



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

### **“Identificación molecular de las especies más frecuentes causantes de candidosis sistémica”**

Tesis que presenta:

**QBP José Luis Camacho Cardoso**

para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias Químico-biológicas**

Directores: Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera  
Dra. Francisca Hernández Hernández

México, D. F. 2008

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM y en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, bajo la dirección de la Dra. Francisca Hernández Hernández y de la Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera.

Este trabajo se llevó a cabo con apoyo del programa PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, dentro del proyecto “Diagnóstico molecular de las micosis causantes de mortalidad en México” con clave IN224006.

## i. ÍNDICE GENERAL

i. ÍNDICE GENERAL.....	i
ii. ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
iii. ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
iv. ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	iv
v. RESUMEN.....	v
vi. ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. OBJETIVOS.....	20
V. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
VII. RESULTADOS.....	30
VIII. DISCUSIÓN.....	50
IX. CONCLUSIONES.....	64
X. PERSPECTIVAS.....	65
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	66
XII. APÉNDICE I.....	76
XII. APÉNDICE II.....	79

## ii. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Electroferograma del DNA total de <i>C. albicans</i> .....	30
<b>Figura 2.</b> Electroferograma del DNA total de diferentes levaduras.....	30
<b>Figura 3.</b> Amplicones de los ITS1 e ITS2 utilizando 100, 10 y 1 ng de DNA total.....	31
<b>Figura 4.</b> Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> en aislados clínicos.....	32
<b>Figura 5.</b> Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. tropicalis</i> en aislados clínicos.....	32
<b>Figura 6.</b> Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> en cepas de diferentes levaduras.....	33
<b>Figura 7</b> Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i> en cepas de diferentes levaduras.....	33
<b>Figura 8.</b> Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> .....	34
<b>Figura 9.</b> Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. tropicalis</i> .....	34
<b>Figura 10.</b> Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> en muestras de sangre con diferente número de levaduras.....	35
<b>Figura 11.</b> Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> en muestras de sangre con cien levaduras.....	36
<b>Figura 12.</b> Amplificación de los ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> en muestras clínicas.....	42
<b>Figura 13.</b> Amplificación de los ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> en muestras clínicas.....	42
<b>Figura 14.</b> Amplificación de los ITS1 e ITS2 de <i>C. tropicalis</i> en muestras clínicas.....	43
<b>Figura 15.</b> Amplificación de los ITS1 e ITS2 de <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> en muestras clínicas.....	45
<b>Figura 16.</b> Amplificación de los ITS1 e ITS4 universales para hongos en muestras clínicas.....	47
<b>Figura 17.</b> Amplificación de los ITS1 e ITS4 universales para hongos en muestras clínicas.....	47

### iii. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Métodos de amplificación reportados por algunos autores para la identificación de <i>Candida</i> sp.....	16
<b>Tabla 2.</b> Iniciadores reportados para amplificar el ITS1 e ITS2 de especies de <i>Candida</i> .....	25
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para la amplificación del ITS1 e ITS2 de especies de <i>Candida</i> .....	25
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de PCR.....	26
<b>Tabla 5.</b> Iniciadores reportados para amplificar el ITS1 e ITS4 universales para hongos.....	29
<b>Tabla 6.</b> Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de líquidos de lavado bronquial.....	37
<b>Tabla 7.</b> Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de esputo .....	39
<b>Tabla 8.</b> Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de sangre.....	40
<b>Tabla 9.</b> Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de orina, líquido de vesícula, ganglio y líquido pleural.....	41
<b>Tabla 10.</b> Correlación de la identificación de mezcla de especies por cultivo y PCR en muestras clínicas.....	46
<b>Tabla 11.</b> Correlación entre la amplificación de los ITS1 e ITS2 e ITS1 e ITS4 y cultivo en muestras clínicas.....	48

## iv. ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Especies de <i>Candida</i> detectadas por amplificación del ITS1 e ITS2 en muestras de líquidos de lavado bronquial (n=20).....	38
<b>Gráfica 2.</b> Especies de <i>Candida</i> detectadas por amplificación del ITS1 e ITS2 en muestras de esputo (n=15).....	40
<b>Gráfica 3.</b> Correlación entre PCR positivos con los ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> y cultivo en muestras clínicas (n=34).....	43
<b>Gráfica 4.</b> Correlación entre PCR positivos con los ITS1 e ITS2 de <i>C. tropicalis</i> y cultivo en muestras clínicas (n=14).....	44
<b>Gráfica 5.</b> Correlación entre PCR positivos con los ITS1 e ITS2 de <i>C. glabrata</i> y cultivo en muestras clínicas (n=11).....	45
<b>Gráfica 6.</b> Correlación general de la amplificación del ITS1 e ITS2 de especies de <i>Candida</i> y el cultivo de muestras clínicas (n=81).....	48
<b>Gráfica 7.</b> Especies de <i>Candida</i> detectadas por la amplificación del ITS1 e ITS2 en muestras clínicas (n=42).....	49

## v. RESUMEN

La candidosis sistémica es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Por lo tanto la detección e identificación rápida y certera de especies de *Candida* es esencial para el tratamiento de los pacientes afectados. Los procedimientos tradicionales de diagnóstico como el cultivo y las pruebas bioquímicas consumen tiempo y son muy limitadas en su sensibilidad y especificidad. En este trabajo se establecieron las condiciones de PCR utilizando iniciadores especie-específicos que amplifican una parte de ITS1 e ITS2 generando fragmentos de tamaño diferente para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, especies que se observan con mayor frecuencia en pacientes con candidosis. Se utilizaron también iniciadores universales que amplifican parte del DNA ribosomal 5.8S. El rango de sensibilidad de la PCR para los cuatro iniciadores fue de 1 a 10 pg de DNA (equivalente a 27 y 270 levaduras respectivamente) total obtenido de cepas tipo y aislados clínicos. La especificidad de la técnica para la identificación de especies de *Candida* comparada con levaduras de diferentes géneros fue de 100%. La sensibilidad de la PCR con muestras de sangre inoculadas con levaduras de las cuatro especies de *Candida* fue de 100 levaduras. Para conocer la aplicabilidad de la técnica de PCR en muestras clínicas, se utilizó un total de 81 productos biológicos de pacientes inmunocomprometidos: lavados bronquiales ( $n=25$ ), esputo ( $n=15$ ), sangre ( $n=19$ ), líquido pleural ( $n=7$ ), orina ( $n=2$ ), LCR ( $n=2$ ), líquido peritoneal ( $n=5$ ), líquidos de vesícula ( $n=1$ ), secreción ( $n=1$ ), médula ósea ( $n=1$ ), cánula traqueal ( $n=1$ ), ganglio ( $n=1$ ) y líquido ( $n=1$ ). La identificación molecular se correlacionó con el cultivo en agar dextrosa Sabouraud y en CHROMagar *Candida*. Las especies de *Candida* presentes en las muestras clínicas fueron detectadas por PCR en el 52% y por cultivo en el 37%. De las muestras positivas por PCR, sólo el 69% fueron positivas por cultivo. De las muestras de lavado bronquial positivas por PCR, el 65% fue positivo por cultivo; mientras que las 3 muestras de sangre, una de líquido pleural y una de ganglio que fueron positivas por PCR, las cinco fueron negativas por cultivo. De todas las muestras negativas por PCR, sólo una fue positiva por cultivo. *C. albicans* fue detectada en el 81% de las muestras clínicas, seguida de *C. tropicalis* (33%), *C. glabrata* (26%) y *C. parapsilosis* (5%). Del total de muestras clínicas positivas por PCR, en el 64% se detectó una sola especie y en el 36% se detectaron 2 ó 3 especies. De las muestras en que se detectaron dos especies (73%), en la mayoría (82%) el cultivo fue positivo, pero solo para una especie. De las muestras en que se detectaron 3 especies por PCR (27%), la mayoría (75%) fueron positivas por cultivo, pero solo se detectaron 2 especies. De las muestras positivas por PCR con iniciadores especie-específicos, el 83% fueron positivas con los iniciadores universales. Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la PCR es una alternativa rápida, confiable, específica y sensible para detectar e identificar las especies de *Candida* en las muestras clínicas de los pacientes de alto riesgo con sospecha de portar una candidosis sistémica

Systemic candidiasis is one of the most frequent causes of morbidity and mortality in immunosuppressed patients. Therefore, the rapid and accurate detection and identification of involved *Candida* species is essential for patient antifungal treatment. The traditional diagnosis procedures as the culture and physiological tests are time-consuming and their sensitivity and specificity are limited. In the present work the PCR conditions were established using species-specific primers which amplify a region of ITS1 and ITS2 producing different size fragments for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, species observed with highest frequency in patients candidosis. Universal primers which amplify a 5.8S rDNA were also used. The four primers's sensitivity range was between 1 and 10 pg of genomic DNA (equivalent to 27 and 270 yeasts respectively) obtained from type strains and clinical isolates. The technique specificity for *Candida* species identification compared with other genus yeasts was 100%. The PCR sensitivity with blood specimens inoculated with four *Candida* species was 100 yeasts. In order to know the PCR technique efficiency in clinical specimens, a total of 81 biological samples from immunosuppressed patients were included: bronchial liquid (n=25), sputum (n=17), peritoneal liquid (n=5), gall bladder liquid (n=1), secretion (n=1), bone marrow (n=1), tracheal cannula (n=1), lymph node (n=1), non specific liquid (n=1). Molecular identification was correlated with culture on Sabouraud dextrose agar and CHROMagar *Candida*. *Candida* species were detected by PCR in 52% of total specimens and by culture in 37%. Out of PCR-positive specimens, only 69% were positive by culture. From PCR-positive bronchial liquids, 65% was positive by culture, whereas the 3 blood specimens, each of pleural liquid and lymph node which were PCR-positive, all five were culture-negatives. Out of PCR-negatives specimens, only one was culture-positive. *C. albicans* was identified in 81% of clinical specimens followed by *C. tropicalis* (33%), *C. glabrata* (26%) and *C. parapsilosis* (5%). From all PCR-positive clinical specimens, in 64% one species and in 36% two or three species were detected. From specimens where two species were detected (73%), the most (82%) was culture-positive but only for one species. From specimens where three species were detected, the most (75%) were culture-positive, but only for two species. Of all PCR-positive specimens (using species-specific primers), 83% was positive with the universal fungal primers; however. Results obtained in this work demonstrate that PCR is a rapid, reliable, specific and sensitive alternative to detect and identify the *Candida* species in clinical specimens in high risk suspected of having a systemic candidosis.



## I. 1. Candidosis

La candidosis es una micosis de expresión clínica variable causada por hongos oportunistas del género *Candida*. Considerando el sitio afectado, la infección puede ser localizada, superficial, profunda y/o sistémica. Desde el punto de vista del tiempo de evolución, puede ser aguda o crónica. Es la principal micosis, cuya frecuencia ha aumentado en las dos últimas décadas, debido al incremento de factores de riesgo. Es una de las enfermedades más frecuentes y polimórficas. En general, la candidosis afecta a todos los grupos de edad, sexo, raza y ocupación (Bonifaz, 1994; López y col., 1995; Luo y Mitchell, 2002; Arenas, 2008). Estas infecciones son causa significativa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Linton y col., 2007).

La candidemia y la candidosis invasiva son una de las causas más frecuentes de infección nosocomial ligada a un gran número de factores de riesgo (Armstrong-James, 2007).

Los factores predisponentes pueden ser:

- Enfermedades debilitantes: diabetes mellitus, SIDA, neutropenia, neoplasia, deficiencias inmunitarias, infecciones, entre otras.
- Procedimientos terapéuticos: radiaciones, instalación de catéteres venosos, urinarios, válvulas cardíacas, uso de esteroides, de antibióticos de amplio espectro e inmunosupresores, entre otros.
- Otros procesos fisiológicos: embarazo, vejez, prematurez, pacientes con anomalías congénitas, alteraciones de pH.

# I. INTRODUCCIÓN

- Otros procedimientos terapéuticos: cirugías, trasplante de órganos sólidos, hiperalimentación parenteral, (Anaissie y col., 2003; Arenas, 2008; Bu y col., 2005; Ellepola y Morrison, 2005; Mendez y col., 2006; Pfaller MA y Diekema DJ., 2007).

*C. albicans* permanece como el principal agente de infecciones nosocomiales, más de 150 especies de levaduras han sido asociadas con patologías en humanos (Linton y col., 2007).

## I. 2. Frecuencia de aislamiento

Durante la década pasada se observó un cambio en la incidencia de especies de *Candida* como causa de infección, con un decremento de *C. albicans* y un incremento en las especies diferentes a *C. albicans* (CNA) como: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicales* y *C. krusei*. Este cambio probablemente sea consecuencia del extenso uso profiláctico de azoles como el fluconazol, el cuál ha contribuido a la emergencia de especies CNA y algunas de ellas intrínsecamente resistentes (Almirante y col., 2005; Karthaus y Cornely, 2007; Segal, 2005; Linton y col., 2007).

La resistencia a la anfotericina B ha sido demostrada in *C. lusitaniae* y otras especies de *Candida* como *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. rugosa*. La resistencia al fluconazol y a otros azoles ha sido demostrada repetidamente en *C. glabrata* y *C. krusei*, y *C. dubliniensis* desarrolla rápidamente resistencia al fluconazol, mientras que *C. guilliermondii* es poco susceptible a este azol. También se ha reportado que *C. glabrata* y *C. krusei* requieren altas dosis de anfotericina B y altas

## I. INTRODUCCIÓN

concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para el voriconazol (Ellepola y Morrison, 2005; Hsu y col., 2003; Panackal y col., 2006; Pincus y col., 2007). Estudios de vigilancia mundial indican que la susceptibilidad reducida al fluconazol en aislados de *C. parapsilosis* procedentes de infecciones en sangre es poco común (Sarvikivi y col., 2005). Sin embargo, reportes recientes indican una disminución en la susceptibilidad de *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* a las equinocandinas comparado con otras especies del género *Candida* (Pfaller y col., 2008; Ellepola y Morrison, 2005)

La identificación especie específica es relevante para propósitos epidemiológicos, por ejemplo, la frecuencia de aislamiento de una especie particular en un hospital ó la identificación de especies que no son muy frecuentes (*C. lusitanae*, *C. lipolytica*) (Ellepola y Morrison, 2005).

Estudios epidemiológicos han revelado la emergencia de especies que pueden variar geográficamente en la frecuencia de aislamiento. Más de 17 especies de *Candida* han sido reportadas como agentes etiológicos de candidosis invasiva en humanos; más del 90-95% de estas infecciones son causadas principalmente por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Pfaller y Diekema, 2007; Vollmer y col., 2008).

Las especies de *Candida* representan actualmente el 10% de infecciones en sangre y ocupan el tercero ó cuarto lugar de aislados más comunes a partir de sangre en pacientes hospitalizados (Ellepola y Morrison, 2005; Espy y col., 2006). La candidemia se ha observado particularmente en pacientes hospitalizados por largos períodos y quienes han recibido terapias con antibióticos, inmunosupresores y nutrición

## I. INTRODUCCIÓN

parenteral (Colombo y col, 2006). Las infecciones debido a CNA, se han incrementado y actualmente están involucradas aproximadamente en el 50% de todos los aislados en sangre. Dentro estas especies se encuentran *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Collins y col., 2007)

Las formas profundas y/o sistémicas se presentan en 80 a 90% de los enfermos con SIDA y predominan en esófago. En 1 a 16% de los pacientes portadores de catéteres aparece fungemia. La candidosis sistémica es una infección multiorgánica, asociada con una mortalidad significativa que va de un 30% a 60% (Arenas, 2008; Dendis y col, 2003; Espy y col., 2006; Segal, 2005), además de una alta morbilidad, largos tiempos de estancia hospitalaria y altos costos (Filioti y col, 2007).

En un estudio reciente sobre la epidemiología de sepsis, causada por hongos en los Estados Unidos, se reveló un incremento del 207% entre los años de 1979 al 2000. McNeil y col (2001) publicaron un análisis de la tendencia en la mortalidad por estas infecciones; encontraron un incremento de casos de muerte por infecciones micóticas: de 1 557 casos en 1980, a 6 534 casos en 1997. La mayoría de estas muertes además de estar asociadas al género *Candida*, se asociaban en menor grado también a *Aspergillus* y *Cryptococcus* sp (Pfaller y Diekema, 2007).

A pesar de que *C. albicans* permanece como el principal agente causal de candidosis sistémica, la frecuencia de aislamiento varía en todo el mundo (Sandven, 2000; Almirante y col., 2005).

# I. INTRODUCCIÓN

En México existen pocos estudios relacionados con la frecuencia de aislamiento de *Candida* sp. Hernández y col, reportaron una frecuencia de aislamiento de *Candida* del 89.6%, de los cuáles *C. albicans* fue la más frecuente, seguida de *C. parapsilosis* (Hernández y col., 2003).

## I. 3. Importancia de las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans*

### *Candida glabrata*

Este especie presenta resistencia a fluconazol y resistencia cruzada a otros azoles (Hsu y col., 2003; Panackal y col., 2006; Pincus y col., 2007). Está asociada a infecciones en pacientes con terapia profiláctica con azoles, intervención quirúrgica, catéteres urinarios y venosos (Kojic y Darouiche, 2004; Filioti y col, 2007). Otro factor importante es la relación en el aumento de candidosis sistémica debido a *C. glabrata* con el incremento en la edad del paciente (Pfaller y Diekema, 2007).

### *Candida parapsilosis*

Esta especie está involucrada en infecciones sistémicas, particularmente en neonatos, en pacientes que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos ó con nutrición parenteral, con inserción de catéteres, y cuerpos extraños, con intubación, empleo de antibióticos de amplio espectro y hospitalización prolongada. En algunos reportes la colonización fue asociada especialmente en infantes y neonatos con un peso muy bajo al nacer (1500 g) (Sarvikivi y col., 2005). Algunos estudios han reportado a *C. parapsilosis* como el segundo agente etiológico de candidemia siguiendo a *C. albicans* (Segal., 2005). Además *C. parapsilosis* es un patógeno exógeno que es encontrado en la piel. La nutrición parenteral se asocia con riesgo

## I. INTRODUCCIÓN

incrementado de candidemia. Los medios altamente glucosados favorecen la formación de biofilms, particularmente de *C. parapsilosis*, aumentando su capacidad para colonizar y causar infecciones en pacientes que reciben nutrición por alimentación intravenosa, además de proporcionarle resistencia a antifúngicos (Douglas 2002; Pfaller y Diekema, 2007; Pfaller y col., 2008; Tumbarello y col, 2007; Filioti y col, 2007).

### *Candida tropicalis*

*C. tropicalis* es un patógeno importante en pacientes con neutropenia, con trasplante de médula ósea, con cáncer y con problemas hematológicos. Mientras que en Estados Unidos es la cuarta especie causante de candidosis sistémica, en Latinoamérica es la segunda (Ellepola y Morrison, 2005; Kojic y Darouiche, 2004; Pfaller y Diekema , 2007; Filioti y col, 2007).

### **I. 4. Procedimientos para el diagnóstico de infecciones sistémicas por *Candida***

Los procedimientos utilizados para el diagnóstico incluyen: i) la observación microscópica directa del agente en la muestra, ii) demostración histopatológica del hongo en secciones de tejido, y iii) cultivo del hongo (Yeo y Wong, 2002). Este último procedimiento es el estándar de oro para la detección de una infección sistémica causada por *Candida* sp. Sin embargo, en algunos casos los cultivos de sangre son negativos y pueden resultar positivos en una infección tardía (Ellepola y Morrison, 2005). La identificación convencional de levaduras en el laboratorio clínico se realiza mediante una combinación de características morfológicas y bioquímicas. Es importante que las levaduras sean identificadas hasta especie. La importancia de efectuar un diagnóstico rápido y correcto contribuye a una terapia exitosa, y entonces

## I. INTRODUCCIÓN

generar una solución temprana de la infección en los pacientes afectados (Pincus y col., 2007; Bu y col., 2005).

### *Examen directo y extendidos*

El examen directo se efectúa a partir de la muestra biológica, la cual es procesada con hidróxido de potasio, solución de lugol o fisiológica. También se pueden realizar extendidos y tinciones de Gram, PAS, Giemsa o Wright. Se pueden observar blastoconidios redondos u ovalados y pseudohifas, característicos del género *Candida*. En productos biológicos como tejidos y órganos internos, la presencia de levaduras, tiene un significado patológico directo (Bonifaz, 1994; Cuétara y col., 2006; López y col., 1995; Arenas, 2008).

### *Cultivo*

Los especímenes se siembran en agar dextrosa Sabouraud (SDA) simple, agar papa dextrosa (PDA) y para el aislamiento de *C. albicans* SDA con cloranfenicol y cicloheximida. Los hongos crecen rápidamente a 37° C y en 24 a 48 horas se desarrollan colonias blancas, cremosas, de superficie lisa a rugosa, brillantes.

Hay algunos medios de cultivo selectivos para el género *Candida* como el biggy que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes, debido a que contiene sulfitos que son reducidos por algunas especies de este género, dando colonias de color marrón claro a oscuro.

El diagnóstico de la candidosis sistémica sigue siendo difícil, dada la baja sensibilidad de los hemocultivos (50-60%) y se caracterizan por muchos falsos

## I. INTRODUCCIÓN

negativos (Arenas, 2008; Cuétara y col., 2006; Dendis y col., 2003; Einsele y col., 1997; Filioti y col., 2007; Schabereiter-Gurtner y col., 2007; Segal., 2005). Se han desarrollado avances en los procedimientos del cultivo de las muestras de sangre para obtener mayor sensibilidad y reducir el tiempo requerido para dar cultivos positivos, crítico para aquellos pacientes con múltiples órganos involucrados. También se cuentan con sistemas de cultivo de sangre automatizados con monitoreo continuo del crecimiento. Monitoreos colorimétricos o fluorescentes pueden ahora ser conducidos automática y electrónicamente a intervalos de 10 minutos (Ellepola y Morrison, 2005; Meyer y col., 2004).

### *Estudio histopatológico*

El estudio histopatológico es uno de los métodos mas eficientes para establecer el diagnóstico de una infección fúngica sistémica (Ellepola y Morrison, 2005). En este estudio son útiles las tinciones como PAS, Gomori-Grocott, Gridley, en donde se encuentran diferentes imágenes, dependiendo del tipo clínico de candidosis y del tiempo de evolución. Pueden observarse elementos levaduriformes y seudomicelio, rodeados de infiltrado celular involucrado en el proceso inflamatorio y puede ser usado como un parámetro diagnóstico para candidosis invasiva (López y col., 1995; Bonifaz, 1994; Arenas, 2008). Existen anticuerpos fluorescentes específicos para la identificación de *Candida* sp. y que son utilizados en secciones de tejidos embebidos en parafina. Se ha sido utilizado la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) usando sondas de oligonucleótidos dirigidas al 18S del RNA ribosomal y un nuevo método FISH usando una sonda acido péptido-nucleico marcado con fluoresceína (PNA) (Ellepola y Morrison, 2005).



## I. 5. Técnicas de identificación de especies de *Candida*

La identificación se basa en criterios morfológicos y bioquímicos, principalmente asimilación y fermentación de carbohidratos (Ellepola y Morrison, 2005; Segal, 2005). Para ello se practican las siguientes pruebas:

### *Formación de tubo germinativo*

Es una de las pruebas más frecuentemente utilizadas. Se puede emplear suero humano, glucosamina o sales de amonio. Es una prueba rápida de identificación después de 2 a 4 horas de incubación de la levadura inoculada en suero. La emisión de una prolongación citoplásmica al menos el doble de tamaño de la célula madre es una prueba presuntiva para *C. albicans*. La especificidad puede ser deficiente ya que *C. tropicalis* ha sido reportada para dar tubo germinativo y más recientemente *C. dubliniensis* (Pincus y col., 2007; Méndez y col., 2006).

### *Producción de clamidoconidios*

Esta prueba se realiza, sembrando la levadura en medio de agar harina de maíz o agar clamidospora incubando a 25° C durante 48-72 horas. Después de este período se observa la formación de clamidoconidios. Esta prueba permite identificar a *C. albicans* y a su vez diferenciarla de *C. dubliniensis*. (Sullivan y Coleman, 1998; Tintelnot, 2000).

### *Cultivo en medios cromógenos*

Entre los medios más utilizados se encuentran el CHROMagar *Candida* y Candiselect. Estos medios contienen componentes cromogénicos unidos a un sustrato

## I. INTRODUCCIÓN

que detectan actividad enzimática específica de alguna de las especies de *Candida*, desarrollando así colonias con colores diferentes y/o textura en cada especie (Kirpatrick y col., 1998). Los medios cromógenos son más caros que los medios tradicionales como el agar dextrosa Sabouraud. Sin embargo el incremento del costo es compensado con el aumento en el número de identificaciones obtenidas con base en el color de la colonia con lo cuál reduce el uso de otros reactivos. Además permiten la detección de infecciones mixtas presentes y permite la identificación a las 24 horas de incubación (Odds y Bernaerts, 1994; Pincus y col., 2007).

### *Pruebas bioquímicas*

Permiten la identificación de las especies por el uso de carbohidratos y sustancias nitrogenadas específicas. Esta identificación está basada en la fermentación (zimograma) y asimilación (auxonograma) de carbohidratos y puede efectuarse en placa o en tubo. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de *Candida*.

Han sido desarrollados métodos fenotípicos de identificación más rápida y menos laboriosos que los convencionales como los equipos comerciales que también se basan en el análisis comparativo de los perfiles de asimilación de carbohidratos, entre los que destacan: Auxacolor, API 20C AUX, API ID 32C, API Candida; RapID Yeast Plus system; algunos automatizados como el ID 32 C, ID-YST, Vitek Yeast Biochemical Card system, Vitek 2-ID-YST y YIP, permiten identificar todas las especies de *Candida*, además de otros géneros de levaduras. La interpretación de resultados se simplifica por medio de programas computarizados (Smith y col., 1999; Ellepola y Morrison, 2005; Leaw y col., 2006; Pincus y col., 2007).

# I. INTRODUCCIÓN

## *Pruebas inmunológicas*

El inmunodiagnóstico se basa en la detección de anticuerpos y de antígenos en fluidos corporales. La dificultad en estas pruebas sobre la presencia de anticuerpos es que *Candida* es un comensal en el humano (Quindós y col., 2004). Sin embargo, se ha reportado la detección de anticuerpos dirigidos a las aspartil proteasas secretadas (SAP), la enolasa, manana, metaloproteína de 52 kDa, proteína 1 de la pared de la hifa y un antígeno del tubo germinativo de *C. albicans*. Por otro lado, la cantidad de antígeno fúngico circulante puede ser insignificante y difícil para detectar, por lo que, su falta de especificidad y sensibilidad representa una limitante para el diagnóstico (Bu y col., 2005; Clancy y col., 2008; Segal., 2005).

La intradermorreacción a la candidina nos indica primo-contacto, es un antígeno universal y no tiene valor diagnóstico. En casos diseminados puede ser negativa. Técnicas como la doble inmunodifusión, contraímmuno-electroforesis, reacción de aglutinación en látex, ELISA, fijación de complemento, son de gran utilidad en los casos de candidosis sistémica. Otros métodos de diagnóstico incluyen la detección de metabolitos como el D-arabinitol, componentes de la pared celular como la D-glucana, y antígenos como la enolasa, mananas, sin embargo esta detección no es usada mundialmente ya que no han sido validados y aceptados en la práctica clínica (Bonifaz, 1994; Arenas, 2008; Clancy y col., 2008; Pontón, 2006; Segal, 2005).

## II. ANTECEDENTES

### II. Técnicas moleculares para la identificación de especies de *Candida*

Muchas técnicas moleculares han sido desarrolladas para ofrecer una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, y permitir la identificación de hongos correcta, rápida, comparado con los métodos fenotípicos tradicionales (Lau y col, 2007; Leaw y col, 2006)

Las técnicas moleculares que se emplean en la identificación de especies y géneros de hongos comprenden: el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP *restriction fragment length polymorphism*), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP), el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de DNA amplificado por PCR (PCR-SSCP) y el análisis del polimorfismo del DNA amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*) (Arenas, 2008; Borst y col., 2003; Bridge, 2002; Ellepola y Morrison, 2005; Leaw y col, 2006).

La secuenciación del ácido nucleico es una alternativa en la identificación de organismos que su identidad es cuestionable o no puede ser determinada por métodos fenotípicos. Sin embargo, requiere técnicos expertos y equipo sofisticado que no está disponible en muchos laboratorios clínicos (Ellepola y Morrison, 2005).

Los métodos basados en la PCR, muestran claramente una mayor sensibilidad que el cultivo y una especificidad equiparable a este. Por otro lado, éstas técnicas han mostrado ser más rápidas que las técnicas convencionales (Luo y col., 2002; Colom y

## II. ANTECEDENTES

col., 2006). Muchos de estos procedimientos detectan e identifican las especies de *Candida* en menos de 24 horas. Además, la técnica de PCR puede detectar tanto células fúngicas viables como no viables en una variedad de muestras clínicas (Lau y col., 2007).

La PCR tiempo real combina la amplificación por PCR y la detección fluorescente en la misma reacción, y presenta una alta especificidad y sensibilidad mayor que otros métodos para la detección y cuantificación de especies de *Candida*. Una de las ventajas de este ensayo con respecto a la PCR convencional e incluso combinada con el Southern blot, es el bajo riesgo de contaminación debido a que se desarrolla en un sistema cerrado, además de no necesitar un análisis después de la reacción. Sin embargo requiere de una sonda marcada para cada especie, requiere de equipo especializado, siendo una desventaja su alto costo (Bu y col, 2005; Loeffler y col., 2002; White y col., 2003; Pincus y col., 2007).

En ensayos moleculares es fundamental la selección apropiada de los blancos como el DNA y los iniciadores. Muchas secuencias blanco para la PCR han sido utilizadas, por ejemplo: los genes del citocromo P450, genes de la proteína de choque térmico, genes reguladores de pH, genes ACT1, gen de la quitin sintetasa, genes reguladores de pH, DNA topoisomerasa II, gen mitocondrial del citocromo B, genes de la vía biosintética de la lisina (Kan, 1993; Galán y col, 2006; Guo y Bhattacharjee, 2006; Jordan, 1994; Morace y col., 1999).

Las regiones del DNA ribosomal representan una enorme ventaja con respecto a otras regiones ya que contienen dominios altamente conservadas entre todas las

## II. ANTECEDENTES

especies de *Candida* y han sido las más utilizados para la PCR. Incluyen los genes ribosomales 5.8S, 18S y 28S y las regiones variables de los ITS (*Internal transcribed spacer*) localizados entre estos genes. Estas últimas presentan secuencias especie-específicas, con alta heterogeneidad interespecie y baja intraespecie. Estas regiones son blancos de elección para diseñar iniciadores universales e iniciadores específicos de género y especie. Otra de las ventajas que presentan los genes ribosomales (18S, 28S y 5.8S) y los ITS, es que son genes multicopia ( $\geq 100$  copias en el genoma), lo cual aumentan la sensibilidad de la PCR. (Coignard y col.,2004; Dendis y col., 2003; Fujita y col., 2001; Hsu y col., 2003; Lau y col., 2007; Leaw y col., 2006; Luo y Mitchell, 2002; Maaroufi y col., 2003; Pincus y col., 2007; Shin y col., 1997; Wahyuningsih y col., 2000).

Existen muchos reportes en donde se han utilizado varias secuencias para la identificación molecular de las especies más comunes de *Candida*, siendo los ITS los más usados, sin embargo son pocos los estudios reportados donde se han utilizado en muestras clínicas. En la tabla 1 se muestran algunos de los estudios que se han reportado.

La aplicación de métodos moleculares para la identificación de *Candida* sp en muestras clínicas requiere el empleo de procedimientos de extracción de DNA más sofisticados. La detección de DNA fúngico en muestras clínicas presenta varias ventajas con respecto a los métodos convencionales. El DNA derivado de células vivas como muertas, incluso de organismos no cultivables, puede ser amplificado por PCR lo cual aumenta considerablemente la sensibilidad de esta técnica.

## II. ANTECEDENTES

Tabla 1. Métodos de amplificación reportados por algunos autores para la identificación de *Candida* sp.

Fuente de DNA	Secuencia blanco	Técnica utilizada	Especies identificadas	Referencia
Suero y sangre total	ITS	PCR anidado	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Bougnoux y col, 1999
Cultivo de cepas tipo y aislados clínicos en cultivos de sangre	ITS	PCR	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. guilliermondii</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Chang y col, 2001
Cultivos de cepas tipo y aislados clínicos	ITS	PCR	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Luo y Mitchell, 2002
Cultivos de cepas tipo y aislados clínicos en muestras de sangre	ITS	PCR en tiempo real	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. guilliermondii</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Hsu y col, 2003
Cultivos de sangre	ITS	PCR en tiempo real	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. parapsilosis</i> ; <i>C. krusei</i> y <i>C. lusitaniae</i>	Selvarangan y col, 2003
Muestras de sangre	DNAr	PCR en tiempo real	<i>C. albicans</i>	Maaroufi y col., 2003
Muestras clínicas	ITS	PCR en tiempo real	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Schabereiter-Gurtner y col, 2007
Muestras de sangre	RNAsa P	PCR en tiempo real	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. famata</i> ; <i>C. guilliermondii</i> ; <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Innings y col, 2007
Muestras clínicas	ITS	PCR Panfungal	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. glabrata</i> ; <i>C. krusei</i> ; <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Lau y col, 2007
Muestras clínicas	DNAr 28S	PCR en tiempo real	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. parapsilosis</i> ; <i>C. krusei</i> y <i>C. dubliniensis</i>	Vollmer y col, 2008

## II. ANTECEDENTES

Pocos laboratorios clínicos cuentan con los instrumentos, equipos y personal necesarios para desarrollar una PCR, por lo cuál su utilidad es limitada. Por otro lado, con la finalidad aumentar su aceptación para su uso rutinario, los métodos moleculares especialmente los basados en la PCR requieren un proceso de estandarización incluyendo métodos de extracción de DNA, controles negativos y positivos, controles internos y de inhibición (Pincus y col., 2007).



### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el diagnóstico de la candidosis sistémica a nivel hospitalario, se basa principalmente en la detección del agente en las muestras clínicas mediante observación directa, cultivo y eventualmente histopatología a partir de los productos biológicos. Sin embargo, estos procedimientos tienen algunas limitantes: su positividad depende de la presencia de una gran cantidad de levaduras en la muestra y la posibilidad de tomar una muestra de los órganos profundos afectados, por lo que carecen de suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico temprano y pueden requerir 2 ó más días y pueden ser inexactos.

Generalmente la mayoría de los pacientes con candidosis, presenta factores de inmunosupresión severa, condiciones que disminuyen la producción de anticuerpos ó células sensibilizadas, lo que representa una desventaja para el diagnóstico inmunológico de esta micosis.

Los métodos de identificación tradicional se basan en las características morfológicas y bioquímicas que a menudo consumen tiempo y dependen en gran parte de la experiencia y destreza del microbiólogo.

Por otro lado, la identificación de especies de *Candida* es de suma importancia debido a la resistencia innata de algunas de ellas a algunos antifúngicos de uso común en la práctica clínica.

Los métodos moleculares ofrecen ventajas en la rapidez, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad respecto a las técnicas tradicionales. La identificación rápida de levaduras puede ayudar con la aplicación temprana de la terapia apropiada.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Esto puede conducir a la reducción de la mortalidad comúnmente asociada con infecciones fúngicas. Además también ayuda a reducir el tiempo de hospitalización del paciente y los costos que implica.

En México, el empleo de las técnicas moleculares para el diagnóstico de la candidosis aún no se ha desarrollado y se carece de ellas incluso en los centros de atención médica de alta especialidad.

Este trabajo está enfocado a establecer una metodología basada en la PCR orientada hacia el diagnóstico molecular de la candidosis sistémica que permita economizar tiempo y costos tanto para los pacientes como para las instituciones hospitalarias.

## IV. OBJETIVOS

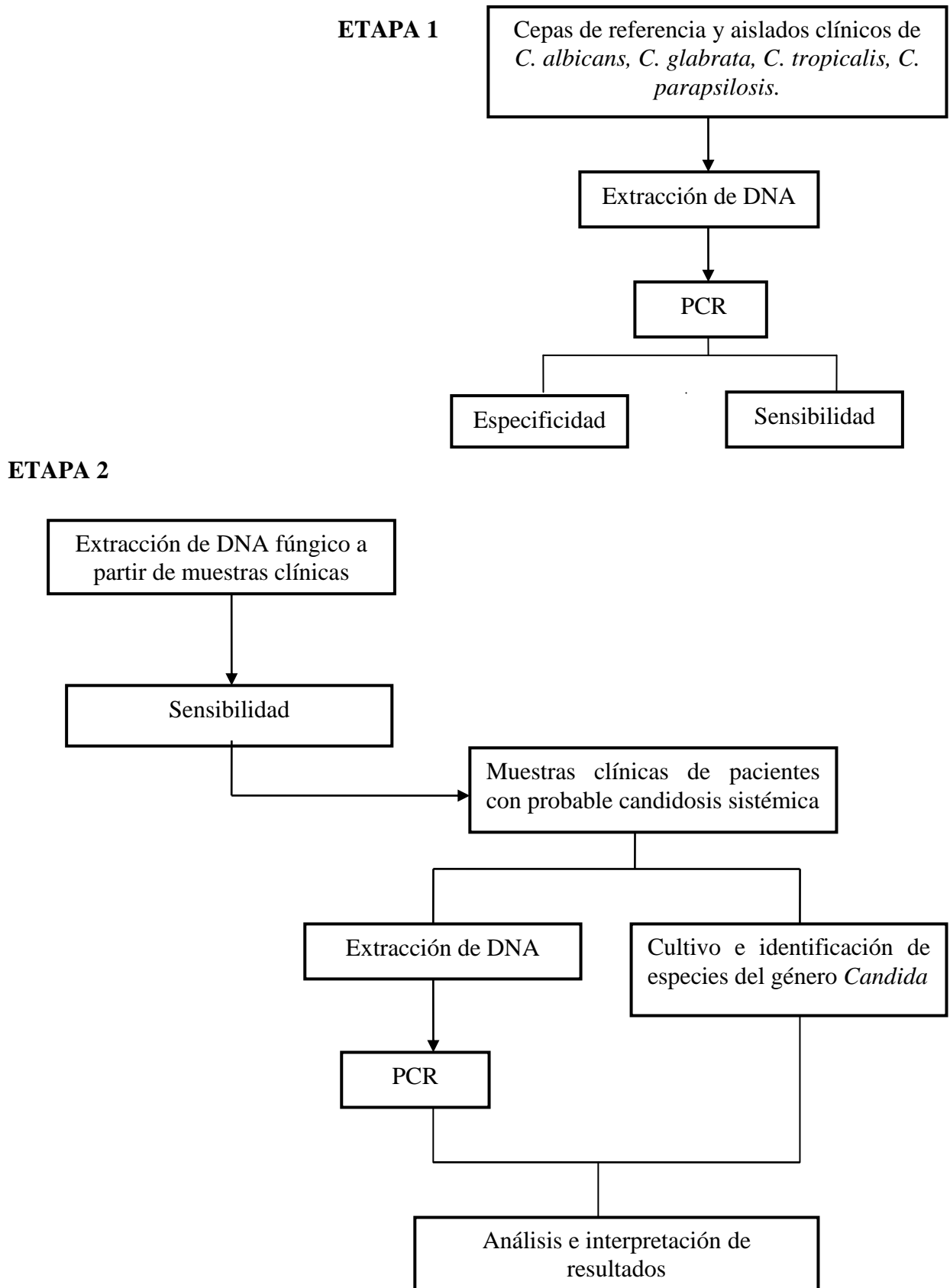
### IV. 1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer un procedimiento basado en la amplificación por PCR para definir el diagnóstico y consecuentemente la identificación de las especies involucradas a partir de especímenes biológicos provenientes de pacientes con probable candidosis sistémica.

### IV. 2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la especificidad y la sensibilidad de los iniciadores especie-específicos en la técnica de PCR utilizando cepas tipo de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y aislados clínicos de las mismas especies.
- Determinar la sensibilidad de los iniciadores especie-específicos a partir de productos biológicos inoculados con las cuatro especies de *Candida* mencionadas previamente.
- Aplicar las condiciones de la PCR a especímenes de pacientes con probable candidosis sistémica para identificar las especies de *Candida* involucradas en la infección.
- Correlacionar los resultados de la PCR con los resultados del cultivo en agar dextrosa Sabouraud.

## V. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI. 1. Material Biológico

#### VI.1.1 Cepas de hongos levaduriformes

*Candida albicans* ATCC 64550

*C. glabrata* ATCC 90030

*C. tropicalis* ATCC 750.

*C. parapsilosis* ATCC 29019

*C. albicans*, cinco aislados clínicos\*

*C. glabrata*, cinco aislados\*

*C. tropicalis*, cinco aislados clínicos\*

*C. parapsilosis*, cinco aislados clínicos\*

*Trichosporon* sp. IGM 89-05

*Rhodotorula* sp. 65 FM

*Cryptococcus neoformans* 136 FM

*Malassezia globosa* 758 FM

*Saccharomyces cerevisiae* 147 FM

\*Los aislados clínicos fueron obtenidos de pacientes con candidosis e identificados mediante pruebas fisiológicas (formación de tubo germinativo en suero, producción de clamidoconidios en agar harina de maíz) y por perfiles de asimilación de carbohidratos (Vitek).

#### VI. 1. 2 Muestras biológicas

Se procesaron 81 muestras provenientes de pacientes con sospecha de presentar candidosis sistémica y/o invasiva. Las muestras procesadas fueron: 11 del Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza, IMSS; 20 del Hospital Regional General Ignacio Zaragoza, ISSSTE; 28 del Hospital de Especialidades del Centro

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS; 1 del Hospital General Darío Fernández Fierro, ISSSTE y 21 del Hospital General de México.

### **VI. 2 Reactivos y aparatos (Apéndice I)**

### **VI. 3. Métodos**

#### **VI. 3. 1 Conservación de cepas**

Las cepas de levaduras utilizadas fueron sub-cultivadas por estría cruzada en agar dextrosa Sabouraud (SDA) e incubadas a 37° C durante 24 horas. Se efectuaron diluciones para obtener un cultivo con colonias aisladas; una de ellas fue cultivada en forma masiva en agar YPD. El cultivo fue incubado a 37° C durante 24 horas y fue cosechado con la ayuda de una espátula y colocado en viales conteniendo 1 mL de agua desionizada estéril. Los viales fueron conservados a 4°C hasta su uso como material de partida.

#### **VI. 3. 2 Eficiencia de los iniciadores en la PCR**

##### **VI. 3. 2. 1 Obtención de DNA**

A partir de los cultivos conservados a 4° C se efectuaron cultivos en agar YPD incubados 48 h a 37°C. La extracción de DNA se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: La masa fúngica se cosechó directamente de la superficie del agar con la ayuda de una espátula estéril y se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido; se transfirió a un tubo de 2.0 mL conteniendo 600 µL de regulador de lisis. Se incubó la mezcla en baño de agua a 65° C durante una hora. Para la separación del DNA, se adicionaron 800 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó firmemente. Se centrifugó la mezcla a 20,000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

transferido a un tubo de 1.5 mL; el DNA se precipitó adicionando 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se agitó el tubo por inversión suave (en el caso de ausencia de precipitado la muestra se dejó incubando a  $-20^{\circ}$  C toda la noche). Se centrifugó a  $20,000 \times g$  por 5 minutos, se retiró el etanol absoluto y se lavó con etanol al 70 %; se centrifugó a  $20,000 \times g$  por 5 minutos y el DNA sedimentado se dejó secar a temperatura ambiente en campana de seguridad. El DNA se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua desionizada estéril y se trató con RNAsa A (10  $\mu$ g/mL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubó a  $37^{\circ}$  C por 1 hora. Para la purificación del DNA se repitió la secuencia de pasos de separación, precipitación y lavado del DNA en las condiciones previamente descritas. Finalmente, el DNA obtenido se resuspendió en agua desionizada estéril.

### VI. 3. 2. 2 Cuantificación y visualización de la calidad del DNA

La concentración de DNA y la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  fue determinado espectrofotométricamente. Una relación de 1.8 a 2 se consideró indicativo de una solución pura de DNA. La calidad del DNA fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %, teñido con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL), aplicando una corriente de 70 V en regulador de TBE 1X. El DNA fue visualizado en un transiluminador de luz UV.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI. 3. 2. 3 Amplificación de los ITS1 e ITS2 para la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* a partir de cepas tipo y aislados clínicos

Para la amplificación de cada uno de los fragmentos de las regiones especie-específicas de los segmentos transcritos internos (ITS *Internal transcribed spacer*), localizadas entre las regiones de DNA ribosomal 18S y 28S, mediante la técnica de PCR, se utilizaron los iniciadores descritos en la Tabla 2 (Luo y Mitchell. 2002).

**Tabla 2. Iniciadores reportados para amplificar el ITS1 e ITS2 de especies de *Candida***

Especie	Iniciador	Secuencias (5'→3')	No. de acceso al GenBank	Tamaño del amplicón (pb)
<i>Candida albicans</i>	CAL1	TTC ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	L47111, L28817	≈ 273
	CAL2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG		
<i>Candida glabrata</i>	CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG CAC CT	AB032177, AF167993	≈ 423
	CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA		
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA1 <sup>a</sup>	TTG GTA GGC CTT CTA TAT GGG	AF287909, L47109	≈ 320
	CPA3 <sup>b</sup>	GCC AGA GAT TAA ACT CAA CCA A		≈ 300
	CPA2	CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC		
<i>Candida tropicalis</i>	CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	AF287910, AF268095	≈ 357
	CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T		

<sup>a</sup> Amplifica sólo cepas *C. parapsilosis* del grupo I

<sup>b</sup> Amplifica todos los grupos de las cepas de *C. parapsilosis*

La mezcla de reacción y las condiciones de PCR para todos los iniciadores se resumen en las Tablas 3 y 4 (Luo y Mitchell.2002).

**Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación del ITS1 e ITS2 de especies de *Candida***

Reactivo	Concentración en la reacción
DNA	~ 1 ng
Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTP's	0.2 mM
Iniciadores	0.5 μM
Taq DNA polimerasa	0.5 U
Vol. final de reacción	20 μl



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4. Condiciones de PCR

Desnaturalización inicial	96° C	5 minutos
Desnaturalización *	94° C	30 segundos
Alineamiento *	58° C	30 segundos
Polimerización *	72° C	30 segundos
Polimerización final	72° C	15 minutos

\* 40 ciclos

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. El peso molecular de los amplicones fue estimado utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb y el patrón de bandeo obtenido fue comparado con el descrito por los autores, definiéndose su correlación con cada especie de *Candida*.

### VI. 2. 2. 4 Especificidad y sensibilidad de los iniciadores

Para la especificidad del ensayo se utilizó DNA de las especies de *Candida*, así como de otras levaduras diferentes al género *Candida*, como *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia globosa* y *Saccharomyces cerevisiae*. Para evaluar el límite de detección del ensayo, se utilizaron diferentes diluciones de DNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg y 1 fg) de las cuatro especies de *Candida*.

### VI.3.3 Identificación y diagnóstico de especies de *Candida* en muestras clínicas

#### VI. 3. 3. 1 Extracción de DNA a partir de muestras clínicas

El tratamiento previo de las muestras clínicas se llevo a cabo en función de su origen:

i) Sangre total. Se le adicionaron 1000 µL de regulador de lisis para eritrocitos. Se mezclaron y se dejaron en hielo por 15 minutos. Se centrifugaron a 13000 x g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante. Para la lisis de leucocitos se adicionaron 1000

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

$\mu$ L de regulador de lisis para leucocitos más Proteinasa K. Se incubaron a 65° C por 60 minutos. Se centrifugaron a 13000 x g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se utilizó para la extracción de DNA.

ii) Líquidos de lavados y otros fluidos corporales. Se centrifugaron a 13000 x g por 5 minutos, utilizándose el sedimento.

Para la extracción del DNA levaduriforme a partir del sedimento obtenido, se adicionaron 650  $\mu$ L solución de liticasa. Se incubaron a 37° C por 45 minutos. Se centrifugaron a 13000 x g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante. La purificación del DNA se efectuó según las indicaciones dadas por el fabricante del QIAamp DNA mini kit: El sedimento fue resuspendido en 180  $\mu$ L de buffer ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K; se mezclaron e incubaron a 56° C por 30 minutos. El DNA fue extraído de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante del kit y el DNA eluido fue resuspendido en 50  $\mu$ L de buffer AE. Las muestras de DNA se almacenaron a -20° C hasta su empleo para la amplificación por la PCR.

### VI.3.3.2 Sensibilidad de la PCR en muestras biológicas

A partir de un cultivo de 24 horas en SDA de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* se realizaron suspensiones de levaduras en agua desionizada estéril, se contaron las células en la cámara de Neubauer y se realizaron diluciones con factor de dilución 1:10 hasta tener una suspensión de 10 células/mL. Se realizó también la cuenta de cada dilución en placas de SDA para verificar el número de UFC.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

De cada dilución se tomó una alícuota y se adicionaron a un volumen de 500  $\mu$ L de sangre total con EDTA obtenida de un individuo sano. A las muestras de sangre con levaduras, se les efectuó la extracción de DNA siguiendo la técnica descrita anteriormente con el empleo de la lítica y el kit comercial. El DNA obtenido fue utilizado para la PCR empleando los iniciadores especie-específicos considerando las condiciones de reacción y de amplificación descritas en cada caso. Como control positivo de amplificación y para confirmar la ausencia de inhibidores de la PCR, a una muestra de DNA extraído se le adicionó DNA de las especies de *Candida*.

Como controles negativos se utilizaron: un control de reactivos y muestras sin levaduras.

### VI.3.3.3 Amplificación de los ITS1 e ITS2 en muestras clínicas

Con el DNA obtenido a partir de las muestras clínicas se aplicó la PCR utilizando los iniciadores especie-específicos. La mezcla de reacción y las condiciones de PCR empleadas fueron las mismas descritas anteriormente.

De manera paralela a la extracción del DNA y la PCR se realizó el cultivo de las muestras clínicas, tomando volúmenes de 500 y 1000  $\mu$ L. El volumen de producto fue directamente depositado en el medio de cultivo. La identificación de la especie de *Candida* aislada se realizó mediante el empleo del CHROMagar *Candida* incubando los medios por 48 horas a 37° C. Para confirmar la presencia y/o ausencia de DNA levaduriforme en las muestras clínicas, se utilizaron iniciadores universales (Tabla 5).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 5. Iniciadores reportados para amplificar el ITS1 e ITS4 universales para hongos.**

Especie	Iniciador	Secuencias (5'→3')	No. de acceso al GenBank	Tamaño del amplicon (pb)
Todos los hongos	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	M27607, D89886	Variable <sup>a</sup>
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

<sup>a</sup> El tamaño del amplicón es variable de acuerdo a cada especie

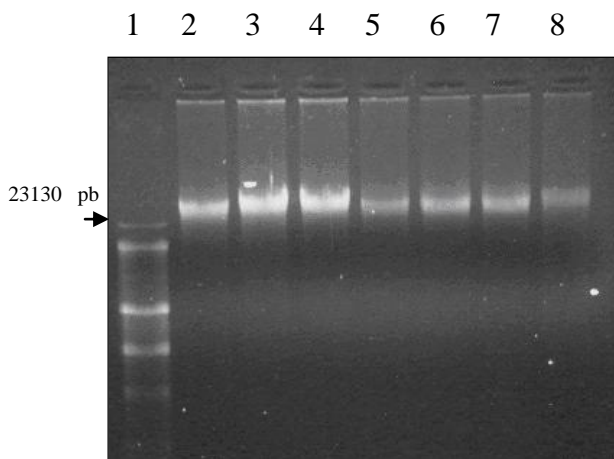
Las concentraciones de los reactantes y la mezcla de reacción en la PCR con los iniciadores ITS1 e ITS4, así como las condiciones de reacción fueron las mismas que para los iniciadores especie-específicos descritas anteriormente.

## VII. RESULTADOS

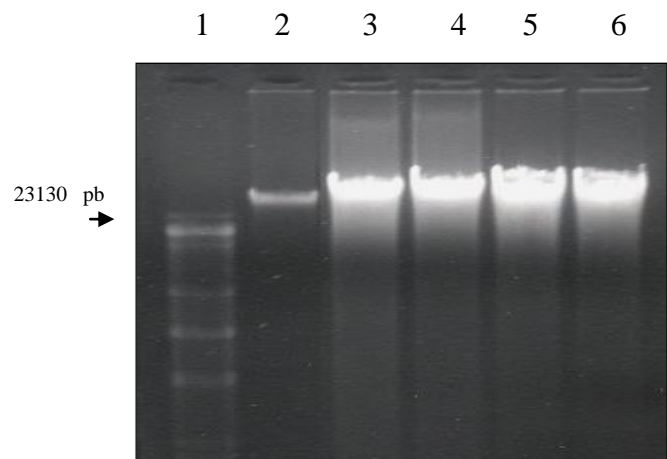
### VII.1 Eficiencia de los iniciadores en la PCR

#### VII.1.1 Obtención de DNA, cuantificación y visualización de la calidad del DNA

El DNA extraído a partir de las cepas de referencia y de los aislados clínicos de *C.albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, así como de los géneros levaduriformes diferentes a *Candida*, presentó alta pureza, la relación de  $A_{260}/A_{280}$  fue de 1.9 a 2.0 en todos los casos. Así mismo, mediante la electroforesis en los geles de agarosa al 0.8% se confirmó la integridad y calidad del DNA extraído a partir de las cepas como lo muestran las Figuras 1 y 2.



**Figura 1.** Electroferograma del DNA total de *C. albicans*. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; Carriles 2-8: aislados clínicos de *C. albicans*.



**Figura 2.** Electroferograma del DNA total de diferentes levaduras. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio Carril 1: Marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/Hind III; Carril 2: *Trichosporon sp.*; Carriles 3-4: *Rhodotorula sp.*; Carriles 5-6: *Saccharomyces cerevisiae*.

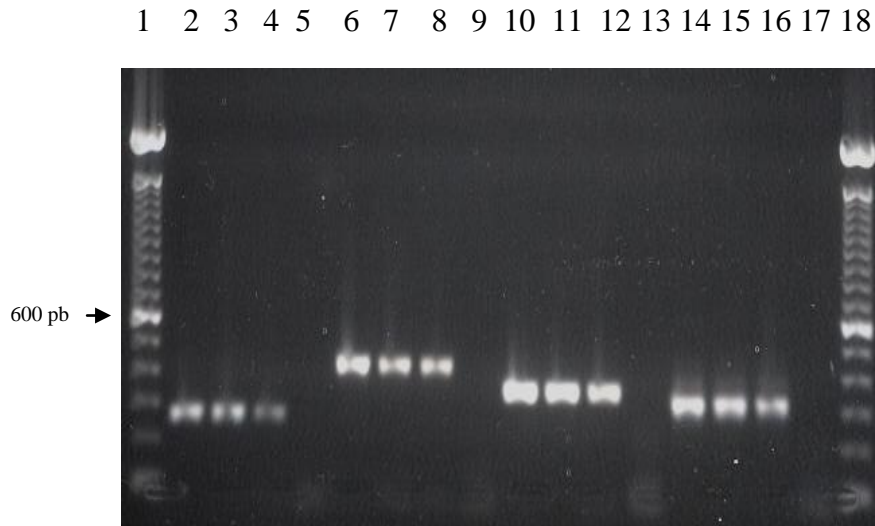
### VII. 2 Amplificación de los ITS1 e ITS2 para la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* a partir de cepas tipo y aislados clínicos

#### VII.2.1 Especificidad y sensibilidad de los iniciadores

Para comprobar la eficiencia de los iniciadores, éstos se emplearon bajo las condiciones descritas en métodos, utilizando el DNA obtenido de *C.albicans*, *C.*

## VII. RESULTADOS

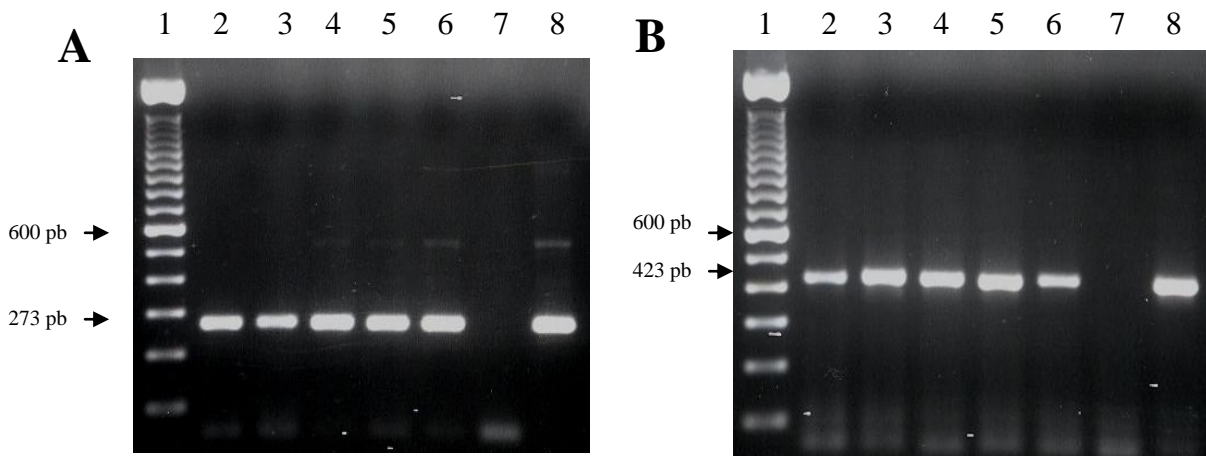
*glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Se obtuvo el amplificado esperado en las cuatro especies de *Candida* de acuerdo a los reportados, definiendo de esta manera su correlación con sus correspondientes DNA. En la Figura 3, se muestran los productos de amplificación obtenidos con su respectivo DNA en geles de agarosa al 1.5%.



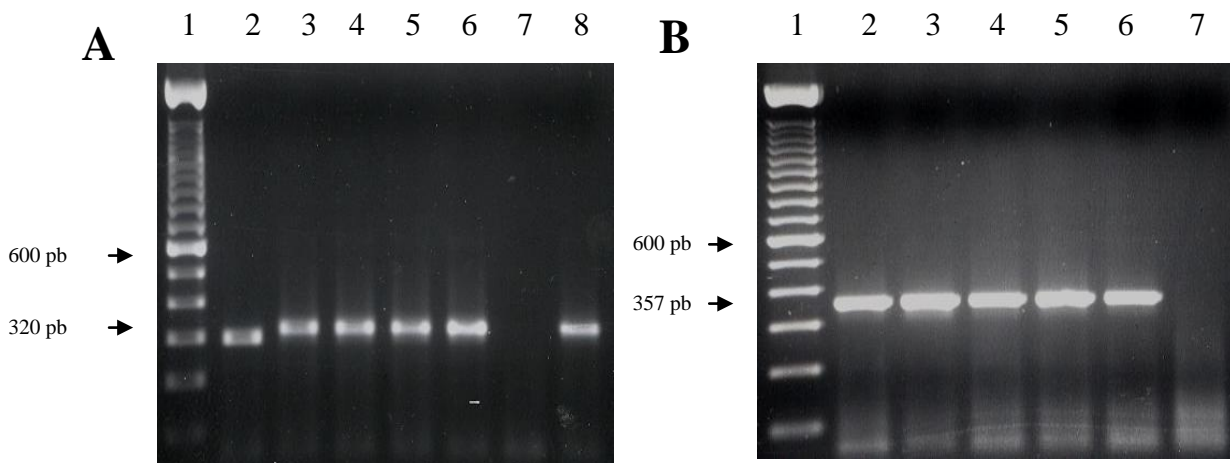
**Figura 3.** Amplicones de los ITS1 e ITS2 utilizando 100, 10 y 1 ng de DNA total. Carriles 1 y 18: Marcador de 100 pb. Carriles 2-4: Amplicones de *C. albicans* obtenidos con CAL1 y CAL2. Carriles 6-8: Amplicones de *C. glabrata* obtenidos con CGL1 y CGL2. Carriles 10-12; Amplicones de *C. tropicalis* con CTR1 y CTR2. Carriles 14-16: Amplicones de *C. parapsilosis* con iniciadores CPA1, CPA2. Carriles 5, 9, 13 y 17: Controles negativos. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio

Los iniciadores específicos generaron amplicones específicos del tamaño correcto cuando se probaron con el DNA de sus especies homólogas, tanto de las cepas tipo, como de aislados clínicos, como lo muestran las Figuras 4 y 5. Se utilizó DNA de otros géneros de levaduras también de interés clínico diferentes a *Candida* como; *Cryptococcus neoformans*; *Malassezia globosa*; *Rhodotorula* sp y *Trichosporon* sp. Como se aprecia en las Figuras 6 y 7 no se observaron productos de amplificación con excepción del control positivo donde se utilizó DNA de cada especie correspondiente.

## VII. RESULTADOS

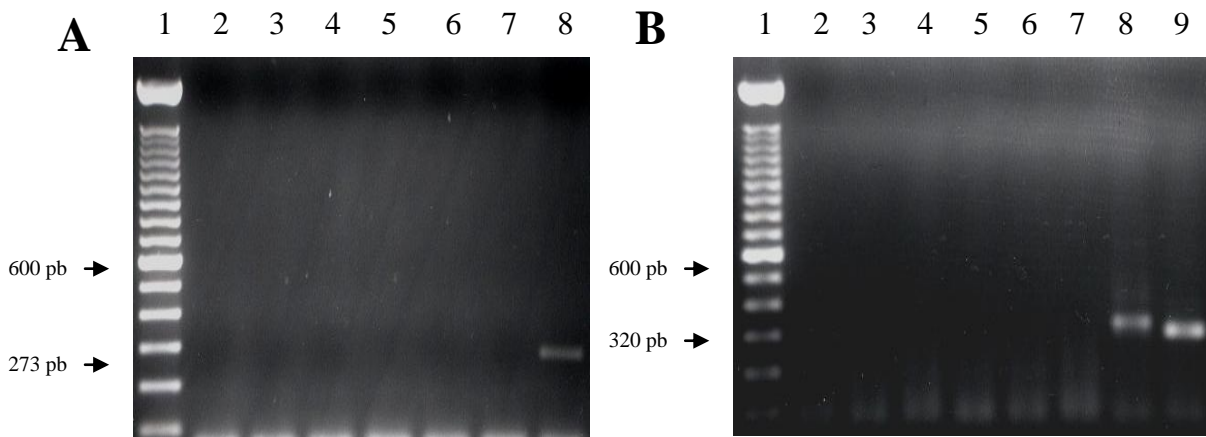


**Figura 4.** Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y *C. glabrata* en aislados clínicos. Panel A. Con iniciadores CAL1 y CAL2 para *C. albicans*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carriles 2-6: Aislados clínicos; Carril 7: Control negativo; Carril 8: Control positivo. Panel B. Con iniciadores CGL1 y CGL2 para *C. glabrata*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carriles 2-6: Aislados clínicos; Carril 7: Control negativo, Carril 8: Control positivo. En ambos paneles, productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

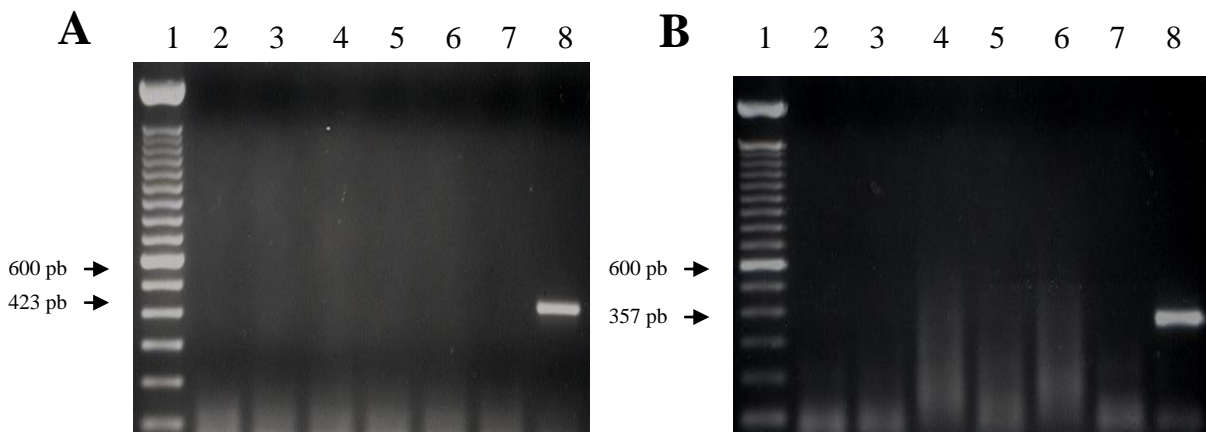


**Figura 5.** Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* en aislados clínicos. Panel A. Con iniciadores CPA1, CPA2 y CPA3 para *C. parapsilosis*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carriles 2-6: Aislados clínicos; Carril 7: Control negativo; Carril 8: Control positivo. Panel B. Con iniciadores CTR1 y CTR2 para *C. tropicalis*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carriles 2-5: Aislados clínicos; Carril 6: Control positivo, Carril 7: Control negativo. En ambos paneles, productos separados en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

## VII. RESULTADOS



**Figura 6.** Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en cepas de diferentes levaduras. Panel A. Con iniciadores CAL1 y CAL2 para *C. albicans*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carril 2: *C. neoformans*; Carril 3: *M. globosa*; Carril 4: *Rhodotorula* sp; Carril 5: *S. cerevisiae*; Carril 6: *Trichosporon* sp; Carril 7: Control negativo; Carril 8: Control positivo. Panel B. Con iniciadores CPA1, CPA2 y CPA3 para *C. parapsilosis*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carril 2: *C. neoformans*; Carril 3: *M. globosa*; Carril 4: *Rhodotorula* sp; Carril 5: *S. cerevisiae*; Carril 6: *Trichosporon* sp; Carril 7: Control negativo; Carril 8: Control positivo (*C. parapsilosis* grupo II/III) y Carril 9: Control positivo (*C. parapsilosis* grupo 1). En ambos paneles, productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



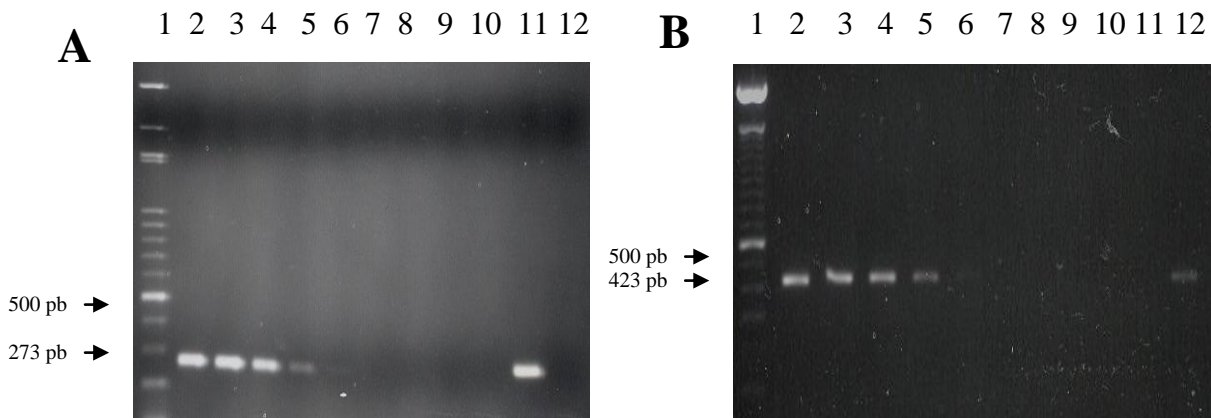
**Figura 7.** Especificidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. glabrata* y *C. tropicalis* en cepas de diferentes levaduras. Panel A. Con iniciadores CGL1 y CGL2 para *C. glabrata*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carril 2: *C. neoformans*; Carril 3: *M. globosa*; Carril 4: *Rhodotorula* sp; Carril 5: *S. cerevisiae*; Carril 6: *Trichosporon* sp; Carril 7: Control negativo; Carril 8: Control positivo. Panel B. Con iniciadores CTR1 y CTR2 para *C. tropicalis*. Carril 1: Marcador de 100 pb; Carril 2: *C. neoformans*; Carril 3: *M. globosa*; Carril 4: *Rhodotorula* sp; Carril 5: *Saccharomyces cerevisiae*; Carril 6: *Trichosporon* sp; Carril 7: Control negativo; Carril 8: Control positivo. En ambos paneles, productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

En lo que respecta a la sensibilidad de la técnica al utilizar diferentes concentraciones de DNA de las cuatro especies, se observó que los iniciadores

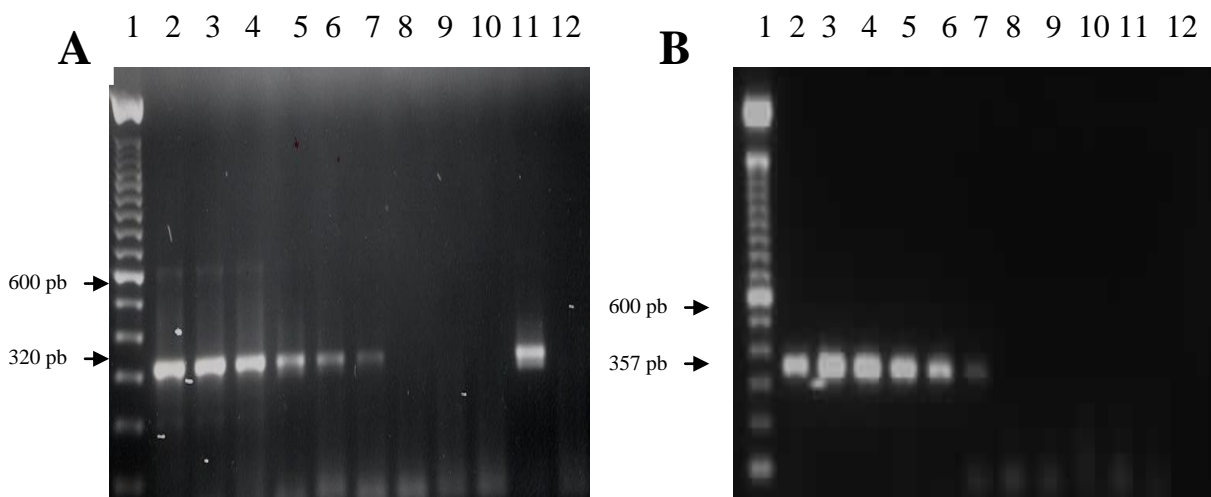


## VII. RESULTADOS

especie específicos para *C. albicans*, *C. glabrata* (Figura 8) y *C. tropicalis* (Figura 9B) la sensibilidad fue de 10 pg; equivalente a 270 levaduras mientras que para los iniciadores específicos para *C. parapsilosis* (Figura 9A) la sensibilidad fue de 1pg de DNA, equivalente a 27 levaduras.



**Figura 8.** Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y *C. glabrata*. Panel A. Con diferentes cantidades de DNA de *C. albicans*. Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2: 100ng; Carril 3: 10 ng; Carril 4: 1 ng; Carril 5: 100 pg; Carril 6: 10 pg; Carril 7: 1 pg; Carril 8: 100 fg; Carril 9: 10 fg; Carril 10: 1 fg; Carril 11: Control positivo; Carril 12: Control negativo. Panel B. Con diferentes cantidades de DNA de *C. glabrata*. Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2: 100ng; Carril 3: 10 ng; Carril 4: 1 ng; Carril 5: 100 pg; Carril 6: 10 pg; Carril 7: 1 pg; Carril 8: 100 fg; Carril 9: 10 fg; Carril 10: 1 fg; Carril 11: Control negativo; Carril 12: Control positivo. En ambos paneles, productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

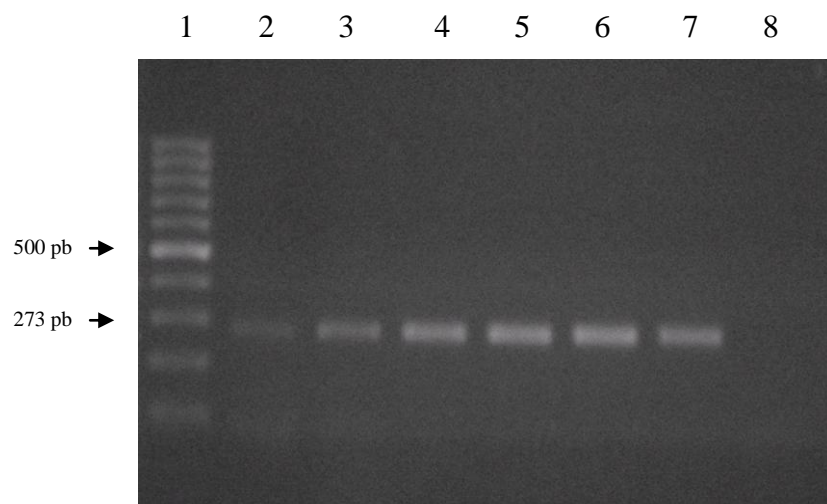


**Figura 9.** Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Panel A. Con diferentes cantidades de DNA de *C. parapsilosis*. Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2: 100ng; Carril 3: 10 ng; Carril 4: 1 ng; Carril 5: 100 pg; Carril 6: 10 pg; Carril 7: 1 pg; Carril 8: 100 fg; Carril 9: 10 fg; Carril 10: 1 fg; Carril 11: Control positivo; Carril 12: Control negativo. Panel B. Con diferentes cantidades de DNA de *C. tropicalis*. Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2: Control positivo. Carril 3: 100ng; Carril 4: 10 ng; Carril 5: 1 ng; Carril 6: 100 pg; Carril 7: 10 pg; Carril 8: 1 pg; Carril 9: 100 fg; Carril 10: 10 fg; Carril 11: 1 fg; Carril 12: Control negativo. En ambos paneles, productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

### VI. 3 Identificación y diagnóstico de especies de *Candida* en muestras clínicas.

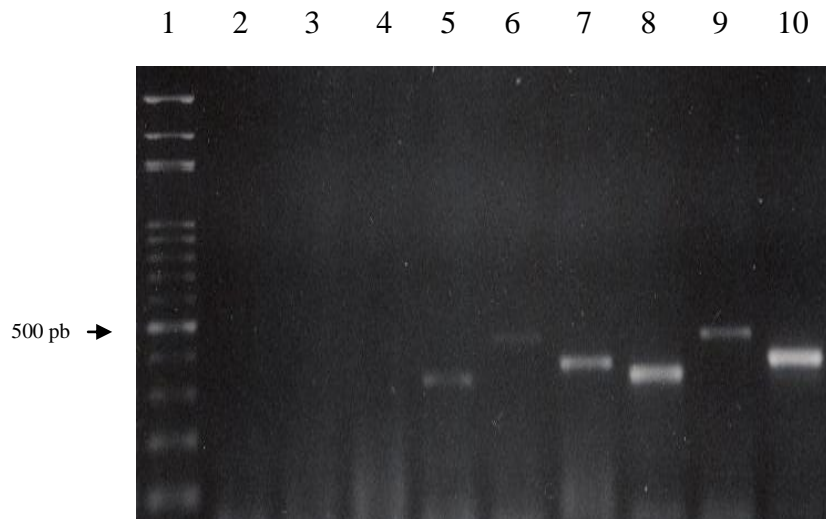
#### VII.3.1 Extracción de DNA a partir de muestras clínicas y sensibilidad de la PCR en muestras biológicas

Para determinar el límite de detección de la prueba a partir de muestras clínicas, se utilizaron diferentes concentraciones de levaduras en muestras de sangre total con EDTA, proveniente de un individuo sano. Al utilizar levaduras de *C.albicans* así como el DNA extraído de esta misma especie, con los iniciadores específicos en la PCR, se observó un amplicon del tamaño esperado (273 pb) cuando se inocularon 100 levaduras (Figura 10). También, cuando se probaron diferentes concentraciones de levaduras de las otras especies de *Candida* en muestras de sangre, se observaron amplicones del tamaño esperado y correspondiente en cada caso, cuando se emplearon 100 levaduras (Figura 11). El número de levaduras fue verificado por la cuenta de UFC en placas con SDA.



**Figura 10.** Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. albicans* en muestras de sangre con diferente número de levaduras. Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2-6:  $10^2$ ;  $10^3$ ;  $10^4$ ;  $10^5$ ;  $10^6$ ; respectivamente. Carril 7: Control positivo. Carril 8: Control negativo. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

## VII. RESULTADOS



**Figura 11.** Sensibilidad de los iniciadores ITS1 e ITS2 de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en muestras de sangre con cien levaduras. Carril 1: Marcador de 100 pb. Controles negativos. Carril 2: Para *C. parapsilosis*; Carril 3: Para *C. glabrata*; Carril 4: Para *C. tropicalis*. Usando 100 levaduras en muestras de sangre. Carril 5: Para *C. parapsilosis*; Carril 6: Para *C. glabrata*; Carril 7: Para *C. tropicalis*. Controles positivos. Carril 8: *C. parapsilosis*; Carril 9: *C. glabrata*; Carril 10: *C. tropicalis*. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Sólo en aquellas muestras de DNA obtenidas a partir de  $10^6$  levaduras, la relación de  $A_{260}/A_{280}$ , fue de 1.9 a 2.0.

### VII. 4 Amplificación de los ITS1 e ITS2 en muestras clínicas

Se trabajaron ochenta y un muestras clínicas obtenidas de diferentes centros hospitalarios, de pacientes con sospecha de candidosis invasiva y/o sistémica las cuales fueron analizadas por PCR y por cultivo (Apéndice II). La PCR se trabajó con los iniciadores específicos para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. De forma paralela a la aplicación de la PCR, todas las muestras clínicas se sembraron en placas con SDA. Para ambos procedimientos se utilizó un volumen de producto biológico de entre 500 y 1000  $\mu\text{L}$ .

Del total de las muestras clínicas, fueron procesados 25 líquidos de lavados bronquiales, de los cuales 20/25 (80%) fueron positivos, en dónde *C. albicans* 16/20

## VII. RESULTADOS

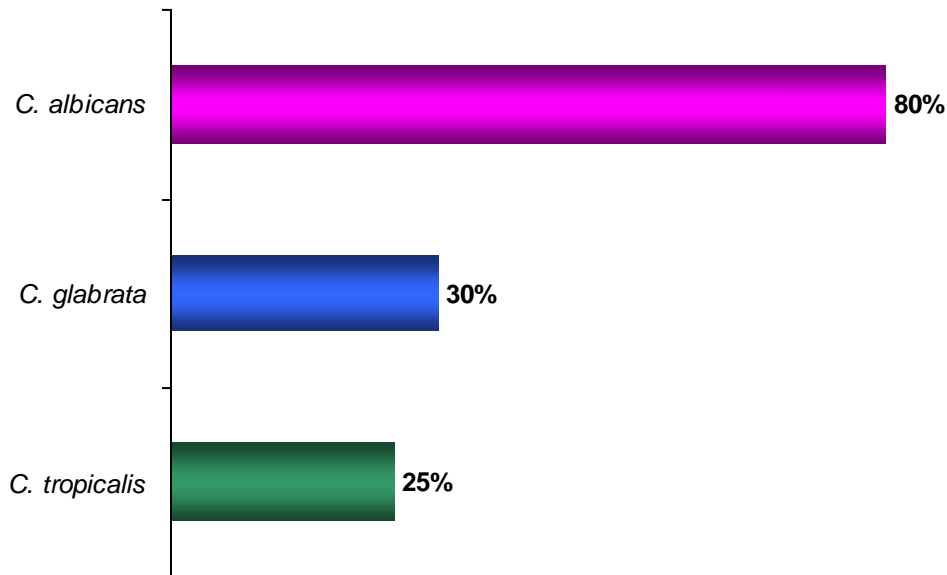
(80%) fue la especie que se encontró en mayor frecuencia (Gráfica 1). Dentro de estas muestras se encontró en el mismo producto, hasta tres especies de *Candida* en algunas muestras clínicas. De las muestras positivas por PCR, 7/20 (35%) el cultivo fue negativo (Tabla 6).

**Tabla 6. Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de líquidos de lavado bronquial**

Clave	Cultivo en SDA	Identificación en CHROMagar <i>Candida</i>	PCR con iniciadores especie-específicos	PCR con iniciadores universales
08-193	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo
170	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
105	Positivo	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo
08-275	Postivo	<i>C. tropicalis</i>	* <i>C. tropicalis</i>	Negativo
628-08	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
416	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
485-08	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C.tropicalis</i>	Positivo
74	Negativo	Negativo	<i>C. tropicalis</i>	Positivo
1981	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
43	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
676-08	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo
1979	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo
101	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
511	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
1012-08	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
08-512	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo
08-505	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	Positivo
C108	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
C23	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
81	Positivo	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Positivo

\* PCR doble

## VII. RESULTADOS



Gráfica 1. Especies de *Candida* detectadas por amplificación del ITS1 e ITS2 en muestras de líquidos de lavado bronquial (n=20).

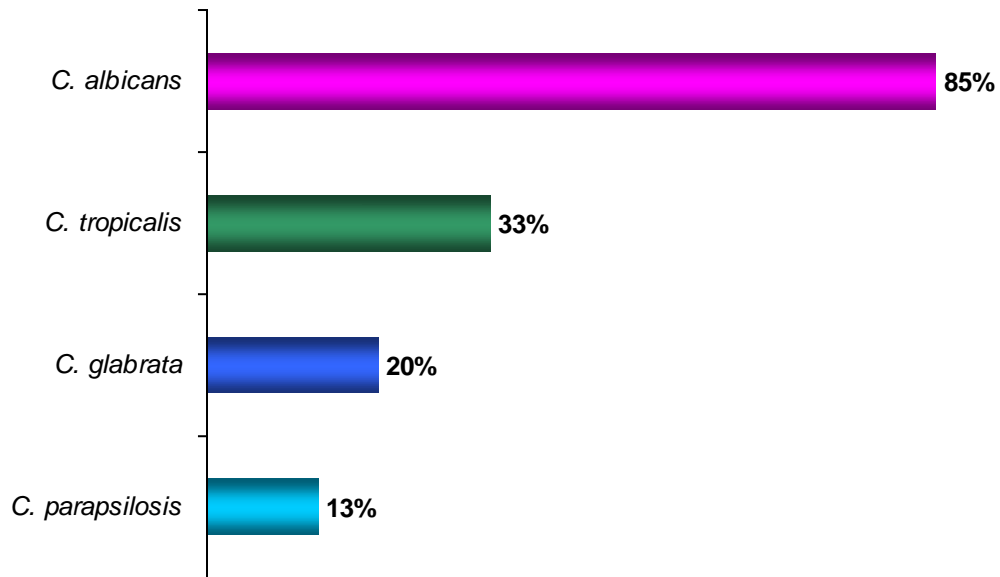
Se incluyeron 15 muestras de esputo, de las cuales 13/15 (86.6%) fueron positivas por PCR, detectándose con mayor frecuencia a *C. albicans* 11/15 (85%) (Gráfica 2). De todas las muestras procesadas sólo en este tipo de producto biológico pudo detectarse a *C. parapsilosis* y en algunas muestras se detectó más de una especie (Tabla 7). Todas las muestras positivas por PCR fueron positivas por cultivo. De las muestras que fueron negativas por PCR, una fue positiva por cultivo y fue identificada como *C. glabrata*.

## VII. RESULTADOS

Tabla 7. Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de esputo.

Clave	Cultivo en SDA	Identificación en CHROMagar Candida	PCR con iniciadores especie-específicos	PCR con iniciadores universales
171	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
188	Positivo	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
248	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
496-08	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
617-08	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
459	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
460	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
426	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
656-08	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
519	Positivo	<i>C. tropicalis</i> y <i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Positivo
543	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
2719	Positivo	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
1151-08	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Positivo

## VII. RESULTADOS



**Gráfica 2. Especies de *Candida* detectadas por amplificación del ITS1 e ITS2 en muestras de esputo (n=15).**

De las 19 muestras de sangre procesadas sólo 3/19 (16%) fueron positivas para PCR siendo *C. albicans* detectada en dos casos y detectándose en una muestra a dos especies de *Candida*. Los cultivos de todas las muestras de sangre en SDA fueron negativos (Tabla 8).

**Tabla 8. Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de sangre.**

Clave	Cultivo en SDA	Identificación en CHROMagar <i>Candida</i>	PCR con iniciadores especie-específicos	PCR con iniciadores universales
C547	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo
19	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
23	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo

Dentro de las muestras clínicas que fueron utilizadas en menor proporción, sólo dos muestras de orina 2/2, una de líquido de vesícula 1/1 y una muestra de líquido pleural 1/7, fueron positivas por PCR y por cultivo, siendo *C. albicans* y *C. tropicalis* las especies detectadas por PCR (Tabla 9).

## VII. RESULTADOS

**Tabla 9. Resultados comparativos entre cultivo y PCR positivos de muestras de orina, líquido de vesícula, ganglio y líquido pleural.**

Clave	Muestra	Cultivo en SDA	Identificación en CHROMagar Candida	PCR con iniciadores especie-específicos	PCR con iniciadores universales
662	Líquido pleural	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
2508	Líquido de vesícula	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y * <i>C. tropicalis</i>	Positivo
536-08	Orina	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
825	Ganglio	Negativo	Negativo	<i>C. tropicalis</i>	Negativo
C11	Orina	Positivo	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo

\* PCR doble

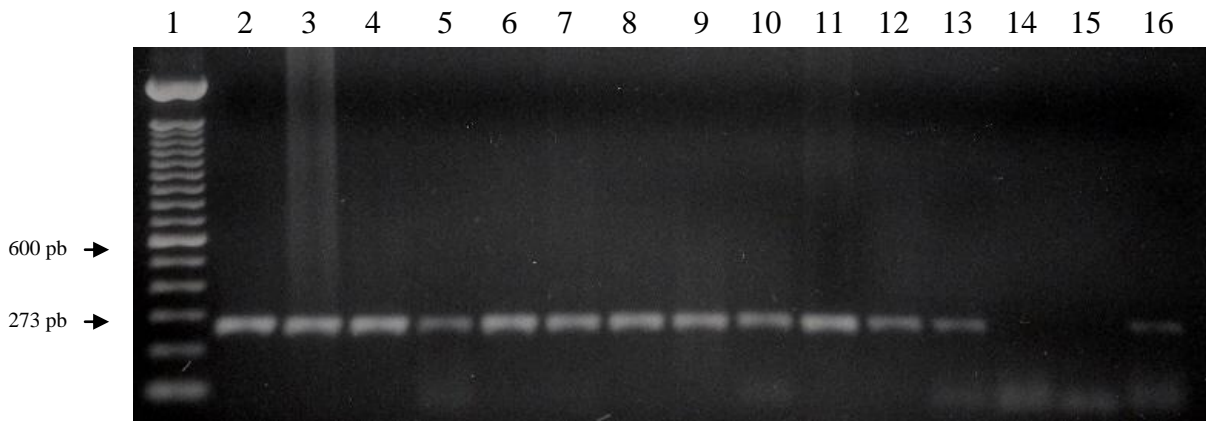
Otras muestras clínicas como líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido peritoneal, líquido pleural, secreción, médula ósea cánula traqueal fueron negativas por PCR con los iniciadores especie-específicos (Apéndice II). A excepción de una muestra de LCR en donde se aislaron levaduras con cápsula, todos fueron negativas por cultivo.

Con respecto a la proporción de especies detectadas por PCR, se detectó con mayor frecuencia a *C. albicans* en 34/42 (81%), de los cuales 24/34 (71%) fueron positivos por cultivo e identificados como *C. albicans* mediante CHROMagar Candida. (Gráfica 3). Por PCR se recuperó un 29% más de positividad que por cultivo.

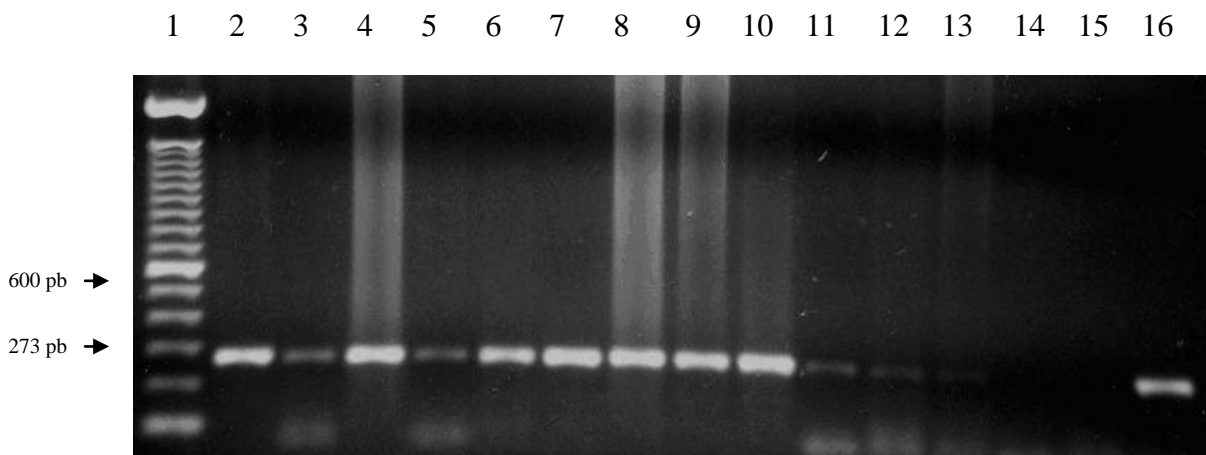
En las Figuras 12 y 13 se muestran algunas amplificadas obtenidos a partir de muestras clínicas con los iniciadores específicos para *C. albicans*.



## VII. RESULTADOS

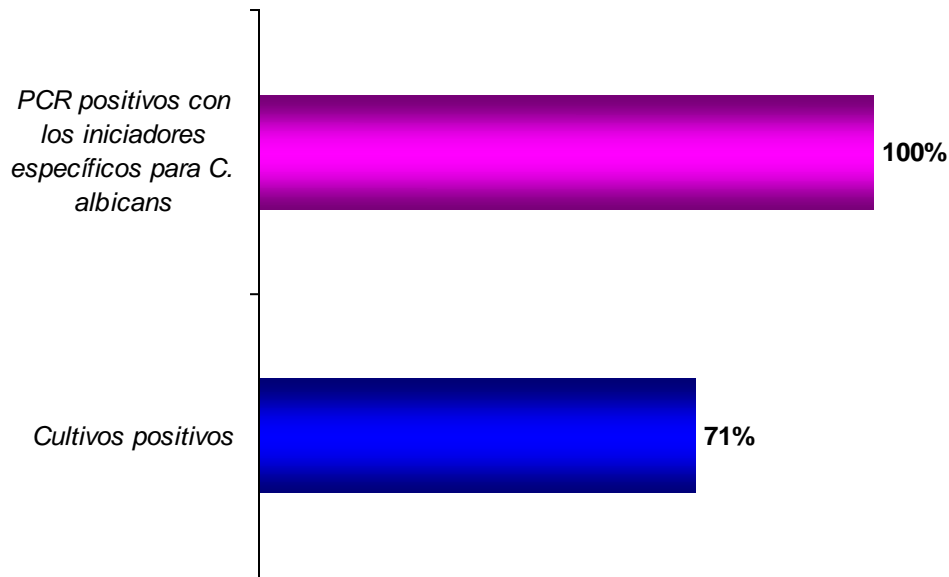


**Figura 12.** Amplificación de los ITS1 e ITS2 de *C. albicans* en muestras clínicas. Carril 1: Marcador de 100 pb. Muestras clínicas. Carril 2: 676-08; Carril 3: 459; Carril 4: 416; Carril 5: 2508; Carril 6: 656-08; Carril 7: 460; Carril 8: 485-08; Carril 9: 171; Carril 10: 43; Carril 11: 617-08; Carril 12: 170; Carril 13: 1981. Controles negativos Carril 14: Reactivos; Carril 15: Agua desionizada estéril. Control positivo. Carril 16: *C. albicans*. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



**Figura 13.** Amplificación de los ITS1 e ITS2 de *C. albicans* en muestras clínicas. Carril 1: Marcador de 100 pb. Muestras clínicas. Carril 2: 511; Carril 3: 08-512; Carril 4: 496-08; Carril 5: 628-08; Carril 6: 1979; Carril 7: 536-08; Carril 8: 543; Carril 9: 1012-08; Carril 10: 248; Carril 11: 19; Carril 12: 08-193; Carril 13: 622. Controles negativos Carril 14: Reactivos; Carril 15: Agua desionizada estéril. Control positivo. Carril 16: *C. albicans*. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

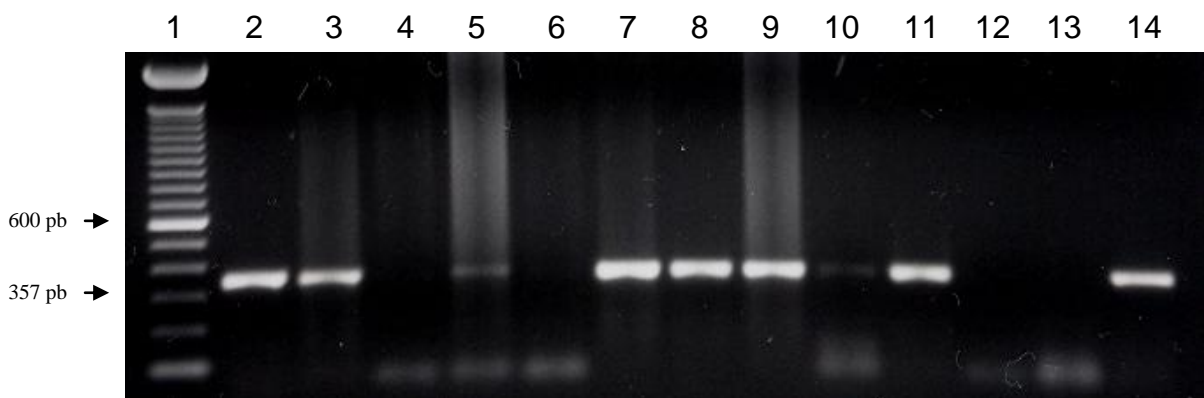
## VII. RESULTADOS



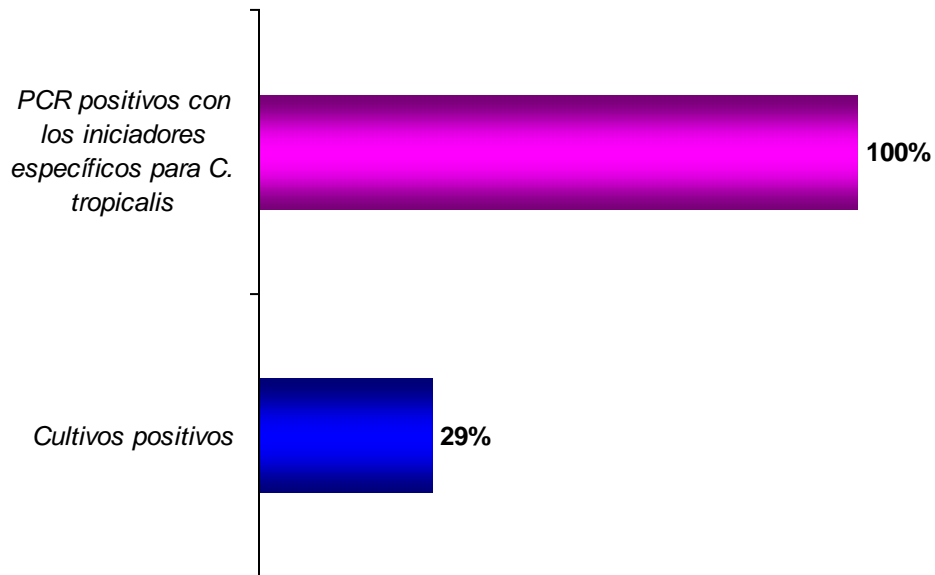
**Gráfica 3. Correlación entre PCR positivos con los ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y cultivo en muestras clínicas (n=34).**

Con los iniciadores CTR para *C. tropicalis* se detectaron 14/42 (33%), de las cuales 4/14 (29%) fueron positivas por cultivo e identificados como *C. tropicalis* por CHROMagar Candida (Gráfica 4). 3/14 (21%) fueron positivas por PCR doble. Por PCR se recupera un 71% más de positividad para esta especie que mediante el cultivo.

En la Figura 14 se muestran algunos amplificados obtenidos a partir de muestras clínicas con los iniciadores específicos para *C. tropicalis*.



**Figura 14.** Amplificación de los ITS1 e ITS2 de *C. tropicalis* en muestras clínicas. Carril 1: Marcador de 100 pb. Muestras clínicas Carril 2: C11; Carril 3: 2719; Carril 4: 511; Carril 5: 543; Carril 6: 825; Carril 7: 519; Carril 8: 188; Carril 9: 496-08; Carril 10: 43; Carril 11: 485-08. Controles negativos. Carril 12: Agua desionizada estéril; Carril 13: Reactivos. Control positivo. Carril 14: *C. tropicalis*. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

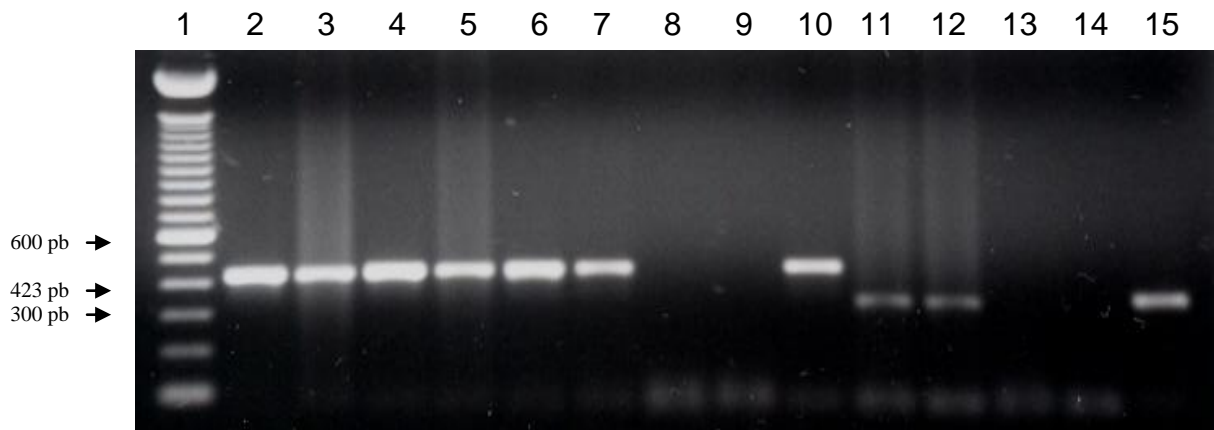


**Gráfica 4. Correlación entre PCR positivos con los ITS1 e ITS2 de *C. tropicalis* y cultivo en muestras clínicas (n=14).**

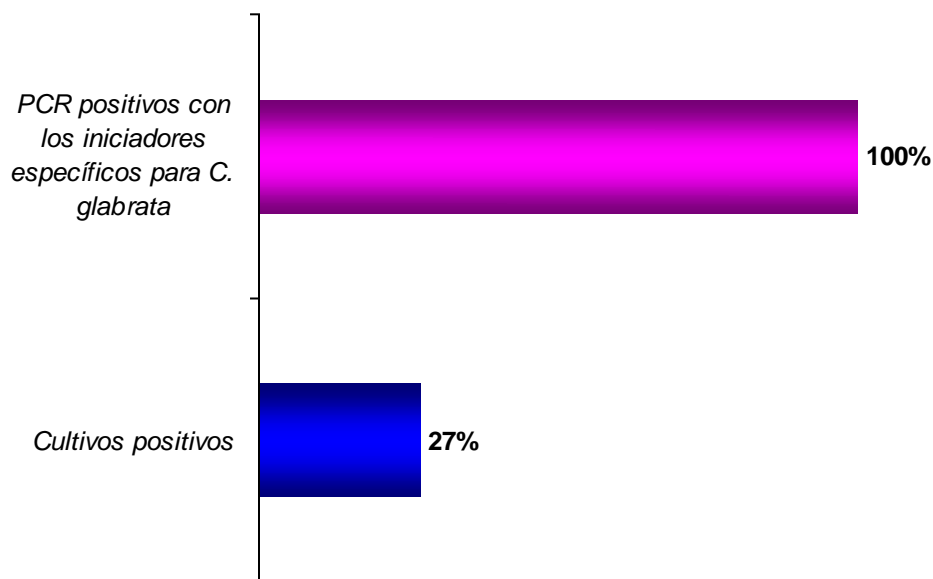
Se detectaron 11/42 (26%) con los iniciadores especie específicos para *C. glabrata*, de los cuales 3/11 (27%) fueron positivas por cultivo e identificados como *C. glabrata* empleando el CHROMagar Candida (Gráfica 5). De estos 1/10 fue positiva por PCR doble. Por PCR se recupera un 73% de positividad para esta especie que por cultivo.

En la Figura 15 se muestran algunas amplificadas obtenidos a partir de muestras clínicas con los iniciadores específicos para *C. glabrata*.

## VII. RESULTADOS



**Figura 15.** Amplificación de los ITS1 e ITS2 de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en muestras clínicas. Carril 1: Marcador de 100 pb. Muestras clínicas. Con iniciadores para *C. glabrata*. Carril 2: C11; Carril 3: 2719; Carril 4: 81; Carril 5: 519; Carril 6: 485-08; Carril 7: 08-505. Con iniciadores para *C. parapsilosis*. Carril 11: 1151-08; Carril 12: 519. Controles negativos. Con iniciadores para *C. glabrata*. Carril 8: Agua desionizada estéril; Carril 9: Reactivos. Con iniciadores para *C. parapsilosis*. Carril 13: Agua desionizada estéril; Carril 14: Reactivos. Controles positivos. Carril 10: *C. glabrata*; Carril 15: *C. parapsilosis*. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



**Gráfica 5.** Correlación entre PCR positivos con los ITS1 e ITS2 de *C. glabrata* y cultivo en muestras clínicas (n=11).

Del total de las muestras clínicas que fueron positivas por PCR, sólo en 2/42 (5%) fueron positivas con los iniciadores especie específicos para *C. parapsilosis*. Ninguno de los PCR positivos pudo ser aislado por cultivo.

## VII. RESULTADOS

En la Figura 15 se muestran algunos amplificadores obtenidos a partir de muestras clínicas con los iniciadores específicos para *C. parapsilosis*.

De todas las muestras clínicas PCR positivas, en 15/42 (36%) se detectaron amplificadores para más de una especie, y de estas 3/15 (20%) fueron aisladas en cultivo e identificadas por CHROMagar Candida.

En 11/15 (73%) se encontraron amplificadores para dos especies de *Candida*, 9/11 (82%) fueron positivos mediante el cultivo, donde se aisló sólo una especie de *Candida*, siendo *C. albicans* la más frecuente. En 2/11 (18%) no se aisló ninguna de las especies en cultivo encontradas por PCR. En aquellas muestras clínicas donde se detectaron tres especies de *Candida*, sólo en 3/4 (75%) pudo aislarse por cultivo a dos especies de *Candida*. En la tabla 10 se resume los resultados de la mezcla de especies encontradas en las muestras clínicas por cultivo e identificadas y por PCR con los iniciadores especie-específicos para *Candida*.

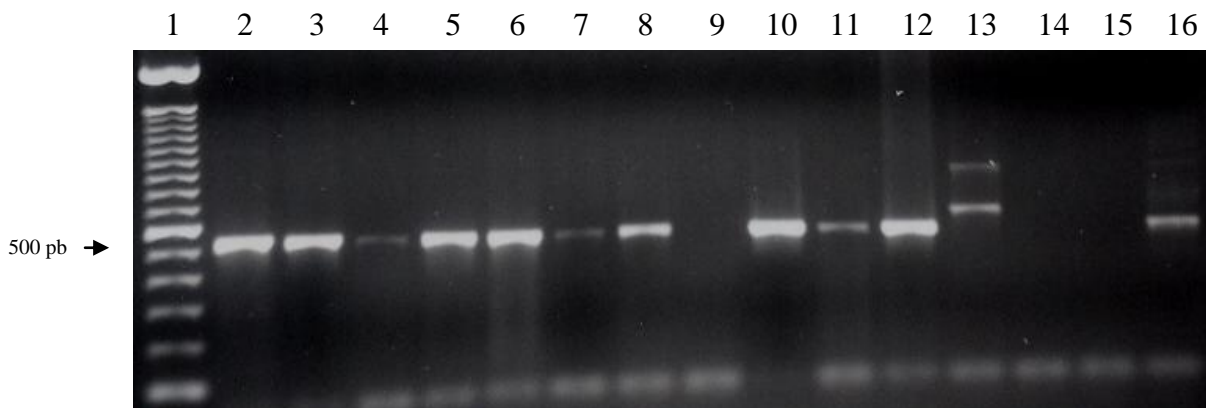
**Tabla 10. Correlación de la identificación de mezcla de especies por cultivo y PCR en muestras clínicas.**

Muestra	Tipo de muestras	Cultivo en CHROMagar Candida	PCR con iniciadores especie-específicos
105	Lavado bronquial	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>
2508	Líquido de vesícula	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>
188	Espito	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>
496-08	Espito	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>
43	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>
676-08	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>
519	Espito	<i>C. tropicalis</i> y <i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i> y <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> ,
543	Espito	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>
2719	Espito	<i>C. albicans</i> , y <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>
1979	Lavado bronquial	Negativo	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>
C11	Orina	<i>C. albicans</i> , y <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>
1151-08	Espito	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>
25	Sangre	Negativo	<i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>
485-08	Lavado bronquial	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>
511	Lavado bronquial	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>

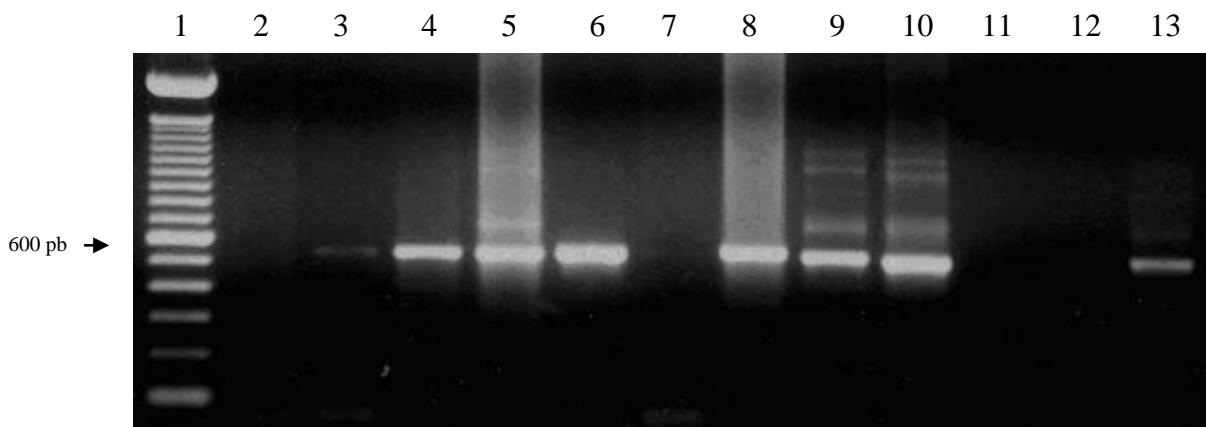
## VII. RESULTADOS

De las 42 muestras clínicas amplificadas con los iniciadores especie específicos, solamente 35/42 (83%) fueron positivos con los iniciadores universales para hongos (Tabla 11). De las muestras clínicas PCR negativos con los iniciadores especie-específicos, 2/39 (5%) fueron positivos con los iniciadores universales (5%).

En las Figuras 16 y 17 se muestran algunas amplificados obtenidos a partir de muestras clínicas con los iniciadores universales.



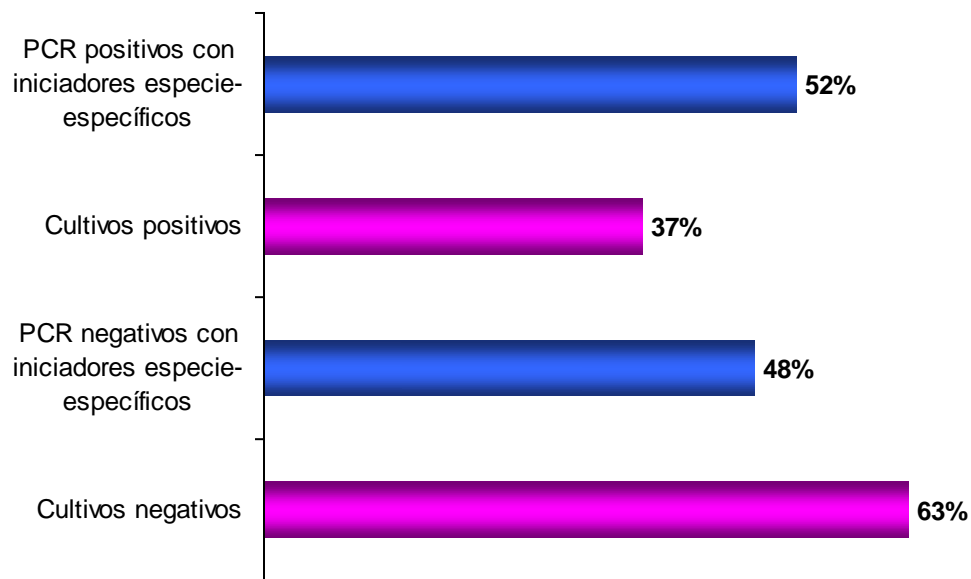
**Figura 16.** Amplificación de los ITS1 e ITS4 universales para hongos en muestras clínicas. Carril 1: Marcador de 100 pb. Muestras clínicas. Carril 2: 676-08; Carril 3: 416; Carril 4: 2508; Carril 5: 656-08; Carril 6: 171; Carril 7: 43; Carril 8: 170; Carril 9: 08-512; Carril 10: 536-08; Carril 11: 1979; Carril 12: 511; Carril 13: 08-505. Controles negativos. Carril 14: Reactivos; Carril 15: Agua desionizada estéril. Control positivo. Carril 16: *Candida* sp. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



**Figura 17.** Amplificación de los ITS1 e ITS4 universales para hongos en muestras clínicas. Carril 1: Marcador de 100 pb. Muestras clínicas. Carril 2: 825; Carril 3: 101; Carril 4: 248; Carril 5: 496-08; Carril 6: 426; Carril 7: 628-08; Carril 8: 543; Carril 9: 485; Carril 10: 518. Controles negativos. Carril 11: Reactivos; Carril 12: Agua desionizada estéril. Control positivo. Carril 13: *Candida* sp. Productos separados en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

## VII. RESULTADOS

Con la finalidad de determinar la relación entre la detección (por PCR o por cultivo) de *Candida* en las muestras clínicas, se observó que mediante la PCR fueron mas muestras positivas para las especies de *Candida* con respecto al cultivo (Gráfica 6 y Tabla 11).



**Gráfica 6. Correlación general de la amplificación del ITS1 e ITS2 de especies de *Candida* y el cultivo de muestras clínicas (n=81).**

**Tabla 11. Correlación entre la amplificación de los ITS1 e ITS2\* e ITS1 e ITS4\*\* y cultivo en muestras clínicas.**

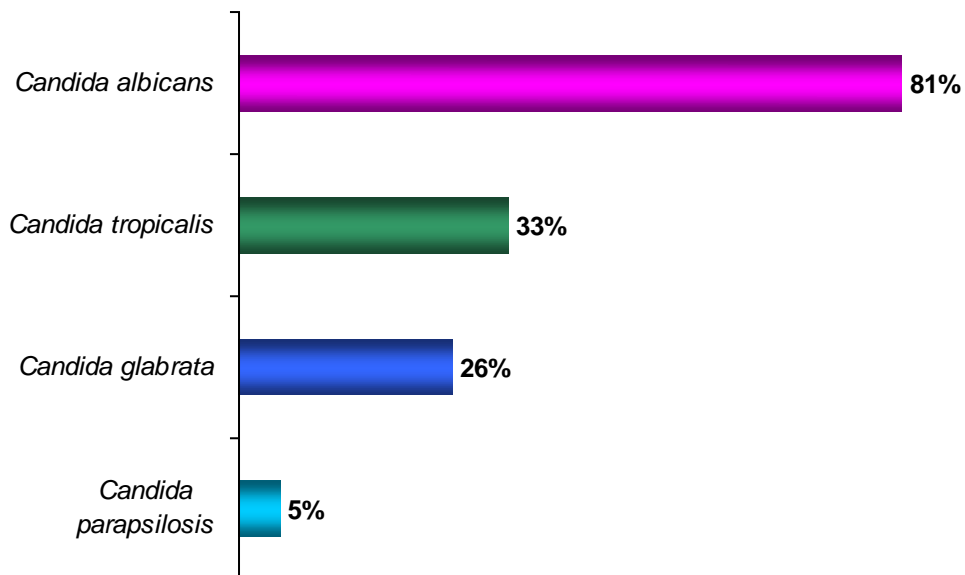
	Negativos	Positivos	Total
Cultivo en SDA	63%	37%	100%
*PCR con iniciadores especie-específicos	48%	52%	100%
**PCR iniciadores universales	54%	46%	100%

Por PCR se obtuvo un 15% de recuperación en resultados positivos con respecto al cultivo.

## VII. RESULTADOS

De todas las PCR positivas con los iniciadores especie-específicos, se observó un 31% de recuperación de positividad en los resultados mediante la PCR con respecto al cultivo. Del total de PCR negativos con los iniciadores especie-específicos, 1/39 (2.5%) fue positivo mediante cultivo.

De todas las PCR positivas, fue detectada en mayor frecuencia a *C. albicans* seguida de *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Sólo en dos muestras clínicas pudo detectarse a *C. parapsilosis* (Gráfica 7).



Gráfica 7. Especies de *Candida* detectadas por la amplificación del ITS1 e ITS2 en muestras clínicas (n=42).



## VIII. DISCUSIÓN

Las infecciones invasivas y/o sistémicas por *Candida* sp, son causa de una alta morbilidad y mortalidad, en pacientes con estancias hospitalarias prolongadas, lo que también implica un incremento en los costos para los centros hospitalarios. Por lo tanto, el diagnóstico de candidosis invasiva debe ser rápido y confiable para un tratamiento eficaz.

Tradicionalmente el diagnóstico de esta patología se ha basado principalmente en el cultivo positivo de muestras estériles como sangre, líquido pleural, o biopsias. Sin embargo este procedimiento no es 100% confiable, ya que hay un porcentaje significativo de falsos negativos y el tiempo en que se tiene el resultado es de aproximadamente 3 días (Filioti y col, 2007). Por lo tanto, son necesarios el desarrollo y la aplicación de pruebas rápidas para el diagnóstico de una candidosis invasiva y/o sistémica, y para ello la PCR es un procedimiento alternativo.

En el presente trabajo fueron utilizados los iniciadores; CAL1-CAL2, CGL1-CGL2, CTR1-CTR2 y CPA1-CPA2, específicos para identificar *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, respectivamente (Luo y Michell, 2002; Hsu y col., 2003).

Estos iniciadores especie-específicos generaron amplicones específicos del tamaño esperado cuando se utilizó DNA de sus especies homologas como se muestra en las Figuras 3, 4 y 5, resultados ya reportados por Luo y Mitchell. Los iniciadores fueron probados con DNA de otros géneros de levaduras de interés clínico incluyendo *Cryptococcus neoformans*; *Malassezia globosa*; *Rhodotorula* sp y *Trichosporon* sp (Figuras 6 y 7). Los resultados mostraron la especificidad de los iniciadores para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, que son las especies que con

## VIII. DISCUSIÓN

mayor frecuencia se aíslan a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes con candidosis invasiva y/o sistémica.

Con respecto a la sensibilidad, utilizando los iniciadores CAL, CGL y CTR, la técnica de la PCR fue capaz de detectar hasta 10 pg de DNA equivalente a 270 levaduras, como lo muestran la Figura 8 y el panel B de la Figura 9. La sensibilidad de la PCR con los iniciadores CPA fue de 1 pg de DNA equivalente a 27 levaduras (panel A de la Figura 9) (Fleischmann y Howard, 1988). Hsu y col, utilizando los mismos iniciadores en una PCR en tiempo real, obtuvieron una sensibilidad de la PCR de 1 pg de DNA. Esta sensibilidad probablemente está relacionada, por un lado, con el método de extracción de DNA utilizado. Hsu y col emplearon para la lisis de las levaduras, PBS con liticasa y el PUREGENE DNA purification kit para la extracción del DNA fúngico, mientras que en este trabajo se utilizó un procedimiento de lisis mecánica con nitrógeno líquido y proteinasa K. Por otro lado, Hsu y col, emplearon en su trabajo una PCR en tiempo real. Por su parte Luo y Mitchell encontraron una sensibilidad de 100 a 1 000 moléculas de DNA con los mismos iniciadores, con excepción de los iniciadores CAL, lo que equivale a un potencial de amplificación desde 1 a 10 levaduras.

Con los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión de que la PCR con los iniciadores especie-específicos utilizados, permite una sensibilidad aceptable, utilizando pequeñas cantidades de DNA de un bajo número de levaduras y que otros autores también han reportado.

## VIII. DISCUSIÓN

Para la aplicación de la PCR en muestras clínicas, un paso crítico previo a los ensayos de PCR es el procedimiento de extracción de DNA. El procesamiento de muestras por métodos manuales requiere múltiples manipulaciones, y junto con un número grande de muestras a procesar, incrementan el riesgo de contaminación (Espy y col, 2006).

Así, para la extracción de DNA fúngico a partir de las muestras clínicas, se utilizó una solución de liticasa en combinación con el QIAamp DNA mini kit. Los ensayos de límite de detección de la PCR en muestras biológicas se realizaron empleando muestras de sangre de un individuo sano. En estas condiciones la sensibilidad de la PCR con los iniciadores especie-específicos en muestras de sangre con diferentes concentraciones de levaduras, fue de 100 levaduras (Figuras 10 y 11).

De acuerdo a Lugert y col (2006) un proceso de lisis de los eritrocitos y glóbulos blancos en las muestras de sangre, acompañada de lisis enzimática de la pared fúngica, seguida de la extracción y purificación del DNA usando un kit comercial, es más eficiente ( $10^1$  levaduras) que los métodos basados en la ruptura mecánica y/o en la ruptura térmico-enzimática, en combinación con la purificación del DNA con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico o utilizando el kit comercial. En otro estudio en pacientes con candidosis sistémica, Maaroufi y col (2003) reportaron que el número de levaduras presentes por ml de sangre es mayor a 100 UFC, por lo cual el procedimiento de extracción utilizado en el presente trabajo permitió tener una sensibilidad aceptable partiendo de un bajo número de levaduras en este tipo de producto biológico.

## VIII. DISCUSIÓN

Para la aplicación de la PCR en productos clínicos, se utilizaron 81 muestras clínicas provenientes de pacientes con sospecha de candidosis sistémica y/o invasiva (Apéndice II).

Dentro de las muestras clínicas se incluyó líquido de lavado bronquial; de las cuales 20 de 25 (80%) fueron positivas por PCR. *C. albicans* fue la especie detectada con mayor frecuencia (80%) (Gráfica 1). Es de gran interés señalar que en sólo 7 de 20 casos (35%) pudo aislarse la levadura por cultivo (Tabla 6). Estos resultados indican que la detección por cultivo a partir de este tipo de producto biológico, no es tan eficiente y pudiera deberse a una respuesta inmune específica y/o inespecífica con un efecto fungicida y/o fungistático sobre las levaduras que impida su desarrollo en cultivo. Schabereiter-Gurtner y col (2007) encontraron que el aislamiento de *Aspergillus* sp en estos productos es bajo y sólo se aísla en un 50 a 57% de los casos. En otros reportes se ha encontrado que los cultivos de lavado bronquial a menudo son negativos y los hallazgos clínicos de posible candidosis son inespecíficos (Loeffler y col., 2002). En el presente trabajo el 75% de las especies de *Candida* fue detectado por PCR, por lo que se recomendaría el empleo de esta técnica para la detección e identificación de estas levaduras en este tipo de muestras. El posible tratamiento con antifúngicos a los pacientes previo a la toma de estas muestras, podría haber tenido un efecto directo en la ausencia de crecimiento de las levaduras. Sin embargo, no hubo acceso a la información de los posibles tratamientos hospitalarios.

De las muestras de esputo, 13 de 15 (86.6%) fueron positivas por PCR, detectándose con mayor frecuencia a *C. albicans* (85%) (Gráfica 2). De todas las muestras procesadas sólo pudo detectarse a *C. parapsilosis* y en algunas muestras se

## VIII. DISCUSIÓN

detectó más de una especie (Tabla 7). Todas las muestras positivas por PCR fueron también positivas por cultivo.

Para explicar la presencia de *Candida* sp en cultivos de secreciones del tubo endotraqueal, se requiere considerar el estado inmunológico del huésped, y de otros indicios de daño pulmonar. La colonización por *Candida* del tracto respiratorio en pacientes ventilados, generalmente es el resultado de la aspiración de la levadura de la orofaríngea y puede no estar asociada con manifestación patológica y clínica de una neumonía. Sin embargo, está documentado que una alteración en la función de los neutrófilos y macrófagos alveolares en pacientes colonizados, puede ser indicio de que el paciente está en alto riesgo de sufrir una candidosis invasiva (Filioti y col, 2007).

Dentro de las 15 muestras de esputo que fueron procesadas, una fue negativa por PCR pero fue positiva por cultivo e identificada como *C. glabrata* (Apéndice II). Este tipo de muestras presentan sustancias inhibitorias para la PCR. En el caso concreto de esta muestra, a una parte de la solución de DNA eluída se le adicionó aproximadamente 1 ng de DNA levaduriforme. En el producto de la PCR se observó un amplicón del tamaño esperado (dato no mostrado), con lo cuál se descartó la presencia de algún inhibidor de la reacción. Considerando la naturaleza de este tipo de productos biológicos, probablemente el proceso de extracción de DNA no fue tan eficiente como en los otros tipos de muestras clínicas, por lo cuál previo a este proceso, se recomendaría el empleo de algún compuesto mucolítico en muestras de esputo.

La mayoría de pacientes de donde procedieron estas muestras de esputo, tenían como diagnóstico neumonía, absceso pulmonar, tuberculosis y VIH, por lo que la

## VIII. DISCUSIÓN

detección de *Candida* sp en cultivo y por PCR tiene un mayor valor clínico, ya que en estos pacientes está presente un factor grave de riesgo asociado.

De las 19 muestras de sangre procesadas, sólo 3 (16%) fueron positivas por PCR. Los cultivos de todas las muestras de sangre en SDA fueron negativos (Tabla 8).

Aunque existen nuevos sistemas de cultivo para la recuperación de levaduras en muestras de sangre, si la cantidad para inocular es insuficiente, la eficiencia es demasiado baja (Ellepola y Morrison, 2005). En un estudio post-mortem el diagnóstico de candidosis se estableció por cultivo en un 56% (Maaroufi y col, 2004)

En nuestro estudio no fue posible conocer el diagnóstico de los pacientes de los cuales procedieron las muestras, pero en algunos casos reportados de candidosis hepato-esplénica, los cultivos de sangre son frecuentemente negativos (Berenguer y col, 1993). Sin embargo en diversos estudios la positividad del cultivo oscila entre el 50 y el 60% de los casos (Dendis y col, 2003; Einsele y col, 1997; Filioti y col, 2007; Schabereiter-Gurtner y col, 2007). Estas observaciones podrían justificar esos cultivos negativos de las muestras de sangre, y a pesar de detectar a *Candida* por PCR en tres muestras, es recomendable el uso de esta técnica en la detección e identificación de *Candida* sp.

Innings y col (2007), mencionan que es importante la cantidad de muestra necesaria para aumentar la sensibilidad de PCR; ellos consideran que de 3 a 4 mL de sangre entera es más sensible que manejar 400 µL de sangre ó plasma. En otros estudios, se ha reportado que el empleo de plasma es más sensible que el uso de

## VIII. DISCUSIÓN

sangre completa (Bougnoux y col, 1999), sin embargo en otros estudios han reportado lo contrario (Einsele y col, 1997). En este trabajo fueron utilizadas muestras de sangre completa, con la finalidad de recuperar DNA de levaduras que pudieran estar fagocitadas por los glóbulos blancos, lo cuál aumentaría la sensibilidad de la PCR.

Varios investigadores han demostrado la presencia de sustancias inhibitorias para la PCR en muestras de sangre y en los medios de cultivo utilizados. La hemoglobina, lactoferrina y el polianetolsulfonato de sodio son los inhibidores más reportados en los eritrocitos, leucocitos y medios de cultivo, respectivamente (Maaroufi y col, 2004). En este trabajo fueron procesadas algunas muestras para detectar la presencia de algunos inhibidores para la PCR; en las muestras de DNA obtenidas de los productos de sangre, no se encontraron inhibidores de la PCR, ya que en una mezcla de reacción adicionada del DNA obtenido del producto biológico, el resultado de la PCR fue positivo.

Los cultivos de sangre llegan a ser positivos en aquellos pacientes con infecciones, principalmente causadas por especies poco virulentas como *C. glabrata* y *C. krusei*. La recurrencia de la infección está influenciada por un factor de riesgo particular y la proliferación de organismos retenidos en un pequeño foco de infección puede ser un órgano y favorecer su persistencia Por lo general es la misma especie de *Candida* que se encuentran en sangre, que esta en otros sitios en pacientes multicolonizados y puede preceder de una candidemia (Ellepola y Morrison, 2005).

## VIII. DISCUSIÓN

Dentro de las muestras clínicas que fueron procesadas en menor número, se encontraron las de orina, un líquido de vesícula, una muestra de ganglio y una muestra de líquido pleural; todas estas fueron positivas por PCR y en menor número por cultivo (Tabla 9).

Aunque la candiduria no es un indicador específico de candidosis sistémica, sí ha sido propuesta como un indicador de mal pronóstico en pacientes con edad avanzada como consecuencia de enfermedades múltiples que pudieran presentar. La mayoría de los pacientes con candiduria son asintomáticos, pero en aquellos con cultivos positivos con desarrollo de más de  $10^3$  UFC/mL y con ausencia de catéter urinario, se debe plantear la sospecha de infección. Cultivos positivos de orina a partir de algunos pacientes graves (de UCI, neonatos, pacientes con quemaduras y pacientes con transplante), son particularmente importantes porque pueden preceder a una candidemia (Ellepola y Morrison, 2005) ó ser indicio a una candidosis renal severa.

Los pacientes de donde fueron procedentes estas muestras clínicas, presentaban ya un factor asociado como; VIH y tuberculosis.

Para atribuirle un valor a los resultados que fueron positivos por PCR, se deben considerar otros datos que fortalezcan el diagnóstico de candidosis sistémica y/o invasiva como el historial clínico, los hallazgos radiológicos, cultivos, estudios histopatológicos, antecedentes de infecciones por hongos, otras infecciones por microorganismos oportunistas y otros ensayos de laboratorio (Dendis y col, 2003; White y col, 2003).



## VIII. DISCUSIÓN

La confirmación del diagnóstico con su respectiva identificación de especie es de gran valor para el tratamiento y para decidir sobre la conveniencia de hacer un estudio de susceptibilidad a antifúngicos (Armstrong-James, 2007).

En todas las muestras clínicas procesadas y que fueron positivas por PCR, se detectó con mayor frecuencia a *C. albicans*, especie seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Gráficas 7 y Figuras 12, 13, 14 y 15). La frecuencia de candidosis por especies CNA, es variable y probablemente influenciada por muchos factores como enfermedades asociadas, quimioterapia citotóxica y el tipo de tratamiento administrado (Almirante y col., 2005; Pfaller y col, 1997). Por ejemplo, de pacientes a quienes se les administran azoles, es muy probable que se lleguen aislar especies resistentes como es *C. glabrata* (Leaw y col, 2006). La frecuencia de especies encontrada en el presente trabajo es similar a la reportada por otros autores (Sandver, 2000; Maaroufi y col, 2004; Philip y col, 2005). Además de la mortalidad atribuible a la candidosis sistémica en general, las especies *C. albicans* y *C. tropicalis* han sido reportadas como las más agresivas (Filioti y col, 2007).

Algunos reportes de infecciones sistémicas indican que *C. albicans* y *C. tropicalis* son más frecuentes en pacientes hospitalizados que no han recibido tratamiento con fluconazol, mientras que aquellos pacientes que han recibido este antifúngico, fueron más susceptibles para ser infectados por *C. glabrata* o *C. krusei*. En contraste, se considera que las infecciones por *C. parapsilosis* no son influenciadas por el tratamiento al fluconazol u otros antifúngicos, y están asociadas a la presencia de catéter intravascular (Pfaller y col, 1997).

## VIII. DISCUSIÓN

Otra posible razón de la baja frecuencia de detección por PCR de *C. parapsilosis* en las muestras clínicas es que la mayoría de los productos biológicos provienen de personas adultas, y esta especie de *Candida* ha sido más relacionada con pacientes pediátricos. Otro dato que sería de gran utilidad para la justificación de este resultado es la presencia de algún catéter en los pacientes, información que no estuvo disponible.

Del total de PCRs positivos para *C. albicans*, el 71% se recuperó por cultivo. Del total de *C. tropicalis*, el 28% se recuperó por cultivo. De *C. glabrata*, se recuperó el 27% y para *C. parapsilosis* ninguna se recuperó por cultivo. (Gráficas 3, 4 y 5). La mayor detección de *Candida* spp por procedimiento molecular, en este caso por PCR convencional, que por cultivo también ha sido reportada por otros autores (Schabereiter-Gurtner y col, 2007). Algunos pacientes pudieron recibir terapia antifúngica, lo cuál pudiera explicarse estas discrepancias. En la mayoría de los aislados que fueron obtenidos por cultivo fueron identificados como *C. albicans*, lo que haría suponer que para el aislamiento de las otras especies mediante el cultivo requiera de un paso de enriquecimiento. Aunque también podría considerarse la baja concentración en el número de levaduras de algunas especies en los diferentes productos biológicos, con respecto a otras, y que por competencia por espacio y nutrientes sea favorecida y beneficiada una especie en particular (Maaroufi y col, 2004; Schabereiter-Gurtner y col, 2007).

De todas las PCR positivas, en 15 de 42 se encontraron amplificadas para más de una especie, representando el 36% del total de PCR positivos y de estas sólo 3 de

## VIII. DISCUSIÓN

15 fueron aisladas en cultivo e identificadas por CHROMagar Candida, representando el 20 % (Tabla 10).

Se detectaron varias asociaciones entre dos y tres especies en la misma muestra biológica (Tabla 10). Por lo que la técnica de PCR permite la detección de infecciones candidósicas múltiples. Otros autores ya han reportado la detección de coinfecciones por especies en muestras clínicas (Philip y col, 2005).

Estos resultados son de gran valor considerando el hecho, de que por lo general en el laboratorio sólo se llega a aislar a una especie por muestra clínica. Lo anterior se observó con los resultados obtenidos donde en el 82% de las muestras sólo se pudo aislar e identificar a una sola especie, mientras que en el 18% el cultivo fue negativo (Tabla 10). De las amplificaciones que fueron positivas para *C. glabrata* (9), sólo en 2 casos se aisló por cultivo. Si se considera que esta especie presenta resistencia a los azoles y no hay una correcta identificación, puede llevar a la administración de una terapia inapropiada y con ello la posibilidad de presentarse una diseminación del agente etiológico. Aunado a la incorrecta identificación por Kits comerciales y pruebas fenotípicas de esta especie (Leaw y col, 2007). Por lo tanto, el uso de la PCR como herramienta para la identificación a nivel de especie, podría evitar estos problemas.

Existen reportes donde *C. tropicalis* puede adquirir resistencia rápidamente durante la terapia a azoles (Schabereiter-Gurtner y col, 2007).

## VIII. DISCUSIÓN

La asociación de una ó más especies puede ser importante en la contribución para la virulencia de las especies. En un estudio sobre la formación de biofilms, Tumbarello y col (2007) encontraron que la asociación entre aislados de *C. albicans* y *C. parapsilosis* está relacionada con el incremento en la tasa de mortalidad para los pacientes con candidosis sistémica debido a estos dos organismos contribuyen posiblemente en la virulencia de *C. albicans* o para aumentar el potencial patógeno de *C. parapsilosis*.

Para comprobar la presencia de DNA fúngico de las muestras clínicas, fueron utilizados iniciadores universales. De los 42 PCR positivos con los iniciadores especie-específicos, solo 35 (83%) fueron positivos con los iniciadores universales (Tabla 11). El tamaño del amplicón para cada especie fue variable (Figura 16 y 17). La presencia de varios amplicones podría explicarse por un lado a la presencia de una mezcla de DNA de varias especies de levaduras.

Una de las razones por las cuales no fueron obtenidos amplicones en algunas muestras sería a la cantidad insuficiente de DNA para ser amplificado por PCR. En algunas de estas muestras la amplificación con los iniciadores especie-específicos fue positiva por una PCR doble.

De las amplificaciones negativas con los iniciadores especie-específicos, 2/39 fue positivos (5%). Una muestra fue LCR en donde por cultivo se aislaron levaduras con cápsula, muy probable a *Cryptococcus* sp, por lo que al utilizar los iniciadores universales, se observó un amplicón. La otra muestra clínica fue un líquido de lavado

## VIII. DISCUSIÓN

bronquial, dónde probablemente se encontraba DNA fúngico que no correspondía a las especies con las que se trabajaron (Apéndice II).

Considerando todas las PCR positivas con los iniciadores especie-específicos, el 69% dio cultivos positivos, lo que representa un 31% mayor de recuperación de positividad en los resultados mediante la PCR que por cultivo. En un reporte comparando el diagnóstico clínico y el diagnóstico post mortem de 100 pacientes, encontraron datos de candidosis en el 16%; de haberse conocido antes de los decesos, los pacientes pudieron haber sido sometidos a un cambio en la terapia y prolongar su tiempo de vida (Schwesinger y col, 2005). La PCR en este trabajo ofreció la alternativa para detectar especies de *Candida* en las muestras clínicas que por cultivo fue imposible detectar.

Los procedimientos de diagnóstico basados en el cultivo consumen tiempo, lo que es un gran inconveniente considerando el estado del paciente y el tratamiento. Por el contrario, la falta de un marcador rápido de diagnóstico puede conducir a la innecesaria administración de un tratamiento en pacientes que no presentan una infección por hongos. El resultado final es una toxicidad inaceptable en muchos pacientes, con costos elevados y por otro parte, el incremento en la selección de especies de *Candida* resistentes.

La PCR es una técnica rápida y sensible capaz de detectar células no viables, no cultivables ó DNA libre presente en la circulación. La identificación de *Candida* sp por cultivo requiere la presencia de organismos viables en sangre o fluidos corporales. Además para la identificación por pruebas fenotípicas, se requiere de un subcultivo

## VIII. DISCUSIÓN

para obtener cultivos puros. En este trabajo la técnica de la PCR fue aplicada directamente a partir de muestras clínicas disminuyendo esos tiempos prolongados.

## IX. CONCLUSIONES

- Los iniciadores CAL, CPA, CTR y CGL mostraron 100% de especificidad al utilizar DNA de las especies de *Candida* correspondientes.
- La sensibilidad de los iniciadores CAL, CTR y CGL fue de 10 pg de DNA total, mientras que la sensibilidad de los iniciadores CPA fue de 1 pg, (equivalentes a 270 y 27 levaduras respectivamente).
- La técnica de la PCR fue más sensible que el cultivo para la detección e identificación de *Candida* en especímenes biológicos. Con una superioridad del 15%.
- La técnica de la PCR fue más sensible que el cultivo para la detección e identificación de *Candida* spp en muestras de líquido de lavado bronquial y sangre.
- *C. albicans* fue la especie que con mayor frecuencia se detectó por PCR seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.
- La PCR permitió detectar mezclas de levaduras en una misma muestra a diferencia del cultivo.
- La PCR es un método específico, rápido y con mayor sensibilidad que el cultivo, representando una alternativa para el diagnóstico de la candidosis sistémica y una correcta identificación de especie.

## X. PERSPECTIVAS

- Validar las condiciones de PCR con un mayor número de especímenes biológicos provenientes de pacientes con candidosis sistémica.
- Incluir un mayor número de iniciadores específicos para otras especies de *Candida* que no fueron incluidas en este trabajo y que se aíslan con menor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos.
- Buscar las condiciones de PCR que permitan detectar e identificar las especies de *Candida* causantes de infección en un número mínimo de pasos para economizar material y reducir tiempos (PCR multiplex).
- Ofrecer este procedimiento al personal clínico como una herramienta de diagnóstico oportuno de candidosis sistémica e identificación de las especies involucradas.
- Partir de la información generada en este estudio para detectar infecciones causadas por otras especies fúngicas causantes comunes de infección en pacientes inmunocomprometidos.



## X. BIBLIOGRAFÍA

- Almirante B; Rodríguez D; Park BJ; Cuenca-Estrella M; Planes AM; Almela M; Mensa J; Sanchez F; Ayats J; Gimenez M; Saballs P; Fridkin SK; Morgan J; Rodríguez-Tudela JL; Warnock DW; Pahissa A. 2005. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 1829-1835.
- Anaissie EJ; McGinnis MR; Pfaller MA 2003. *Clinical Micology*. Churchill Livingstone. USA.
- Arenas R. 2008. *Micología Médica Ilustrada*. 3ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F.
- Armstrong-James D. 2007. Invasive *Candida* species infection: the importance of adequate empirical antifungal therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60: 459-460.
- Baquero C; Montero M; Sentandreu R; Valentin E. 2002. Identification of *Candida albicans* by polymerase chain reaction amplification of a *CaYST1* gene intron fragment. *Rev Iberoam Micol*. 19: 80-83.
- Blin N, Stanfford DW. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl Acid Res* 2:2303.
- Bonifaz, A. 1994. *Micología médica básica*. Ed. Méndez Editores. México,D.F
- Borst A; Theelen B; Reinders E; Boekhout T; Fluit AC; Savelkoul PHM. 2003. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis To Identify Medically Important *Candida* spp., Including *C. dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1357-1362.
- Bournoux M; Dupont C; Mateo J; Saulnier P; Faivre V; Payen D; Nicolas-Chanoine. 1999. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 925-930.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Bridge P. 2002. The history and application of molecular mycology. *Mycologist*. 16: 90-99.
- Bu R; Sathiapalan RK; Ibrahim MM; Al Mohsen I; Almodóvar E; Gutierrez MI; Bhatia K. 2005. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *Journal of Medical Microbiology*. 54: 243-248.
- Chang H; Ning S; Huey A; Lan T; Chain T. 2001. Rapid Identification of Yeast in Positive Blood Cultures by a Multiplex PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 3466-3471.
- Clancy CJ; Barchiesi F; Falconi L; Morris AJ; Snyderman DR; Yu VL; Scalise G; Nguyen MH. 2000. Clinical Manifestations and Molecular Epidemiology of Late Recurrent Candidemia, and Implications for Management. *Eur J Clin Microbiology Infect Dis*. 19: 585-592.
- Clancy CJ; Nguyen ML; Cheng S; Huang H; Fan G; Jaber RA; Wingard JR; Cline C; Hong M. 2008. Immunoglobulin G Responses to a Panel of *Candida albicans* Antigens as Accurate and Early Markers for the Presence of Systemic Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 1647-1654.
- Clark TA; Slavinski SA; Morgan J; Lott T; Arthington-Skaggs BA; Brandt ME; Webb RM; Currier M; Flowers RH; Fridkin SK; Hajjeh RA. 2004. Epidemiologic and Molecular Characterization of an Outbreak of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Community Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 4468-4472
- Coignard C; Hurst SF; Benjamin LE; Brandt ME; Warnock DW; Morrison CJ. 2004. Resolution of Discrepant Results for *Candida* Species Identification by Using DNA Probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 858-861.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Collins CD; Eschenauer GA; Salo SL; Newton DW. 2007. To Test or Not To Test: a Cost Minimization Analysis of Susceptibility Testing for Patients with Documented *Candida glabrata* Fungemias. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 1884-1888.
- Colom MA; Jover A; Ferrer C. 2006. Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. *Rev. Iberoam. Micol.* 23: 26-28.
- Colombo AL; Nucci M; Park BJ; Noue' r SA; Arthington-Skaggs B; Da Mata DA; Wamock D; Morgan J. 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centres. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 2816-2823.
- Cuétara MS., Alhambra A; Del Palacio A. 2006. Diagnóstico microbiológico tradicional de la candidiasis invasora en el enfermo crítico no neutropénico. *Rev. Iberoam. Micol.* 23:4-7.
- Dendis M; Horvath R; Michalek J; Ruzicka F; Grijalva M; Bartos M; Benedik J. 2003. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*. 9: 1191-1202.
- Douglas LJ. 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol.* 19: 139-143.
- Einsele H; Hebart H; Roller G; Loffler J; Rothenhofer I; Muller CA; Bowden RA; Van Burik J; Engelhard D; Kanz L; Schumacher U. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1353-1360.
- Ellepola ANB y Morrison CJ. 2005. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. *The Journal of Microbiology*. 43: 65-84.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Espy MJ; Uhl JR; Sloan LM; Buckwalter SP; Jones MF; Vetter EA; Yao JD; Wengenack NL; Rosenblatt JE; Cockerill FR; Smith TF. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 19: 165-256.
- Filioti J; Spiroglou K; Roilides E. 2007. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. *Intensive Care Med*. 33: 1272-1283.
- Fleischmann J y Howard DH. 1988. The DNA content of nongerminating variants of *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*. 16:765.
- Fujita SI; Senda Y; Nakaguchi S; Hashimoto T. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 3617-3622
- Galán A; Veses V; Murgui A; Casanova M; Martínez JP. 2006. Rapid PCR-based test for identifying *Candida albicans* by using primers derived from the ph-regulated *KER1* gene. *FEMS Yeast Res*. 6: 1094-1100.
- Guo S; Bhattacharjee JK. 2006. Novel lysine biosynthetic gene sequences (LYS1 and LYS5) used as PCR targets for the detection of the pathogenic *Candida* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72: 416-420.
- Hernández HF; Córdova ME; Manzano GP; López AR; Bazán ME; López MR. 2003. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud Pública de México*. 45: 455-460.
- Hsu MC; Chen KW; Lo HJ; Chen YC; Liao MH; Lin YH; Li SY. 2003. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 1071-1076.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Innings A; Ullberg M; Johansson A; Rubin CJ; Noreus N; Isaksson M; Herrmann B. 2007. Multiplex Real-Time PCR Targeting the RNase P RNA Gene for Detection and Identification of *Candida* species in Blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 874-880.
- Jordan JA. 1994. PCR Identification of Four Medically Important *Candida* species by Using a Simple Primer Pair. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 2962-2967.
- Kan VL. 1993. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *Journal Infect. Disease*. 168: 779-783.
- Karthaus M., Cornely OA. 2007. Treatment options in candidaemia. *Mycoses*. 50: 44-49.
- Kirkpatrick WR; Revankar SG; McAtee RK; López RJL; Fothergill AW; McCarthy DI; Sánchez SE; Cantu RA; Rinaldi MG; Patterson TF. 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:3007-3012.
- Kojic EM y Darouiche RO. 2004. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews*. 17: 255-267.
- Lau A; Chen S; Sorrell T; Carter D; Malik R; Martin P; Halliday C. 2007. Development and Clinical Application of a Panfungal PCR Assay To Detect and Identify Fungal DNA in Tissue Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 380-385.
- Leaw SN; Chang H; Barton R; Bouchara JP; Chang TS. 2007. Identification of Medically Important *Candida* and Non-*Candida* Yeast Species by an Oligonucleotide Array. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2220-2229.
- Leaw SN; Chang HC; Sun HF; Barton R; Bouchara JP; Chang TC. 2006. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 693-699.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Linton CJ; Borman AM; Cheung G; Holmes AD; Szekely A; Palmer MD; Bridge PD; Campbell CK; Johnson EM. 2007. Molecular Identification of Unusual Pathogenic Yeast Isolates by Large Ribosomal Subunit Gene Sequencing: 2 Years of Experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*.45: 1152-1158.
- Loeffler J; Schmidt K; Hebart H; Schumacher U; Einsele H. 2002. Automated Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeast Species and Filamentous Fungi by Using the MagNA Pure LC System. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2240-2243.
- López MR; Méndez TLJ; Hernández HF; Castañón OR. 1995. *Micología Médica. Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio*. Editorial Trillas. México, D.F
- Lugert R; Schettler C; Gross U. 2006. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens *in vitro*. *Mycoses*: 49: 298-304
- Luo G y Mitchell TG. 2002. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* . 40: 2860-2865.
- Maaroufi Y; De Bruyne JM; Duchateau V; Georgala A; Crokaert F. 2004. Early Detection and Identification of Commonly Encountered *Candida* Species from Simulated Blood Cultures by Using a Real-Time PCR-Based Assay. *Journal of Molecular Diagnostics*. 6: 108-114.
- Maaroufi Y; Heymans C; De Bruyne JM; Duchateau V; Rodríguez H; Aoun M; Crokaert F. 2003. Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Blood Samples by Using a TaqMan-Based PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 3293:3298.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- McNeil MM; Nash SL; Hajjeh RA; Phelan MA; Conn LA; Plikaytis BD; Warnock DW. 2001. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin. Infect. Dis.* 33: 641-647.
- Méndez TLJ; López MR y Hernández HF. 2006. VI Diplomado en Micología Médica “Dr. Ernesto Macotela Ruíz”. Actualidades en Micología Médica. 3º edición. Facultad de Medicina, UNAM. México D.F
- Metwally L; Hogg G; Coyle PV; Hay RJ; Hedderwick S; McCloskey B; O’Neill HJ; Ong GM; Thompson G; Webb CH; McMullan R. 2007. Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and –resistant species of *Candida* directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology.* 56: 964-970.
- Meyer MH; Letscher.Bru V; Jaulhac B; Waller J; Candolfi E. 2004. Comparison of Mycosis IC/F and Plus Aerobic/F Media for Diagnosis of Fungemia by the Bactec 9240 System. *Journal of Clinical Microbiology.* 42: 773-777.
- Morace G; Pagano L; Sanguinetti M; Posteraro B; Mele L; Equitani F; D’amore G; Leone G; Fadda G. 1999. PCR-Restriction Enzyme Analysis for Detection of *Candida* DNA in Blood from Febrile Patients with Hematological Malignancies. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 1871-1875.
- Odds FC y Bernaerts R. 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology.* 32: 1923-1929.
- Panackal AA; Gribskov JL; Staab JF; Kirby KA; Rinaldi M; Marr KA. 2006. Clinical Significance of Azole Antifungal Drug Cross-Resistance in *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology.* 44: 1740-1743.
- Pfaller MA y Diekeman DJ. 2007. Epidemiology of invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews.* 20: 133-163.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Pfaller MA; Diekema DJ; Gibbs DL; Newell VA; Ng KP; Colombo A; Finkelstein J; Barnes R; Wadula J. 2008. Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 842-849.
- Pfaller MA; Jones RN; Doern GV; Sader HS; Hollis RJ; Messer SA. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1886-1889.
- Philip A; Odabasi Z; Matiuzzi G; Paetznick VL; Tan SW; Warmington J; Rex JH; Ostrosky-Zeichner L. 2005. Syscan3, a Kit for Detection of Anti-*Candida* Antibodies for Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 4834-4835.
- Pincus DH; Orenga S; Chatellier S. 2007. Yeast identification; past, present, and future. *Medical Mycology*. 45: 97-121.
- Pontón J. 2006. El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 23: 20-25.
- Quindós G., Moragues, M.D., Pontón J. 2004. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis?. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 10-14.
- Sandven P. 2000. Epidemiology of candidemia. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 73-81.
- Sarvikivi E; Lyytikäinen O; Soll DR; Pujol C; Pfaller MA; Richardson M; Koukila-Kahkola P; Luukkainen P; Saxen H. 2005. Emergence of Fluconazole Resistance in a *Candida parapsilosis* Strain That Caused Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 2729-2735.



## X. BIBLIOGRAFÍA

- Schabereiter-Gurtner C; Selitsch B; Rotter ML; Hirschl AM; Willinger B. 2007. Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 906-907.
- Schwesinger G; Junghans D; Schroder G; Bernhardt H; Knoke M. 2005. Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. *Mycoses*. 48: 176-180.
- Segal E. 2005. *Candida*, still number one: what do we know and where are we going from there?. *Mycoses*. 48: 3-11.
- Selvarangan R; Bui U; Limaye AP; Cookson BT. 2003. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5660-5664.
- Sendid B; Poirot JL; Tabouret M; Bonnin A; Caillot D; Camus D; Poulain D. 2002. Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Microbiology*. 51: 433-442.
- Shin JH; Nottle FS; Morrison CJ. Rapid Identification of *Candida* species in Blood Cultures by a Clinically Useful PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1454-1459.
- Smith MB; Dunklee D; Vu H, Woods GL. 1999. Comparative performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical yeast system. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2697-2698
- Sullivan DJ y Coleman D. 1998. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 329-334

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Tintelnot K; Haase G; Seibold M; Bergmann F; Staemmier M; Franz T; Maermann D. 2000. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 1599-1608.
- Tumbarello M; Posteraro B; Treccarichi EM; Fiori B; Rossi M; Porta R; Donati K; La Sorda M; Spanu T; Fadda G; Cauda R; Sanguinetti M. 2007. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 1843-1850.
- Vollmer T; Stormer M; Kleesiek K; Dreier J. 2008. Evaluation of Novel Broad-Range Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Human Pathogenic Fungi in Various Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: 1919-1926.
- Wahyuningsih R; Freisleben HJ; Sonntag HG; Schnitzler P. 2000. Simple and Rapid Detection of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3016-3021.
- White PL; Archer AE; Barnes RA. 2005. Comparison of Non-Culture-Based Methods for Detection of Systemic Fungal Infections, with an Emphasis on Invasive *Candida* Infections. 43: 2181-2187)
- White PL; Shetty A; Barnes RA. 2003. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *Journal Medical Microbiology*. 52: 229-238.
- Wise MG; Healy M; Reece K; Smith R; Walton D; Dutch W; Renwick A; Huong J; Young S; Tarrand J; Kontoyiannis DP. 2007. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 778-787.
- Yeo SF; Wong B. 2002. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 465-484.

### Reactivos

- Trizma base. Sigma T-6006 L 123K5416
- Tris HCl. Sigma T-7149 L45H5703
- Bromuro de etidio. Sigma E-8751 L 36H3687
- EDTA. Sigma E-5134 L 36H1325
- Azul de bromofenol. Sigma B-8026 L29H3653
- 2-mercaptoetanol. Sigma M-3148 L 119H091415
- SDS. Gibco BRL Cat.15525-017 L 98NO166
- Agarosa. Invitrogen Cat. 15510-027 L 1120718
- NaCl. Laboratorios Lartz. Cat. 4645 L 050490
- Alcohol etílico absoluto. JT Baker 901402 L C43C30
- Fenol. Sigma P-4557 L 023K0622
- Cloroformo. J.T. Baker 9180-02 L T13C57
- Ácido bórico. Sigma B9645-5005 L 083K00551
- Liticasa. Sigma L5263-25KU
- QIAamp DNA mini kit (50). QIAGEN Cat. 51304 L 127146899
- Marcador de 100 pb. Invitrogen Cat. 15628-019 L 269421
- Marcador de 100 pb. AMRESCO K180-250UL L 2227B020
- Marcador lambda DNA/*Hind III*. Invitrogen Cat. 15612-013
- Soluciones de dNTP (100mM). Invitrogen Cat. 10297-018 L 1321841
- Iniciadores. Invitrogen
- Taq polimerasa 250 U, Amortiguador de reacción 10X y MgCl<sub>2</sub> 20X.  
BIOGENICA EA 250
- Extracto de levadura. BIOXON Cat. 155-3 L B230524C
- Peptona bacteriológica. OXOID L34

- Glucosa monohidratada. MERCK K30298642/232
- Agar-Agar. DIBICO Cat. 1001-E L 6535015
- Agar dextrosa Sabouraud. BIOXON 210700 L 8165413
- CHROMagar Candida. (Paris Francia)

### Soluciones

- **Regulador de lisis** (Tris- HCl 50 mM, pH 7.2, EDTA 50 mM, SDS 3 %, Mercaptoetanol 1 %) y Proteinasa K a una concentración final de 200 µg/ml (20 mg/mL)
- **Regulador TBE** (Tris-base 54 g/L, Acido bórico 27.5 g/L, EDTA 0.5 M, pH 8.0)
- **Regulador de lisis para eritrocitos** (Tris HCl 10 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 10 mM)
- **Regulador de lisis para leucocitos** (Tris HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0.2%)
- **Solución de Liticasa** (150 U de liticasa en Tris HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 7.8 y β mercaptoetanol 28 mM)
- **Agar YPD** (dextrosa 2%, extracto de levadura 1% y peptona 2%)

### Aparatos

- Espectrofotometro (Ultrospec 1100 pro. Amersham pharmacia biotech )
- Transiluminador (UV Transilluminator Modelo M-20E)
- Termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400)
- Incubadora. (Barnstead Lab. Line Modelo 18022)
- Centrifuga. (Eppendorf AG)

## **XII. APENDICE I**

- Campana de flujo laminar vertical (VECO)
- Cámara de electroforesis (Accesolab)
- Micropipetas (RAININ Modelo METTLER AT261)

INTEGRACIÓN TOTAL DE LA INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

XIII. APENDICE

No	Clave	Lugar de procedencia	Edad	Diagnóstico	Muestra	Cultivo en SDA	CHROMagar	PCR con iniciadores especie-especificos	PCR con iniciadores universales
1	457	HRGIZ	36	VIH+SD	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
2	08-193	HECMSsXXI	40	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo pcr d
3	170	HICMLR	ND	Neumonía	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
4	104	HRGIZ	63	EVC	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
5	08-184	HECMSsXXI	ND	ND	Líquido	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
6	171	HICMLR		Neumonía	Espujo	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
7	105	HRGIZ	ND	EVC	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo
8	08-256	HECMSsXXI	49	Trasplante renal. Pb Neumocistos	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
9	08-275	HECMSsXXI	ND	Micosis	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. tropicalis</i>	* <i>C. tropicalis</i>	Negativo pcr d
10	613-06	HGM	ND	ND	LCR	Negativob	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
11	08-20	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
12	2508	HGDF	ND	Septicemia	Líquido vesícula	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y * <i>C. tropicalis</i>	Positivo
13	421-08	HGM	29	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
14	152	HRGIZ	ND	Plaquetopenia	Secreción	Negativob	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
15	C547	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativob	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo pcr d
16	LCR	HGM	20	ND	LCR	Negativoc	Negativo	Negativo	Positivo
17	17	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
18	18	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d

INTEGRACIÓN TOTAL DE LA INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

XIII. APENDICE

19	19	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativob	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
20	20	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
21	21	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
22	22	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
23	23	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo pcr d
24	24	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
25	25	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	* <i>C. glabrata</i> y * <i>C. tropicalis</i>	Negativo pcr d
26	188	HICMLR	ND	Abceso pulmonar	Espuito	Positivo	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
27	248	HICMLR	ND	TB	Espuito	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
28	26	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
29	27	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
30	289	HICMLR	ND	TB	Espuito	Positivo	<i>C. glabrata</i>	Negativo	Negativo pcr d
31	536-08	HGM	22	ND	Orina	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
32	496-08	HGM	63	ND	Espuito	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
33	08-258	HECMSsXXI	ND	Micosis pulmonar	Líquido pleural	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
34	29	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
35	30	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
36	31	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativa	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
37	32	HECMSsXXI	ND	ND	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
38	628-08	HGM	21	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
39	416	HGM	32	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
40	617-08	HGM	30	ND	Espuito	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
41	485-08	HGM	66	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo

INTEGRACIÓN TOTAL DE LA INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

XIII. APENDICE

42	607	HRGIZ	63	Sepsis	Médula ósea	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
43	610	HRGIZ	34	VIH/TB	Sangre	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
44	08-377	HECMSsXXI	42	Trasplante hepático	Líquido ascitis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
45	662	HRGIZ	52	EIE	Líquido pleural	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo*
46	677	HRGIZ	ND	Derrame pleural + IRC	Líquido pleural	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
47	78	HRGIZ	44	TB pulmonar	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
48	74	HRGIZ	70	Neumonía adquirida IH	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. tropicalis</i>	Positivo
49	75	HRGIZ	49	EVC + Pb Neumonía IH	Cánula oro traqueal	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
50	1981	HRGIZ	ND	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Positivo
51	459	HICMLR	ND	TB	Espudo	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
52	460	HICMLR	ND	VIH	Espudo	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
53	426	HICMLR	ND	VIH	Espudo	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
54	43	HGM	42	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
55	656-08	HGM	ND	ND	Espudo	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
56	676-08	HGM	40	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo
57	998-08	HGM	39	ND	Líquido ascitis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
58	1979	HGM	60	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	Positivo



INTEGRACIÓN TOTAL DE LA INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

XIII. APENDICE

59	777	HRGIZ	85	Adenocarcinoma pulmonar	Líquido pleural	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
60	101	HRGIZ	59	EVC + AMV	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
61	768	HRGIZ	ND	LES/ Derrame pleural	Líquido pleural	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
62	854	HRGIZ	55	Derrame pleural + sepsis	Líquido pleural	Neagtivo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
63	511	HICMLR	ND	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
64	1012-08	HGM	24	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
65	08-512	HECMSsXXI	38	Trasplante renal. Micosis pulmonar o TB	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	Negativo pcr d
66	825	HRGIZ	32	VIH + TB	Ganglio	Negativo	Negativo	<i>C. tropicalis</i>	Negativo pcr d
67	08-530	HECMSsXXI	57	Cirrosis hepática	Líquido de ascitis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
68	519	HICMLR	ND	ND	Espuito	Positivo	<i>C. tropicalis</i> y <i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Positivo
69	543	HICMLR	ND	ND	Espuito	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
70	08-546	HECMSsXXI	40	TB. Micosis	Líquido peritoneal	Negativo	Negativo	Negativo	N egativo pcr d
71	08-505	HECMSsXXI	40	HIV. Pb Micosis	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	Positivo
72	24DV	HRGIZ	45	Bronquiectasi	Espuito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d

**INTEGRACIÓN TOTAL DE LA INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS**

**XIII. APENDICE**

				as					
73	24Z	HRGIZ	74	ND	Lavado bronquial	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
74	104	HRGIZ	42	Derrame pleural	Líquido pleural	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d
75	C108	HGM	29	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
76	2719	HGM	27	ND	Espuito	Positivo	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
77	C11	HGM	47	ND	Orina	Positivo	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	Positivo
78	1151-08	HGM	41	ND	Espuito	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>	Positivo
79	C23	HGM	24	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Positivo
80	81	HGM	ND	ND	Lavado bronquial	Positivo	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Positivo
81	08-510	HECMSsXXI	33	IRC	Líquido peritoneal	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo pcr d

- HECMSsXXI Hospital de Especialidades del Centro Médico siglo XXI
- HG M Hospital General de México
- HRGIZ Hospital Regional General Ignacio Zaragoza
- HICMLR Hospital de Infectología Centro Médico La Raza
- HGDF Hospital General Darío Fernández
- LCR Líquido cefalorraquídeo
- IRC Insuficiencia renal crónica
- VIH Virus de la inmunodeficiencia humana
- SD Síndrome desgaste
- TB Tuberculosis
- EVC Enfermedad vascular cerebral
- LES Lupus eritematoso sistémico

## INTEGRACIÓN TOTAL DE LA INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

## XIII. APENDICE

▪	
EIE	Enfermedad intestinal en estudio
ND	No disponible
Pcr d	PCR doble