senda, S. Nakaguchi and T. Hashimoto (2001). "Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains." J Clin Microbiol **39**(10): 3617-3622.

Gallegos-Garcia, V., S. J. Pan, J. Juarez-Cepeda, C. Y. Ramirez-Zavaleta, M. B. Martin-del-Campo, V. Martinez-Jimenez, I. Castano, B. Cormack and A. De Las

Penas (2012). "A novel downstream regulatory element cooperates with the silencing machinery to repress EPA1 expression in *Candida glabrata*." Genetics **190**(4): 1285-1297.

Gaona-Flores, V. A., L. A. Campos-Navarro, R. M. Cervantes-Tovar and E. Alcala-Martinez (2016). "The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico city: A 10-year retrospective review." Med Mycol **54**(6): 600-604.

Garey, K. W., M. Rege, M. P. Pai, D. E. Mingo, K. J. Suda, R. S. Turpin and D. T. Bearden (2006). "Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study." Clin Infect Dis **43**(1): 25-31.

Guo, Y., J. X. Yang and G. W. Liang (2016). "A Real-Time PCR Assay Based on 5.8S rRNA Gene (5.8S rDNA) for Rapid Detection of *Candida* from Whole Blood Samples." Mycopathologia **181**(5-6): 405-413.

Held, J., I. Kohlberger, E. Rappold, A. Busse Grawitz and G. Hacker (2013). "Comparison of (1->3)-beta-D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia." J Clin Microbiol **51**(4): 1158-1164.

Horn, D. L., D. Neofytos, E. J. Anaissie, J. A. Fishman, W. J. Steinbach, A. J. Olyaei, K. A. Marr, M. A. Pfaller, C. H. Chang and K. M. Webster (2009). "Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry." Clin Infect Dis **48**(12): 1695-1703.

Ishikane, M., K. Hayakawa, S. Kutsuna, N. Takeshita and N. Ohmagari (2016). "Epidemiology of Blood Stream Infection due to *Candida* Species in a Tertiary Care Hospital in Japan over 12 Years: Importance of Peripheral Line-Associated Candidemia." PLoS One **11**(10): e0165346.

Kaur, R., M. S. Dhakad, R. Goyal, A. Haque and G. Mukhopadhyay (2016). "Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species: A Comparison of Vitek-2 System with Conventional and Molecular Methods." J Glob Infect Dis **8**(4): 139-146.

Lortholary, O., M. Desnos-Ollivier, K. Sitbon, A. Fontanet, S. Bretagne, F. Dromer and G. French Mycosis Study (2011). "Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 532-538.

Nabili, M., M. Ashrafi, G. Janbabaie, M. T. Hedayati, K. Ali-Moghaddam and T. Shokohi (2013). "Quantification and optimization of *Candida albicans* DNA in blood samples using Real- Time PCR." Rep Biochem Mol Biol **2**(1): 42-47.

Ospina, W. P. and J. A. Cortes (2011). "Molecular diagnosis of candidemia by seminested PCR in critically ill patients." Acta Medica Colombiana **36**(3): 135-140.

Page, B. T. and C. P. Kurtzman (2005). "Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by flow cytometry." J Clin Microbiol **43**(9): 4507-4514.

Paluchowska, P., M. Tokarczyk, B. Bogusz, I. Skiba and A. Budak (2014). "Molecular epidemiology of *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains isolated from intensive care unit patients in Poland." Mem Inst Oswaldo Cruz **109**(4): 436-441.

Pavlicek, A., S. Hrda and J. Flegr (1999). "Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*." Folia Biol (Praha) **45**(3): 97-99.

Pfaller, M. A., D. R. Andes, D. J. Diekema, D. L. Horn, A. C. Reboli, C. Rotstein, B. Franks and N. E. Azie (2014). "Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008." PLoS One **9**(7): e101510.

Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2004). "Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." J Clin Microbiol **42**(10): 4419-4431.

Pinto, P. M., M. A. Resende, C. Y. Koga-Ito and M. Tendler (2004). "Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA." Mem Inst Oswaldo Cruz **99**(2): 147-152.

Ponton, J. (2009). "[Usefulness of biological markers in the diagnosis of invasive candidiasis]." Rev Iberoam Micol **26**(1): 8-14.

Puig-Asensio, M., B. Padilla, J. Garnacho-Montero, O. Zaragoza, J. M. Aguado, R. Zaragoza, M. Montejo, P. Munoz, I. Ruiz-Camps, M. Cuenca-Estrella, B. Almirante, C. Project, G. Geih and Reipi (2014). "Epidemiology and predictive factors for early

and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain." Clin Microbiol Infect **20**(4): O245-254.

Riera, F., M. Medeot, L. Sartori, C. Bergallo, J. Minoli, V. Vilchez, P. Sanchez, C. Abiega, C. Pincheira, S. Correa, C. Bartoli, M. Figueroa, M. Montamat, N. Spitale, A. Minguez and J. P. Caeiro (2014). "[Candidemia epidemiology in Cordoba Argentina. Surveillance study of five institutions]." Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba **71**(2): 89-93.

Riera, M., M. Rojas and P. Zapata (2010). "Protocolo de extracción de DNA por salting out para pequeños volúmenes de sangre." Revista de Ciencia y Tecnología **14**: 12-15.

Sheppard, D. C., M. C. Locas, C. Restieri and M. Laverdiere (2008). "Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles." J Clin Microbiol **46**(10): 3508-3509.

Silvestri, F., M. Bassetti, M. Zaramella, L. Domenis, V. Di-Piazza, M. Fazio, M. Maschio and V. Moretti (2014). "Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of candidemia among Internal Medicine Wards of community hospitals of Udine province, Italy." Italian Journal of Medicine. **8**: 253-258.

Siri, L., P. Legarraga, P. García, T. González and R. Rabagliati (2017). "Clinical and epidemiological changes of candidemia among adult patients from 2000 to 2013." Rev Chilena Infectol **34**(1): 19-26.

Vilgalys, R. and M. Hester (1990). "Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species." J Bacteriol **172**(8): 4238-4246.

Willinger, B., C. Hillwoth, B. Selitsch and M. Manafi (2001). "Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*." J Clin Microbiol **39**(10): 3793-3795.

Zhang, X. B., S. J. Yu, J. X. Yu, Y. L. Gong, W. Feng and F. J. Sun (2012). "Retrospective analysis of epidemiology and prognostic factors for candidemia at a hospital in China, 2000-2009." Jpn J Infect Dis **65**(6): 510-515.

Tabla 1. Lista de aislados clínicos y hemocultivos

	AN No.	Procedencia	No. Paciente	Género	Fecha
<i>Candida albicans</i>					
1	358	INCMNSZ	Desconocido	Desconocido	Desconocido
2	427	INCMNSZ	276399	M	12/08/2015
3	430	INCMNSZ	276399	M	19/08/2015
4	434	INCMNSZ	280556	M	26/08/2015
5	438	INCAN	77448313	M	10/09/2015
6	456	INCMNSZ	190412	M	25/10/2015
7	457	INCMNSZ	281129	F	27/10/2015
8	460	INCMNSZ	281813	M	13/11/2015
9	470	INCMNSZ	282398	M	05/01/2016
10	471	INCMNSZ	282398	M	05/01/2016
11	472	INCMNSZ	282398	M	05/01/2016
12	473	INCMNSZ	282398	M	07/01/2016
13	476	INCMNSZ	276399	M	19/08/2015
14	479	INCMNSZ	282398	M	07/01/2016
15	490	INCMNSZ	282824	M	09/05/2016
16	491	INCMNSZ	282824	M	09/05/2016
17	492	INCMNSZ	282824	M	09/05/2016
18	494	INCMNSZ	256660	F	15/04/2016
19	497	INCAN	77452967	M	08/03/2016
20	498	INCAN	77452969	M	08/03/2016
21	521	INCMNSZ	123549	F	28/07/2016
22	525	INCMNSZ	280740	M	08/08/2016
23	527	INCMNSZ	280740	M	08/08/2016
24	528	INCMNSZ	285275	M	17/08/2016
25	529	INCMNSZ	272729	M	24/08/2016
26	530	INCMNSZ	272729	M	24/08/2016
27	531	INCMNSZ	285252	F	03/09/2016
28	534	INCAN	77456665	F	14/09/2016
29	536	INCMNSZ	228237	F	21/09/2016
30	537	INCMNSZ	228237	F	21/09/2016
31	550	INCMNSZ	285252	F	Desconocida
32	552	INCMNSZ	272729	M	01/06/2016
33	557	INCMNSZ	269985	M	28/10/2016
34	558	INCMNSZ	269985	M	28/10/2016
35	559	INCMNSZ	269985	M	28/10/2016
36	560	INCMNSZ	269985	M	29/10/2016
37	562	INCMNSZ	286923	F	13/11/2016
38	563	INCMNSZ	286923	F	13/11/2016
39	564	INCMNSZ	285165	M	13/11/2016
40	565	INCMNSZ	285165	M	13/11/2016
41	566	INCMNSZ	285165	M	13/11/2016
42	567	INCMNSZ	286107	F	09/12/2016
43	568	INCAN	77458112	F	09/12/2016
44	569	INCMNSZ	152119	F	10/12/2016
45	573	INCMNSZ	285852	M	06/01/2017
46	574	INCMNSZ	285852	M	06/01/2017
47	575	INCAN	77458582	F	10/01/2017
48	585	INCMNSZ	1245914	F	10/02/2017
49	586	INCMNSZ	1245914	F	12/02/2017
50	587	INCMNSZ	1245914	F	12/02/2017
51	588	INCMNSZ	1245914	F	12/02/2017

	AN No.	Procedencia	No. Paciente	Género	Fecha
52	590	INCAN	77459345	F	23/02/2017
53	593	INCMNSZ	288718	M	27/02/2017
54	596	INCMNSZ	288858	F	06/04/2017
55	602	INCAN	77459361	M	28/02/2017
56	605	INCAN	77460447	F	02/05/2017
57	608	INCMNSZ	289287	M	10/05/2017
58	609	INCMNSZ	289687	M	20/05/2017
59	610	INCMNSZ	289687	M	20/05/2017
60	614	INCAN	77457134	M	13/10/2016
61	615	INCMNSZ	269985	M	29/10/2016
Candida glabrata					
62	349	INCMNSZ	Desconocido	Desconocido	06/02/2015
63	436	INCMNSZ	280425	F	08/09/2015
64	437	INCMNSZ	280425	F	08/09/2015
65	440	INCMNSZ	264458	F	12/09/2015
66	452	INCMNSZ	281411	M	20/10/2015
67	453	INCMNSZ	281411	M	20/10/2015
68	454	INCMNSZ	281411	M	20/10/2015
69	455	INCMNSZ	281411	M	20/10/2015
70	458	INCMNSZ	206011	F	28/10/2015
71	459	INCMNSZ	206011	F	28/10/2015
72	461	INCAN	77450589	M	19/11/2015
73	468	INCMNSZ	282372	M	28/12/2015
74	469	INCMNSZ	282372	M	28/12/2015
75	475	INCAN	77451627	M	08/01/2016
76	483	INCMNSZ	61094	F	20/02/2016
77	484	INCMNSZ	61094	F	26/02/2016
78	486	INCMNSZ	135705	M	19/05/2016
79	504	INCMNSZ	61094	F	26/02/2016
80	505	INCMNSZ	61094	F	20/02/2016
81	506	INCMNSZ	61094	F	20/02/2016
82	507	INCMNSZ	61094	F	17/02/2016
83	508	INCMNSZ	61094	F	17/02/2016
84	509	INCMNSZ	61094	F	17/02/2016
85	510	INCMNSZ	61094	F	17/02/2016
86	511	INCMNSZ	281083	M	01/06/2016
87	512	INCMNSZ	281083	M	03/06/2016
88	513	INCAN	77454775	F	07/06/2016
89	514	INCMNSZ	170402	F	12/06/2016
90	515	INCMNSZ	170402	F	12/06/2016
91	517	INCMNSZ	135705	M	19/05/2016
92	524	INCAN	77456051	M	08/08/2016
93	535	INCAN	77456666	F	14/09/2016
94	541	INCMNSZ	281083	M	01/06/2016
95	542	INCMNSZ	281083	M	03/06/2016
96	551	INCMNSZ	281083	M	01/06/2016
97	554	INCMNSZ	285788	M	20/10/2016
98	555	INCMNSZ	285788	M	20/10/2016
99	556	INCMNSZ	285435	M	24/10/2016
100	570	INCMNSZ	193944	M	24/12/2016
101	571	INCMNSZ	193944	M	24/12/2016
102	572	INCMNSZ	272782	F	27/12/2016
103	589	INCAN	77459139	M	15/02/2017
104	591	INCMNSZ	287560	M	24/02/2017

	AN No.	Procedencia	No. Paciente	Género	Fecha
105	592	INCMNSZ	287560	M	24/02/2017
106	595	INCAN	77459956	M	29/03/2017
107	603	INCMNSZ	258706	M	17/04/2017
108	619	INCMNSZ	193944	M	24/12/2016
<i>Candida parapsilosis</i>					
109	428	INCMNSZ	279653	F	15/08/2015
110	444	INCAN	77449209	F	29/09/2015
111	462	INCMNSZ	267699	F	20/11/2015
112	463	INCMNSZ	267699	F	20/11/2015
113	464	INCMNSZ	190412	M	26/11/2015
114	465	INCMNSZ	190412	M	03/12/2015
115	478	INCMNSZ	190412	M	03/12/2015
116	482	INCMNSZ	190412	M	08/02/2016
117	495	INCMNSZ	162936	M	26/03/2016
118	500	INCAN	77452981	F	04/03/2016
119	520	INCAN	77455789	F	25/07/2016
120	533	INCMNSZ	286202	M	08/09/2016
121	576	INCAN	77458583	F	10/01/2017
122	578	INCMNSZ	284664	M	30/01/2017
123	594	INCAN	77459508	M	06/03/2017
124	604	INCAN	77460435	M	28/04/2017
<i>Candida tropicalis</i>					
125	429	INCAN	77447023	M	18/08/2015
126	431	INCMNSZ	280556	M	26/08/2015
127	432	INCMNSZ	280556	M	26/08/2015
128	433	INCMNSZ	280556	M	26/08/2015
129	435	INCMNSZ	278598	F	02/09/2015
130	439	INCAN	77448316	F	10/09/2015
131	441	INCAN	77448601	F	15/09/2015
132	442	INCMNSZ	272456	M	23/09/2015
133	443	INCMNSZ	272456	M	23/09/2015
134	445	INCMNSZ	272456	M	03/10/2015
135	446	INCMNSZ	272456	M	03/10/2015
136	450	INCMNSZ	272456	M	08/10/2015
137	451	INCMNSZ	272456	M	08/10/2015
138	466	INCAN	77451441	F	18/12/2015
139	467	INCMNSZ	276023	F	27/12/2015
140	474	INCAN	77451626	F	08/01/2016
141	477	INCMNSZ	278598	F	02/09/2015
142	487	INCMNSZ	283147	F	20/05/2016
143	488	INCMNSZ	283147	F	18/05/2016
144	501	INCMNSZ	283151	F	28/02/2016
145	502	INCMNSZ	283151	F	28/02/2016
146	503	INCMNSZ	283151	F	28/02/2016
147	516	INCMNSZ	284073	M	25/06/2016
148	518	INCMNSZ	283147	F	20/05/2016
149	519	INCMNSZ	284073	M	24/06/2016
150	522	INCMNSZ	282975	M	02/08/2016
151	523	INCMNSZ	282975	M	02/08/2016
152	526	INCMNSZ	283147	F	20/05/2016
153	532	INCMNSZ	267699	F	06/09/2016
154	538	INCAN	77457057	M	07/10/2016
155	539	INCMNSZ	286600	M	08/10/2016

	AN No.	Procedencia	No. Paciente	Género	Fecha
156	540	INCMNSZ	286600	M	08/10/2016
157	545	INCMNSZ	282975	M	Desconocido
158	546	INCMNSZ	282975	M	Desconocido
159	547	INCMNSZ	282975	M	Desconocido
160	548	INCMNSZ	284073	M	Desconocido
161	549	INCMNSZ	284073	M	Desconocido
162	553	INCMNSZ	286600	M	16/10/2016
163	577	INCAN	77455970	M	18/01/2017
164	606	INCMNSZ	289669	M	07/05/2017
165	607	INCMNSZ	289669	M	07/05/2017
166	611	INCMNSZ	267699	F	20/05/2017
167	612	INCMNSZ	267699	F	20/05/2017
168	613	INCMNSZ	267699	F	20/05/2017
169	620	INCMNSZ	2896669	M	07/05/2017
<i>Candida guilliermondii</i>					
170	601	INCMNSZ	166865	M	31/03/2017
<i>Candida kefyr</i>					
171	580	INCMNSZ	267025	M	02/02/2017
172	581	INCMNSZ	267025	M	02/02/2017
173	582	INCMNSZ	267025	M	02/02/2017
174	583	INCMNSZ	267025	M	02/02/2017
175	584	INCMNSZ	267025	M	02/02/2017
<i>Candida intermedia</i>					
176	579	INCMNSZ	284664	M	30/01/2017
<i>Candida spp.</i>					
177	499	INCAN	77451917	M	04/03/2016
<i>Candida dubliniensis</i>					
178	447	INCMNSZ	272160	F	22/09/2015
179	448	INCMNSZ	272160	F	22/09/2015
180	449	INCMNSZ	272160	F	22/09/2015
<i>Candida lusitaniae</i>					
181	342	INCMNSZ	Desconocido	Desconocido	17/02/2015
<i>Candida krusei</i>					
182	480	INCMNSZ	268867	F	12/05/2016
183	481	INCMNSZ	268867	F	12/05/2016
184	485	INCMNSZ	268867	F	12/05/2016
185	489	INCMNSZ	268867	F	12/05/2016
186	493	INCMNSZ	268867	F	05/05/2016
187	561	INCMNSZ	271485	F	03/11/2016
188	597	INCMNSZ	289145	M	19/04/2017
189	598	INCMNSZ	289145	M	18/04/2017
190	599	INCMNSZ	289145	M	18/04/2017
191	600	INCMNSZ	289145	M	18/04/2017
192	616	INCMNSZ	271485	F	03/11/2016
193	617	INCMNSZ	271485	F	03/11/2016
194	618	INCMNSZ	271485	F	03/11/2016

*Los números con fondo rojo corresponden a aislados de los cuales nos proporcionaron el hemocultivo del que provienen.

Tabla 2. Aislados clínicos en los que el diagnóstico por Vitek-2® no concuerda con el diagnóstico molecular

Aislado clínico	Diagnóstico Vitek-2®	Diagnóstico API ID 32C	Diagnóstico molecular	Secuenciación
AN349	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
AN358	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-
AN578	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Sin detección	<i>C. orthopsilosis</i>

Tabla 3. Resultados del diagnóstico de las especies de *Candida* a partir de DNAG de hemocultivos, extraído con los métodos FastPrep, QIAGEN y Mo-Bio

Aislado clínico		Identificado por			Métodos de extracción de DNAG		
		Vitek-2®	API ID 32C	PCR (Aislado)	FP	Q	MB
1	AN342	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. pelliculosa</i>	ND	ND	ND	ND
2	AN349	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND	<i>C. albicans</i>
3	AN358	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	ND	ND
4	AN428	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	ND	ND
5	AN430	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND	<i>C. albicans</i>
6	AN431	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	ND	<i>C. tropicalis</i>
7	AN435	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	ND	<i>C. tropicalis</i>
8	AN436	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	ND	<i>C. glabrata</i>
9	AN440	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	ND	<i>C. glabrata</i>
10	AN442	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	ND	<i>C. tropicalis</i>
11	AN445	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	ND	<i>C. tropicalis</i>
12	AN446	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	ND	<i>C. tropicalis</i>

ND: No detectado.

Métodos de extracción. FP: FastPrep, Q: QIAGEN y MB: Mo-Bio.

Recuadro rojo señala aislados donde la especie reportada por el hospital no coincide con la detectada por el diagnóstico molecular.

Tabla 4. Resultados de diagnóstico a partir de hemocultivos mediante FastPrep

Aislado clínico	Identificado por			DNAg extraído a partir de hemocultivo
	Vitek-2®	API ID 32C	PCR (Aislado)	
AN447	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	ND	ND
AN448	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	ND	ND
AN552	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN453	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN454	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN455	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN456	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
AN457	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
AN459	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
AN460	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
AN462	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
AN463	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>

ND: No detectado.

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular en hemocultivos con FastPrep

<i>Diagnóstico con API ID 32 C</i>	<i>Diagnóstico molecular</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	21	0	21
Negativo	0	3	3
Total	21	3	24
VP= 21 VN= 3 FP= 0 FN= 0			
Sensibilidad = $VP / VP + FN$ Sensibilidad = $21 / 21 + 0 = 100\%$		Especificidad = $VN / FP + VN$ Especificidad = $3 / 3 + 0 = 100\%$	

VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos.

Tabla 6. Susceptibilidad a fluconazol de aislados clínicos de *C. glabrata* que proceden de muestras consecutivas de diferentes pacientes

Clúster	No. Paciente	No. aislado	Fecha	FLC (µg/mL)	Interpretación
I	Cg3 (4 aislados)	452	20/10/2015	16	RDD
		453	20/10/2015	16	RDD
		454	20/10/2015	16	RDD
		455	20/10/2015	16	RDD
	Cg4 (2 aislados)	458	28/10/2015	8	S
		459	28/10/2015	8	S
	Cg6 (8 aislados)	507	17/02/2016	4	S
		508	17/02/2016	4	S
		509	17/02/2016	4	S
		510	17/02/2016	4	S
483		20/02/2016	4	S	
505		20/02/2016	4	S	
506		20/02/2016	4	S	
504		26/02/2016	4	S	
Cg9 (2 aislados)	514	12/06/2016	32	RDD	
	515	12/06/2016	32	RDD	
Cg10 (2 aislados)	554	20/10/2016	16	RDD	
	555	20/10/2016	16	RDD	
Cg12 (2 aislados)	570	24/12/2016	8	S	
	571	24/12/2016	8	S	
II	CBS138 (referencia, cepa secuenciada)			64	R
	Cg5 (2 aislados)	468	28/12/2015	16	RDD
		469	28/12/2015	16	RDD
	Cg15 (1 aislado)	603	17/04/2017	4	S
Cg14 (2 aislados)	591	24/02/2017	8	S	
	592	24/02/2017	8	S	
III	Cg8 (5 aislados)	511	01/06/2016	16	RDD
		541	01/06/2016	16	RDD
		551	01/06/2016	16	RDD
		512	03/06/2016	16	RDD
		542	03/06/2016	32	RDD
	Cg1 (2 aislados)	436	08/09/2015	16	RDD
437		08/09/2015	16	RDD	
IV	Cg11 (1 aislado)	556	24/10/2016	64	R
	Cg13 (1 aislado)	572	27/12/2016	16	RDD
V	Cg7 (2 aislados)	486	19/05/2016	4	S
		517	19/05/2016	8	S
VI	Cg2 (1 aislado)	440	12/09/2015	16	RDD

Sensibilidad a Fluconazol (FLC) S: sensible (<8 µg/mL), RDD: resistente dosis-dependiente (16-32 µg/mL) y R: resistente (>64µg/mL).

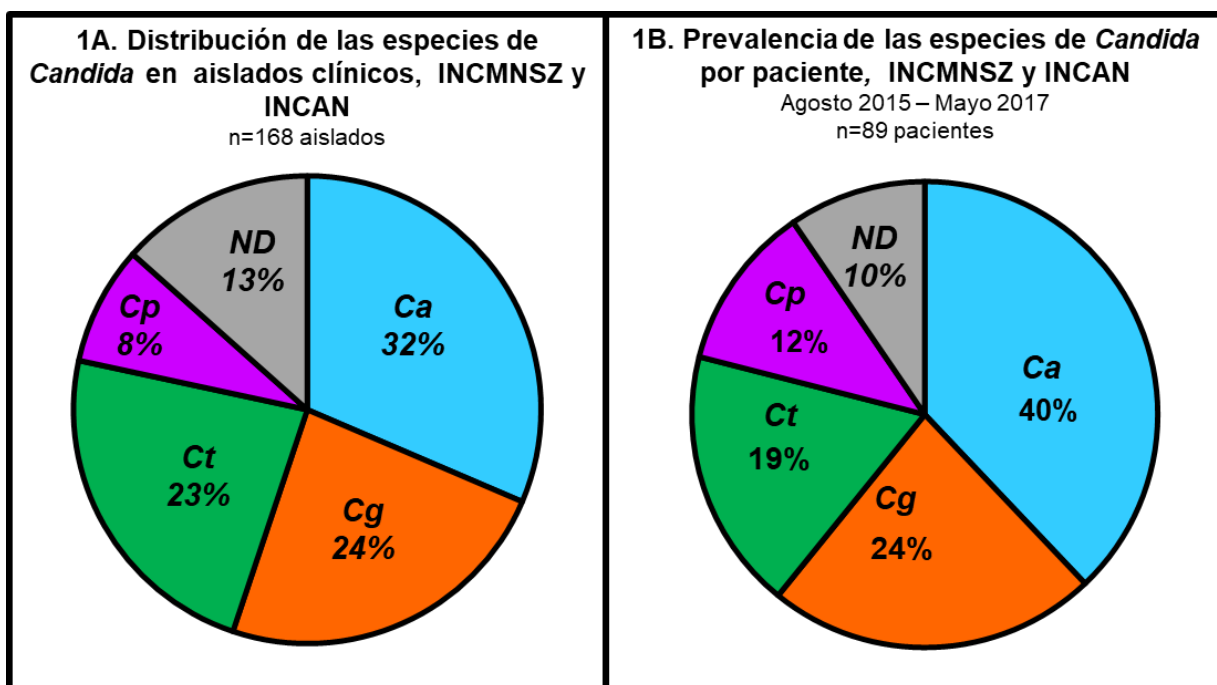


Figura 1. Distribución de las especies del género *Candida*

(A) Distribución de las especies de *Candida* detectadas a partir de aislados clínicos provenientes del INCMNSZ con los oligonucleótidos especie-específicos.

(B) Prevalencia de las especies de *Candida* detectadas expresado por paciente.

Ca: *C. albicans*, Ct: *C. tropicalis*, Cg: *C. glabrata*, Cp: *C. parapsilosis*, ND: No detectado.

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

INCAN: Instituto Nacional de Cancerología.

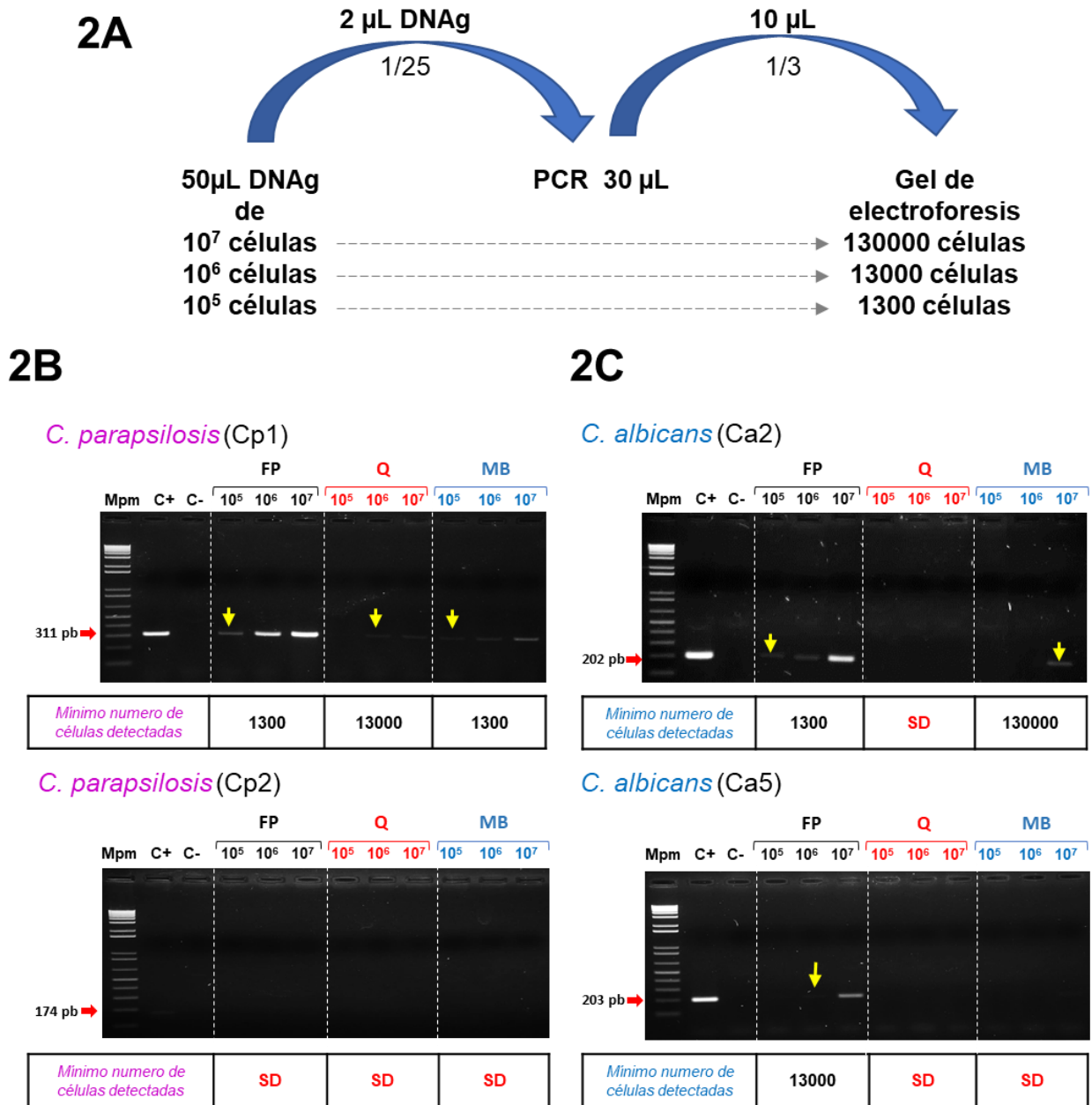
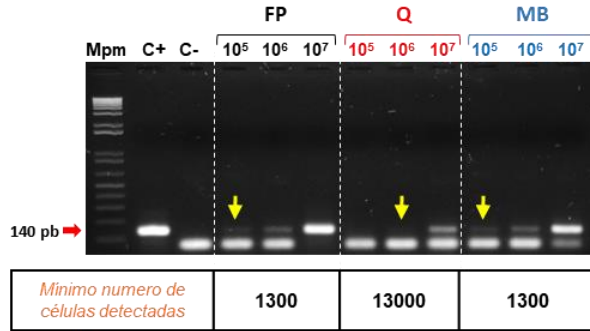


Figura 2. Detección de las especies del género *Candida* con DNAg extraído con FastPrep, Mo-Bio y QIAGEN

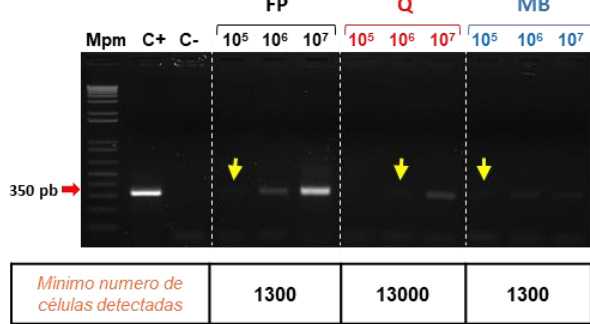
2A Diagrama que indica el número mínimo de células detectadas. Electroforesis en geles de agarosa al 2% donde se observa la presencia de los amplicones de *C. parapsilosis* **2B**, *C. albicans* **2C**, *C. glabrata* **2D** y *C. tropicalis* **2E** con cada par de oligonucleótidos y métodos de extracción. Las tablas indican la cantidad real de células detectadas. Las flechas amarillas indican el último carril donde se detecta señal positiva para cada par de oligonucleótidos.

2D

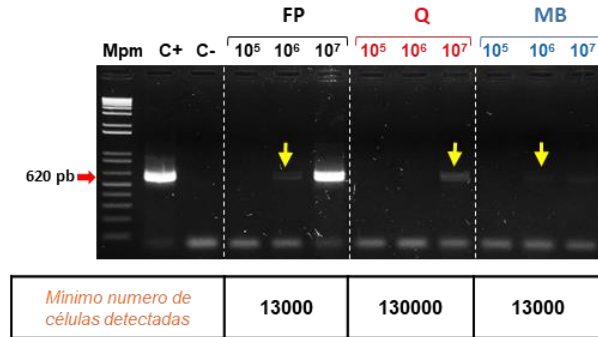
C. glabrata (Cg1)



C. glabrata (Cg2)

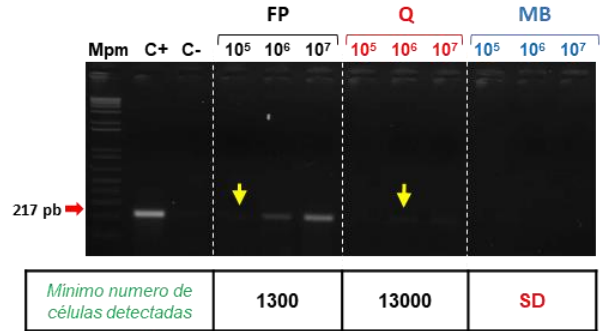


C. glabrata (Cg3)

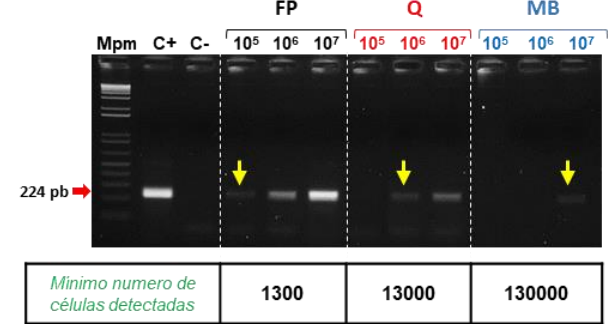


2E

C. tropicalis (Ct1)



C. tropicalis (Ct3)



C. tropicalis (Ct5)

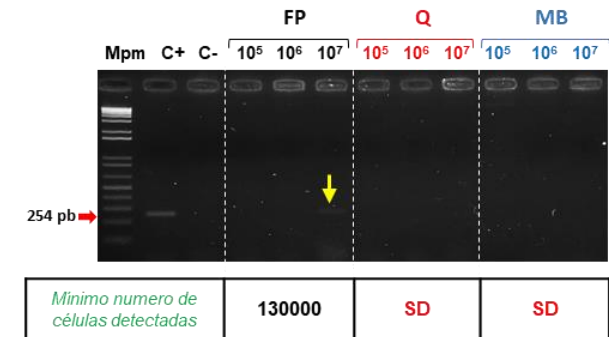


Figura 3. (concluye)

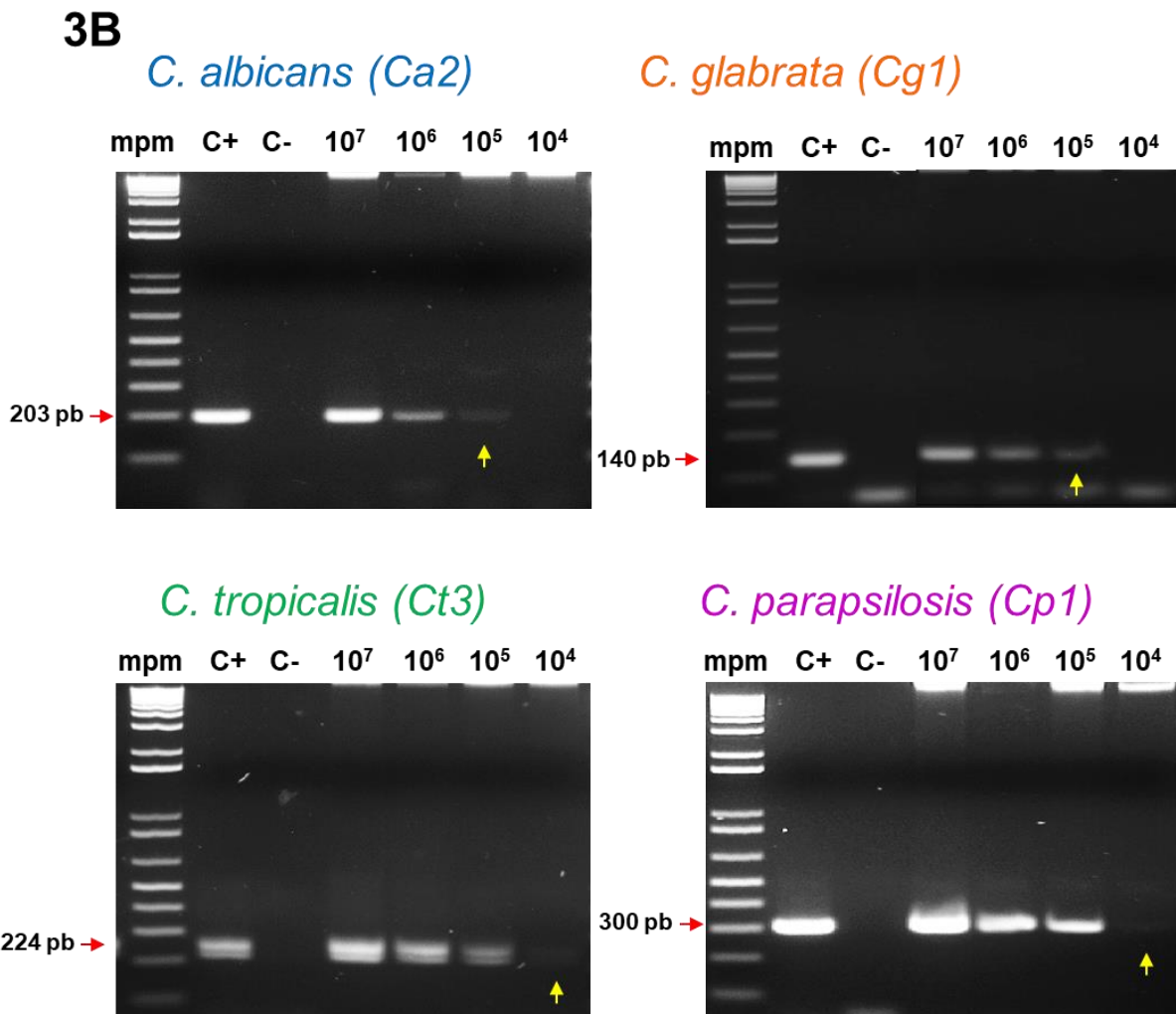
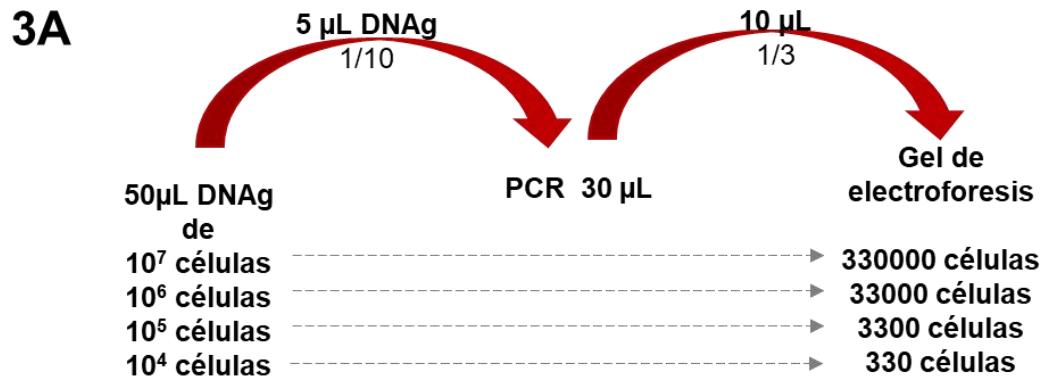


Figura 4. Límite de detección de células de *Candida* a partir de sangre

3A Diagrama que indica la cantidad mínima de células detectadas en sangre, **3B** Electroforesis en geles de agarosa al 2% donde se observa la presencia de los amplicones de cada especie. Las flechas amarillas indican el último carril donde se detecta señal positiva para cada par de oligonucleótidos.

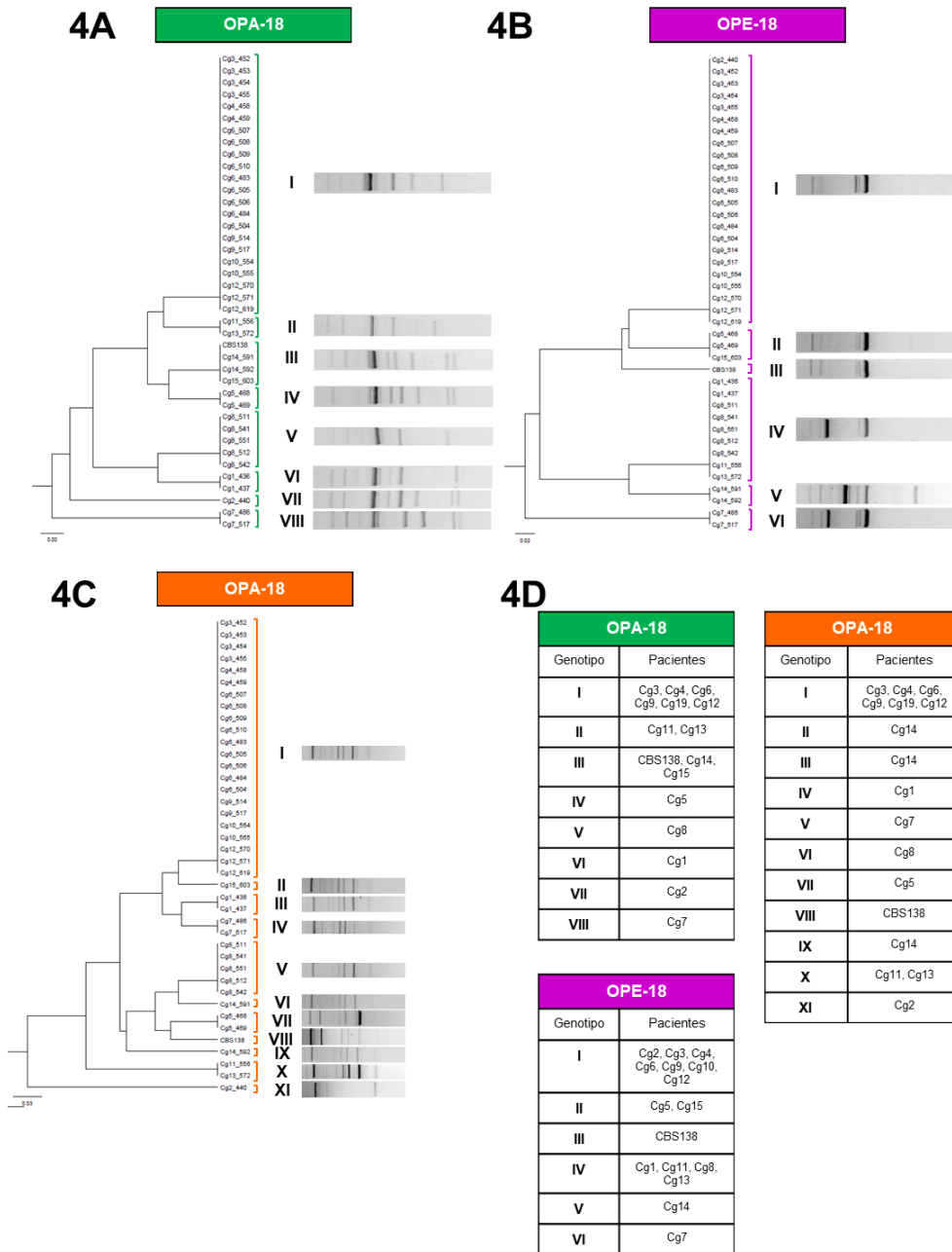


Figura 5. Dendrogramas y perfiles RAPD-PCR de aislados de *C. glabrata*

Dendrogramas generados por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages), utilizando el coeficiente de similitud de RAPD con los marcadores *OPA-18*, *OPE-18* y *OPA-09* en aislados *C. glabrata* provenientes de diferentes pacientes (Tabla 6). **4A** Dendrograma con *OPA-18*, ocho genotipos. **4B** Dendrograma con *OPE-18*, seis genotipos. **4C** Dendrograma con *OPA-09*, once genotipos. **4D** Tablas resumen de pacientes y genotipos obtenidos con cada marcador. Nótese que todos los aislados correspondientes al mismo paciente mostraron el mismo genotipo y correlación entre pacientes empleando diferentes marcadores.

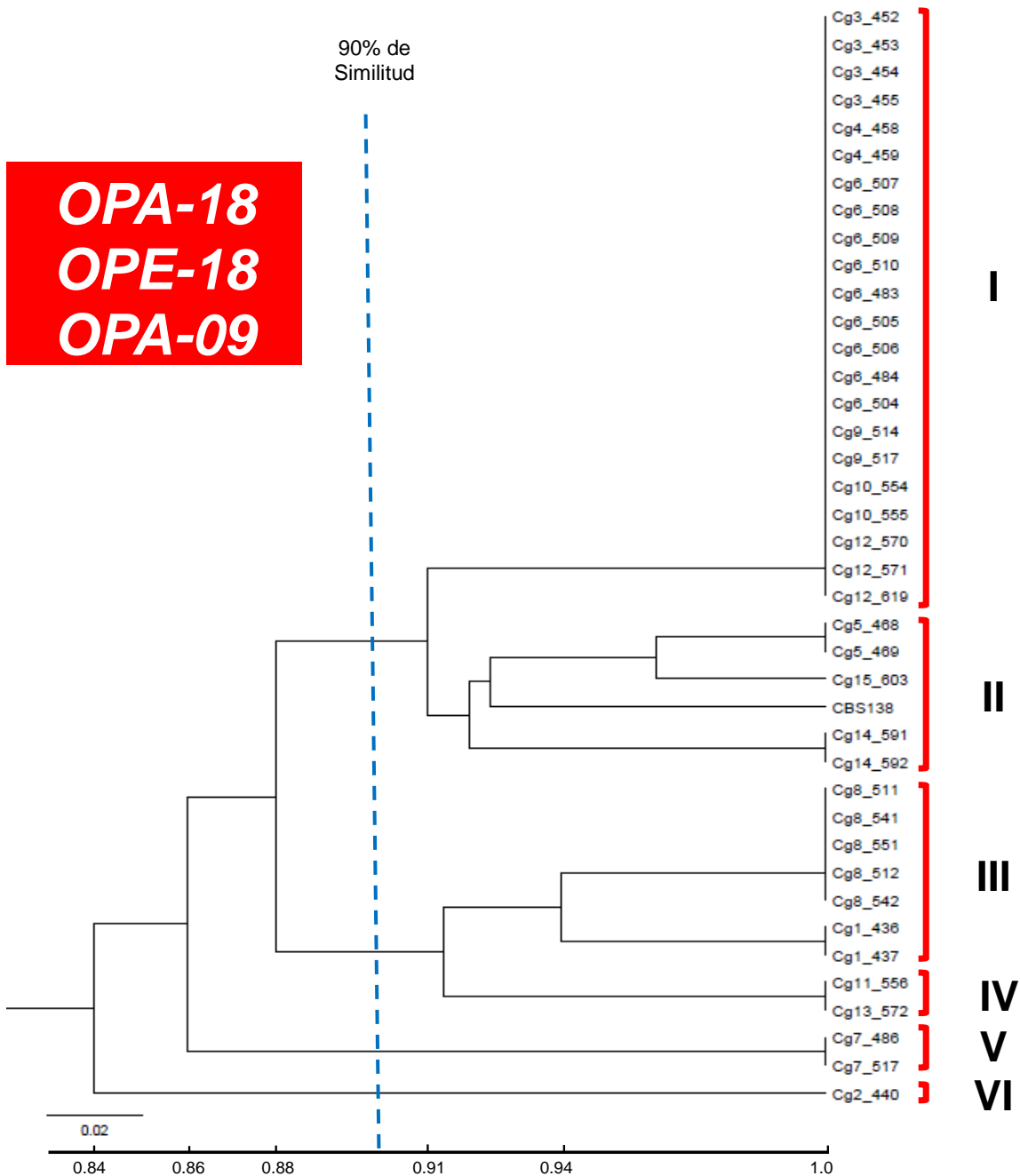
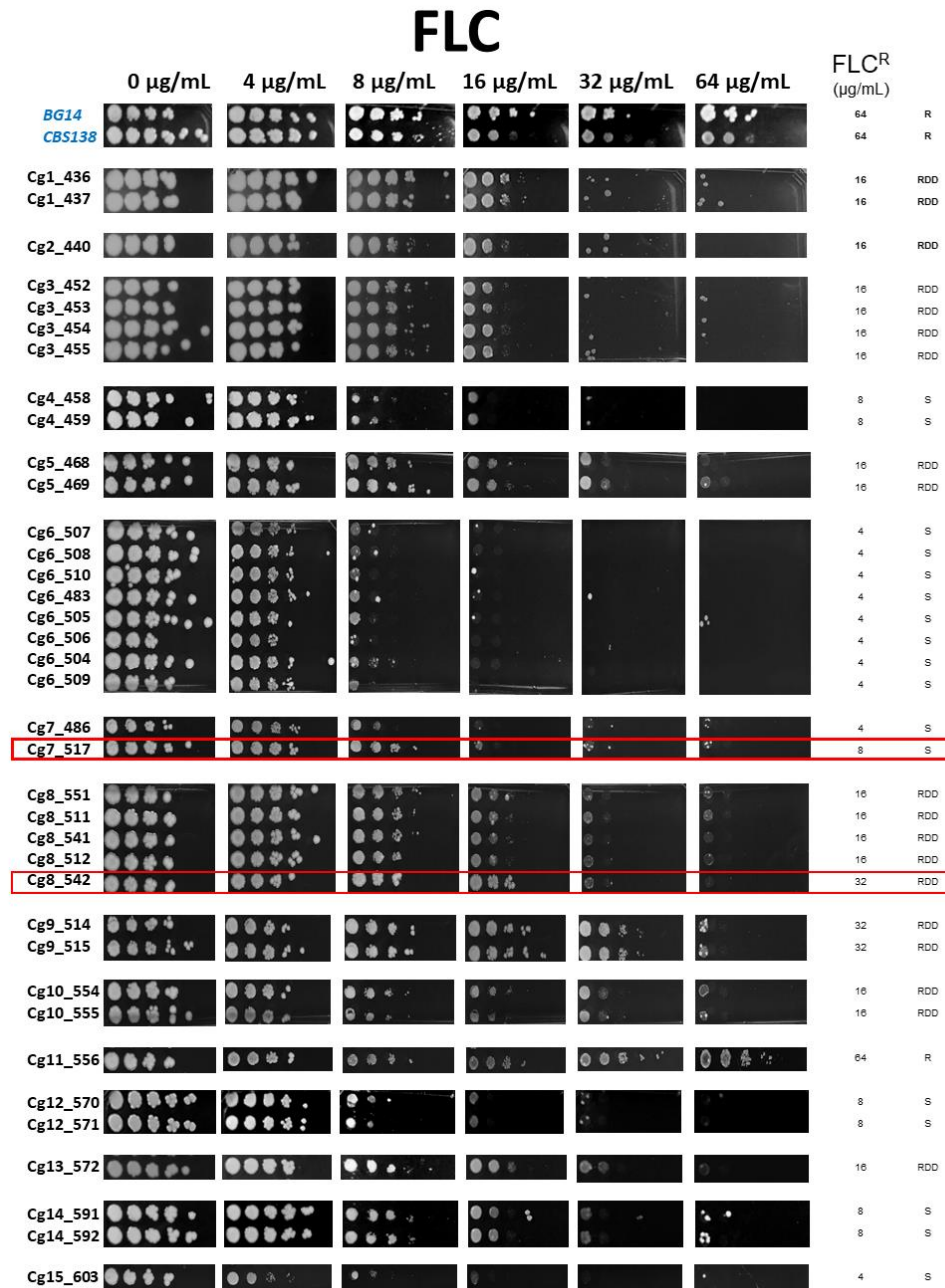


Figura 6. Dendrograma de aislados de *C. glabrata* usando el coeficiente de similitud con OPA-18, OPE-18 y OPA-09

Dendrograma generado por el método UPGMA, utilizando el coeficiente de similitud de RAPD-PCR obtenido con los marcadores OPA-09, OPA-18 Y OPE-18 en aislados de *C. glabrata*.



Sensibilidad a Fluconazol (FLC) S: sensible (<8 µg/mL), RDD: resistente dosis-dependiente (16-32 µg/mL) y R: resistente(>64µg/mL)

Figura 7. Ensayo de sensibilidad a fluconazol en aislados clínicos de *C. glabrata*

Ensayo fenotípico de sensibilidad a FLC en aislados de *C. glabrata* provenientes de diferentes pacientes (Tabla 6). Se observan diluciones logarítmicas en cajas de YPD con diferentes concentraciones de FLC (4, 8, 16, 32, 64 µg/mL) e incubadas a 30°C durante 48 h. FLC^S=17 aislados, FLC^{RDD}=19 aislados, FLC^R=1 aislado. Recuadro rojo indica aislados que se muestran más resistentes al paso del tiempo (*Cg7-517* y *Cg8-542*).

Tabla S 1. Condiciones de PCR utilizadas en el diagnóstico de las especies de *Candida*

	<i>C. glabrata</i>			<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>			<i>C. parapsilosis</i>	
	Cg1	Cg2	Cg3	Ca2	Ca5	Ct1	Ct3	Ct5	Cp1	Cp2
Temperatura de desnaturalización	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
Temperatura de alineación	59°C	67.1°C	63.4°C	61.8°C	63.5°C	64.4 °C	60.1°C	65.5°C	62°C	68.4°C
Temperatura de Extensión	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
Numero de ciclos	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Tamaño del producto	136 y 140 pb	327, 348 y 363 pb	601 y 664 pb	202 pb	203 pb	217 pb	224 pb	254 pb	311 pb	174 pb

Tabla S 2. Número de colonias de levaduras viables en hemocultivos

Hemocultivo	Especie	UFC/mL*
AN470	<i>C. albicans</i>	430 000
AN471	<i>C. albicans</i>	4 900 000
AN473	<i>C. albicans</i>	2 900 000
AN472	<i>C. albicans</i>	1 720 000
AN468	<i>C. glabrata</i>	2 300 000
AN469	<i>C. glabrata</i>	5 800 000
AN464	<i>C. parapsilosis</i>	1 400 000
AN465	<i>C. parapsilosis</i>	7 900 000
AN433	<i>C. tropicalis</i>	860 000
AN443	<i>C. tropicalis</i>	1 500 000
AN467	<i>C. tropicalis</i>	3 300 000

*UFC/mL Unidades formadoras de colonia por mililitro.

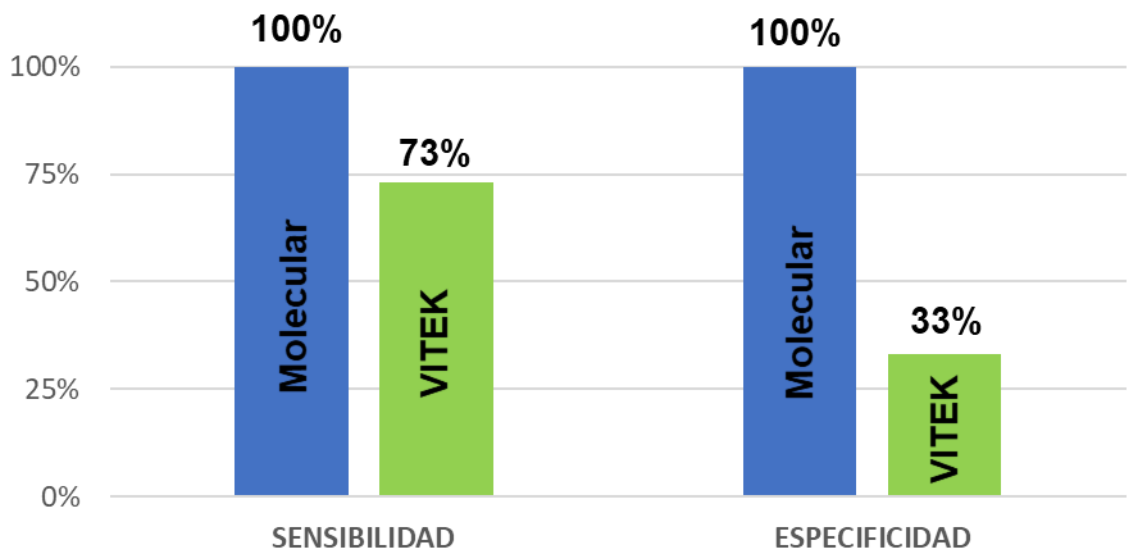
Tabla S 3. Diagnósticos de Vitek-2® discordantes de los de PCR y API ID32C correspondientes a toda la colección de aislados del laboratorio

	Aislado clínico	Diagnóstico Vitek-2®	Diagnóstico API ID 32C	Diagnóstico molecular	Secuenciación
1	AN7	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-
2	AN13	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-
3	AN27	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	ND	<i>C. metapsilosis</i>
4	AN30	<i>C. krusei</i>	<i>G. capitatum</i>	ND	-
5	AN33	<i>C. tropicalis</i>	<i>G. capitatum</i>	ND	-
6	AN35	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
7	AN41	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	ND	-
8	AN43	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-
9	AN47	<i>C. albicans</i>	<i>T. asahii</i>	ND	-
10	AN52	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-
11	AN87	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
12	AN100	<i>Candida spp.</i>	<i>G. capitatum</i>	ND	-
13	AN102	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	ND	-
14	AN112	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-
15	AN117	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-
16	AN122	<i>C. tropicalis</i>	<i>T. asahii</i>	ND	-
17	AN127	<i>C. famata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	ND	-
18	AN176	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-
19	AN185	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	ND	-
20	AN195	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-
21	AN214	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
22	AN216	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
23	AN220	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
24	AN225	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-
25	AN230	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-
26	AN349	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-
27	AN358	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-
28	AN578	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	ND	<i>C. orthopsilosis</i>

ND: No detectado.

Tabla S 4. Métodos para la identificación de las especies de *Candida*

	Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tiempo requerido	Referencia
Convencionales	Cromógenos	49.6 - 100	70 - 80	24 – 72 h	(Willinger, Hillowoth et al. 2001) (Cortes-Figueroa, Aguilar-Santana et al. 2010)
	Tubo germinal	87.1	100	~3 h	(Sheppard, Locas et al. 2008)
	Bioquímicos	75.2	-	24 – 48 h	(Fricker-Hidalgo, Vandapel et al. 1996)
Serológicos	(1-3)- β -D-gucano	47 - 88	44 - 100	1 h	(Colombo, Cortes et al. 2013) (Alam, Mustafa et al. 2007) (Held, Kohlberger et al. 2013)
	Manano	40 - 70	100	~3 h	(Alam, Mustafa et al. 2007) (Held, Kohlberger et al. 2013)
Moleculares	PCR en tiempo real	75 - 100	98.4	9 h	(Fricke, Fricke et al. 2010) (Guo, Yang et al. 2016)
	PCR semianidada	70 - 88	99	9- 10 h	(Ahmad, Khan et al. 2002) (Alam, Mustafa et al. 2007) (Ospina and Cortes 2011)
	PCR punto final	100	100	4 h	Este trabajo



		Diagnóstico Molecular Molecular n=122		Vitek n=122	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
API ID 32 C	Positivo	96	0	89	32
	Negativo	0	26	29	1
	Total	96	26	118	33
Sensibilidad(S) = $VP / VP + FN$		VP= 96	VN= 26	VP= 89	VN= 1
Especificidad(E) = $VN / VN + FP$		FP= 0	FN= 0	FP= 29	FN= 32
		S= $96 / 96 + 0 = 100\%$		S= $89 / 89 + 32 = 73.5\%$	
		E= $26 / 26 + 0 = 100\%$		E= $1 / 1 + 29 = 33.3\%$	

Figura S 1. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular y por Vitek-2® de 122 aislados clínicos, comparada con el estándar de oro API ID32C

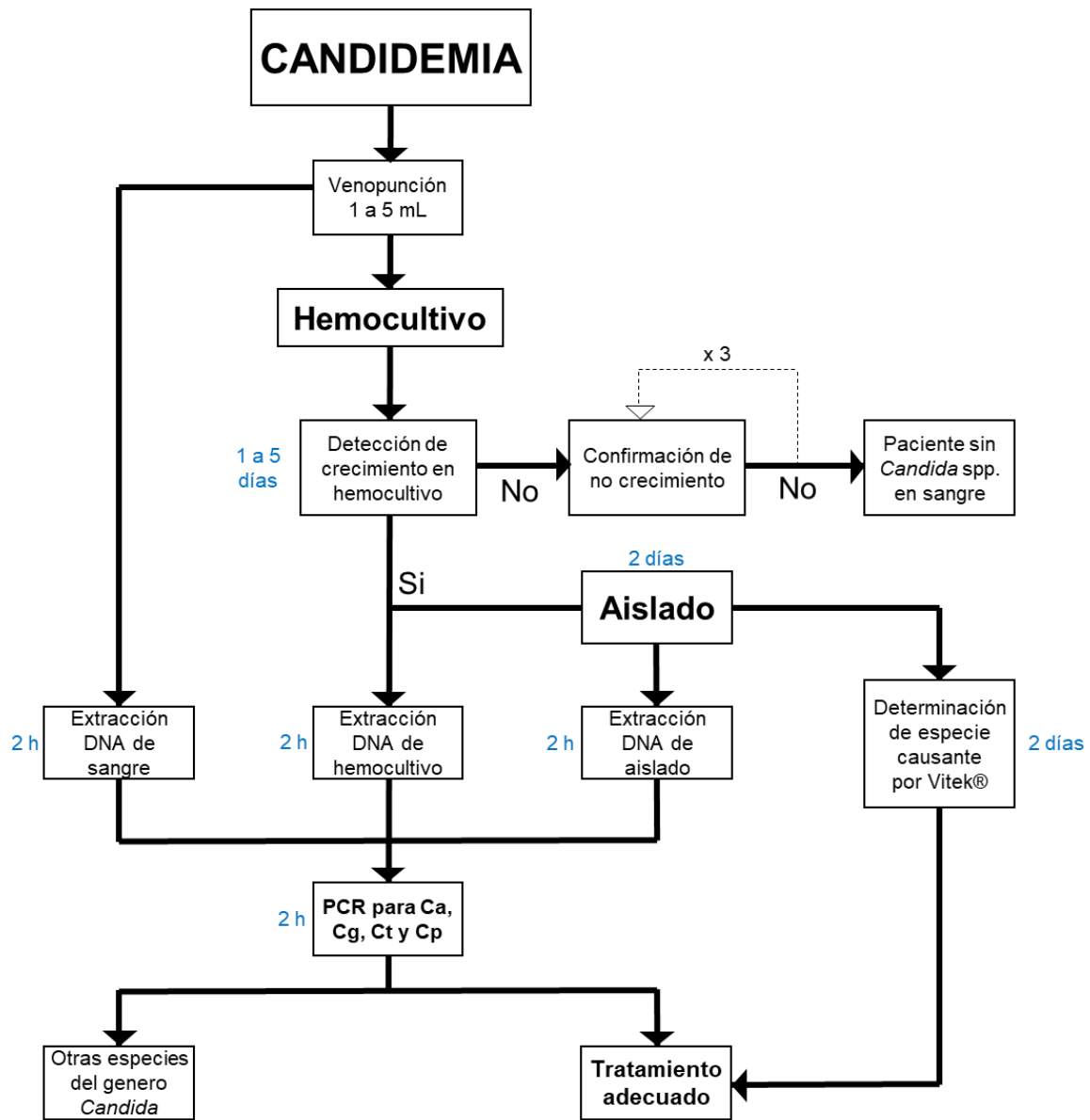


Figura S 2. Algoritmo para determinar la especie causante de candidemia

Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata*, Cp: *C. parapsilosis* y Ct: *C. tropicalis*