

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

TRABAJO DE TITULACIÓN DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE CANDIDA  
ALMACENADAS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA CLÍNICA  
DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA, FACULTAD DE  
MEDICINA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL  
ECUADOR EN LA CIUDAD DE QUITO CORRESPONDIENTES AL  
PERÍODO DE ENERO 2000 A AGOSTO 2007

DEGSY DAYANA YÁNEZ DOMÍNGUEZ

DIRECTOR: MTR. ANDRÉS ZABALA

QUITO, 2020

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, DEGSY DAYANA YÁNEZ DOMÍNGUEZ, C.I. 1719158345; autora del trabajo de graduación intitulado: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE CANDIDA ALMACENADAS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA CLÍNICA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA, FACULTAD DE MEDICINA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR EN LA CIUDAD DE QUITO CORRESPONDIENTES AL PERÍODO DE ENERO 2000 A AGOSTO 2007, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Degsy Dayana Yánez Domínguez

C.I. 1719158345

## **DEDICATORIA**

A mi Madre Degsy que con tanto amor siempre estuvo apoyándome para alcanzar mis objetivos, ser mi soporte para culminar esta etapa de mi vida. A mi Padre Edwin por su confianza en mí, mis hermanos Anahí e Isaac que siempre estuvieron animándome para lograr mis metas. A mi novio Julio por su amor incondicional y apoyo en esta etapa.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la salud y voluntad en todo este camino. A mi Madre en especial por confiar en mí siempre, apoyarme y estar en todo momento a mi lado, ser mi inspiración y peldaño en mi vida, mis hermanos por acompañarme en las malas noches y ser mi motor para completar un objetivo más en mi vida, mi padre porque gracias a su esfuerzo estoy terminando mi carrera universitaria y mi novio Julio por incentivar-me a dar siempre lo mejor de mí.

A la Pontificia Universidad Católica de Ecuador, Facultad de Medicina por permitirme completar con mis estudios en tan prestigiosa universidad y abrirme las puertas de las instalaciones para realizar la investigación.

A mi director de tesis, Mtr. Andrés Zabala y mis lectores por su apoyo, consejos, paciencia y ayuda en la elaboración de la disertación.

A mis amigos Francisco, Dennise, Lucía, Adriana quienes estuvieron colaborando con la investigación y alentándome en cada momento durante toda la carrera.

## RESUMEN

**Introducción:** Actualmente las técnicas fenotípicas en el laboratorio de Micología Clínica presentan muchas dificultades, ya que no se logra la identificación de género y especie haciendo necesario el desarrollo de técnicas moleculares (PCR) y sus variantes. Esta técnica presenta varias ventajas por su rapidez en el análisis, menor riesgo de contaminación y facilidad al manejo de la muestra. El objeto de este estudio fue comparar las prueba molecular de las reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y métodos convencionales para identificar las diferentes especies de *Candida*, incluyendo el sistema API 20C AUX, la técnica de Dalmau y la morfogénesis en agar harina de maíz.

**Materiales y métodos:** El presente estudio fue de tipo observacional descriptivo para la identificación de género y especie de 170 cepas de *Candida* almacenadas en el cepario del laboratorio de Micología de la Carrera de Bioquímica Clínica-PUCE, utilizando métodos de identificación fenotípica (prueba Dalmau, tubo germinal y Api) y genotípica, se aplicó una PCR con ayuda de cebadores específicos para las siguientes especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. auris*. A las cepas que presentaron discrepancias en la identificación genotípica y no se encontraron entre los cebadores a usar se realizó correlación entre la técnica Dalmau y el API 20C AUX.

**Resultados:** Entre las 170 cepas de candidas, la más frecuente en todo el estudio fue *C. albicans* 58% (99/170), seguido de *C. tropicalis* 25% (42/170), *C. glabrata* 6% (11/170), *C. guilliermondii* 5% (9/170), *C. parapsilosis* 2% (3/170) y *C. krusei* 1% (1/170). *C. auris* no se encontró en el estudio. Se reconocieron cepas identificadas como *C. famata* 1% (2/170) y *C. lusitaniae* 1% (2/170) que se identificaron por el sistema API 20C AUX.

Al comparar los resultados obtenidos por el método fenotípico y el genotípico se obtuvo un índice kappa de 0.77 entre la técnica Dalmau y la PCR, con una coincidencia del 100% (99/99) para *C. albicans*, 67% (28/42) para *C. tropicalis*, 64% (7/11) para *C. glabrata*, 56% (5/9) para *C. guilliermondii*. En las cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis* solo se logró identificar mediante AHM y no se logró amplificar mediante PCR.

**Conclusiones y recomendaciones:** El agar harina de maíz + Tween 80 resulta útil para la identificación de las especies de *Candida* promoviendo la morfogénesis, principalmente en *C. albicans* y *C. tropicalis*. De acuerdo al índice kappa se obtuvo una buena concordancia entre los métodos utilizados en la investigación sin embargo no es recomendable la sustitución del método Dalmau por la PCR como identificación de especie, ya que se

requeriría la confirmación mediante secuenciación. Se sugiere complementar este estudio comparando otros métodos como CHROMagar, snPCR, Vitek, D1-D2 rDNA, ITS secuenciación, y estudiar a fondo en cada una de las especies los factores de virulencia y los mecanismos de resistencia a los antimicóticos.

**Palabras clave:** PCR, Candida, especies, método genotípico, método fenotípico

## ABSTRACT

**Introduction:** Conventional identification techniques in the Clinical Mycology laboratory currently present many difficulties, since conventional phenotypic tests do not produce accurate gender and species results, making it necessary to develop molecular techniques (PCR) and their variants. This technique has several advantages due to its rapidity in the analysis, lower risk of contamination and ease of handling the sample. The purpose of this study was to compare the molecular tests of the polymerase chain reaction (PCR) and conventional methods to identify the different species of *Candida*, including the API 20C AUX system, the Dalmau technique and morphogenesis in agar flour corn.

**Materials and Methods:** The present study was descriptive observational type for the identification of genus and species of 170 strains of *Candida* stored in the cepary of the Mycology laboratory of the Clinical Biochemistry Career-PUCE, using phenotypic identification methods (Dalmau test, germ tube and Api ) and genotypic, a PCR was applied with the help of specific primers for the following species: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. auris*. To the strains that presented discrepancies in the genotypic identification and were not found among the primers to be used, a correlation was made between the Dalmau technique and the API 20C AUX.

**Results:** Among the 170 strains of candidids, the most frequent in the entire study was *C. albicans* 58% (99/170), followed by *C. tropicalis* 25% (42/170), *C. glabrata* 6% (11/170), *C. guilliermondii* 5% (9/170), *C. parapsilosis* 2% (3/170) and *C. krusei* 1% (1/170). *C. auris* was not found in the study. Strains identified as *C. famata* 1% (2/170) and *C. lusitaniae* 1% (2/170) were identified and identified by the API 20C AUX.

When comparing the results obtained by the phenotypic and genotypic method, a kappa index of 0.77 was obtained between the Dalmau technique and the PCR, with a coincidence of 100% (99/99) for *C. albicans*, 67% (28/42) for *C. tropicalis*, 64% (7/11) for *C. glabrata*, 56% (5/9) for *C. guilliermondii*. In the strains of *C. krusei* and *C. parapsilosis* it was only possible to identify by AHM and amplification by PCR was not achieved.

**Conclusions and Recommendations:** Cornmeal agar + Tween 80 is useful for identification of *Candida* species promoting morphogenesis mostly in *C. albicans* and *C. tropicalis*. According to the kappa index, a good concordance was obtained between the

methods used in the investigation was obtained, which suggests that the PCR cannot be completely substituted for the Dalmau method and confirmation by sequencing would be required. It is recommended to complement this study by comparing other methods such as CHROMagar, snPCR, Vitek, D1-D2 rDNA, ITS sequencing, as well as to study more in depth each of the species referring to virulence factors and resistance to fungal options.

**Keywords:** PCR, Candida, species, genotypic method, phenotypic method

## TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TABLA DE CONTENIDO .....	1
LISTA DE TABLAS .....	4
LISTA DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE ANEXOS .....	6
LISTA DE SIGLAS .....	7
CAPÍTULO I	
1.1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	10
1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 1
1.4. OBJETIVOS .....	12
1.4.1. OBJETIVO GENERAL .....	12
1.4.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	12
1.4.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO .....	13
CAPÍTULO II	
2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL .....	14
2.1.1. Antecedentes .....	14
2.2. MARCO TEÓRICO .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 5
2.2.1. Generalidades .....	15
2.2.2. Especies de Género Candida .....	16
2.2.2.1. <i>C. albicans</i> .....	16
2.2.2.2. <i>C. auris</i> .....	16
2.2.2.3. <i>C. glabrata</i> .....	17
2.2.2.4. <i>C. guilliermondii</i> .....	17
2.2.2.5. <i>C. parapsilosis</i> .....	18
2.2.2.6. <i>C. krusei</i> .....	18

2.2.2.7. <i>C. tropicalis</i> .....	18
2.2.3. Candidiasis .....	19
2.2.4. Características microbiológicas de <i>Candida</i> .....	19
2.2.5. Características genéticas.....	19
2.2.6. Factores de virulencia.....	20
2.2.6.1. Morfología celular .....	20
2.2.6.2. Actividad enzimática extracelular .....	20
2.2.6.3. Factores de adherencia.....	21
2.2.6.4. Hidrofobicidad a la superficie celular .....	21
2.2.6.5. Biopelícula.....	21
2.2.6.6. “Switching” o variabilidad fenotípica y antigénica.....	22
2.2.7. Métodos de diagnóstico .....	22
2.2.7.1. Estudios Morfológicos.....	22
2.2.7.2. Medios de Cultivo .....	23
2.2.7.3. Estudios Bioquímicos .....	24
2.2.7.4. Prueba Rápida: API 20 C AUX.....	24
2.2.7.5. Métodos Automatizados .....	24
2.2.7.6. Métodos Moleculares .....	25
2.3. MARCO CONCEPTUAL .....	26
<b>CAPÍTULO III</b>	
3.1. MARCO METODOLÓGICO .....	28
3.1.1. Materiales y Métodos .....	28
3.1.1.1. Tipo de Estudio.....	28
3.1.1.2. Tipo de Muestreo.....	28
3.1.1.3. Tamaño de Muestra .....	28
3.1.1.4. Criterios de Inclusión .....	28
3.1.1.5. Criterios de Exclusión .....	28
3.1.1.6. Análisis Estadístico.....	29
3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	29
3.2.1. Variable Principal.....	29
3.2.2. Variable Secundaria.....	29
3.3. MATERIALES Y PROCESO .....	33

3.3.1. Materiales .....	33
3.3.2. Reactivos .....	33
3.3.3. Equipos .....	34
3.4. PROCEDIMIENTO .....	34
3.4.1. Fase Uno .....	34
3.4.1.1. Recolección de datos y selección de cepas .....	34
3.4.2. Fase Dos .....	35
3.4.2.1. Control de Calidad .....	35
3.4.2.2. Replicación de cepas de Candidas en Agar Sabouraud .....	35
3.4.3. Fase Tres .....	35
3.4.3.1. Identificación fenotípica de las especies del género Candida .....	35
3.4.3.2. Identificación genotípica de las especies del género Candida .....	37
3.4.4. Fase Cuatro .....	39
3.4.4.1. Análisis de resultados .....	39
<b>CAPÍTULO IV</b>	
4.1. RESULTADOS .....	40
4.1.1. Identificación fenotípica de las especies del género Candida .....	40
4.1.1.1. Tinción Gram .....	40
4.1.1.2. Tubo Germinal .....	40
4.1.1.3. Morfología en Agar Harina de Maíz + Tween 80 .....	42
4.1.2. Identificación genotípica de las especies del género Candida .....	44
4.1.3. Identificación de las especies de Candida con API 20 C AUX .....	46
4.1.4. Concordancia entre métodos .....	47
<b>CAPÍTULO V</b>	
5.1. DISCUSIÓN .....	50
5.2. CONCLUSIONES .....	56
5.3. RECOMENDACIONES .....	58
5.4. BIBLIOGRAFÍA .....	59
5.5. ANEXOS .....	67

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Operacionalización de Variables.....	32
<b>Tabla 2:</b> Secuencias de cebadores utilizados para la identificación de las especies de <i>Candida</i> .....	37
<b>Tabla 3:</b> Preparación de la Master Mix para la identificación de las especies de <i>Candida</i> (Alb, Gla, Gui, Kru, Tro).....	38
<b>Tabla 4:</b> Preparación de la master mix para la identificación de <i>Candida auris</i> y <i>Candida parapsilosis</i> .....	38
<b>Tabla 5:</b> Protocolo para la amplificación de genes de las especies de <i>Candida</i> .....	39
<b>Tabla 6:</b> Morfología en AHM.....	42
<b>Tabla 7:</b> Distribución de la identificación molecular de las especies de <i>Candida</i> .....	45
<b>Tabla 8:</b> Identificación de <i>Candida albicans</i> y no albicans mediante el método de PCR.....	46
<b>Tabla 9:</b> Comparación entre los métodos fenotípicos convencionales y PCR en la identificación de especies de <i>Candida</i> .....	47
<b>Tabla 10:</b> Índice kappa de cada especie de <i>Candida</i> y general de acuerdo al método AHM y PCR.....	48
<b>Tabla 11:</b> Resultados de la identificación de especies de <i>Candida</i> almacenados en la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Coloración Gram en donde se puede observar levaduras ovaladas de coloración morado oscuro, visto en 100x correspondiente a <i>Candida albicans</i> .....	40
<b>Figura 2:</b> Formación de Tubo Germinal: A) Tubo Germinal positivo; <i>C. albicans</i> , B) Tubo Germinal negativo; <i>C. krusei</i> , C) Tubo germinal negativo; <i>C. guilliermondii</i> . Observación en 40x. ....	41
<b>Figura 3:</b> Distribución de Tubo germinal cepas de candidas .....	41
<b>Figura 4:</b> Frecuencia de las diferentes especies de Candida por método AHM.....	44
<b>Figura 5:</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % de los productos de la PCR para la identificación de <i>Candida</i> spp. con sus respectivos pesos moleculares .....	45
<b>Figura 6:</b> Frecuencia de las diferentes especies de Candida por Prueba API 20C AUX .....	46
<b>Figura 7:</b> Correlación entre el resultado de la PCR y el cultivo en AHM para la detección de las cuatro especies de Candida.....	49
<b>Figura 8:</b> Distribución de las especies de Candida.....	49
<b>Figura 9:</b> Gel 1 de agarosa que muestra los resultados obtenidos para la PCR de ADN genómico de levadura aislado.....	69
<b>Figura 10:</b> Gel 2 de agarosa que muestra los resultados obtenidos para la PCR de ADN genómico de levadura aislado.....	69

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Protocolo de extracción de DNA Mini Kit.....	68
<b>Anexo 2:</b> Electroforesis en gel de agarosa de cepas almacenadas .....	69
<b>Anexo 3:</b> Identificación de las cepas de <i>Candida</i> spp. almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la PUCE .....	70

## LISTA DE SIGLAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**AHM:** Agar Harina de Maíz

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CEB:** Células epiteliales bucales

**HSC:** Hidrofobicidad de la superficie celular

**pb:** Pares de base

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa

**PCR-FSP:** PCR- Fragmento Tamaño Polimorfismo

**PCR-RFLP:** Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

**PM:** Fosfolipomananos

**SAP:** Proteasa aspártica secretada

**SBD:** Sabouraud

**snPCR:** Seminested PCR

**Taq:** Polimerasa *Thermus aquaticus*

# CAPÍTULO I

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por hongos oportunistas se dan en hospederos con diversos grados de inmunodeficiencias, o cuando se presentan cambios ambientales. Se encuentran los hongos de la biota normal de la piel o las mucosas. Un microorganismo que es parte de la biota normal en humanos y que puede convertirse en patógeno es el género *Candida*. Puede causar candidiasis superficiales o invasivas y es importante considerar estos tres factores: 1) La mayoría de infecciones micóticas son provocadas por especies de *Candida*. 2) Es importante la identificación rápida y efectiva de la especie para su tratamiento y prevención de resistencias. 3) El procedimiento se basa en varias pruebas (Mouriño, 2010).

Los métodos de identificación deben ser sensibles, específicos, rápidos al momento de identificar las especies de *Candida* mediante aislados primarios. También es importante investigar el perfil de resistencia a los antifúngicos, así como los factores de virulencia del microorganismo (Estrada Barraza et al., 2011; García, Luna, Velasco, & Guerra, 2017; Ceballos Garzón et al., 2019)

Para la identificación adecuada de las cepas de candidas requiere de recursos económicos y humanos, sea para obtener equipos más avanzados o entrenamiento adecuado del personal. Por ellos muchos laboratorios optan por la implementación de métodos fenotípicos como tubo germinal y cultivo en CHROMagar, pero limitan al diagnóstico correcto ya que no se identifican todas las especies de *Candida*. Las pruebas bioquímicas de asimilación y fermentación de carbohidratos, el método de API 20C AUX, métodos automatizados como el sistema Vitek y métodos moleculares no se aplican en varios laboratorios (Daef, Moharram, Eldin, Elsherbiny, & Mohammed, 2014a).

Por lo tanto, las técnicas moleculares como es la PCR y sus variantes, han ayudado al diagnóstico de cepas, ofreciendo herramientas para la caracterización a nivel de especie de estos patógenos. Esta técnica presenta varias ventajas por su rapidez en el análisis, menor riesgo de contaminación y facilidad al manejo de la muestra (García et al., 2017).

Un estudio realizado por Daef et al., (2014b) con un total de 77 cepas de candidas, los agentes más comunes fueron *C. albicans* (22; 38.6%), seguidas por *C. tropicalis* (14; 24.6%), *C. parapsilosis* (13; 22.8%), *C. glabrata* (7; 12.3 %) y *Candida* spp. (1; 1.75%). La comparación entre los métodos fenotípicos tradicionales: formación de tubo germinal, formación de clamidosporas en agar de harina de maíz y observación de los filamentos, crecimiento a 45°C, características de colonias en medio CHROMagar Candida, propiedades de asimilación de carbohidratos detectadas por el sistema API ID 32C) y algunas técnicas moleculares ( PCR mediante el uso de cebadores ITS-1, ITS-3 e ITS 4, PCR-RFLP que los productos ITS1-ITS4 cortan por restricción Msp I y Bln I enzimas) de acuerdo a este estudio se reveló que el medio CHROMagar Candida combinado con el kit API ID 32C produjo muy buenos resultados a comparación de las técnicas moleculares para la identificación de especies de Candida. Dado que estos métodos fenotípicos eran simples en relación con las técnicas moleculares. Por ello concluyen que al utilizar el medio CHROMagar Candida arrojaron los mismos resultados (100%) que la PCR en la identificación de especies de Candida. Se encontró una pequeña discrepancia al identificar fenotípicamente *C. parapsilosis* pero no se encuentra resultado en método molecular probando con todos los cebadores usados en el estudio (Daef et al., 2014a).

La investigación se organizó en cinco capítulos. Capítulo I da una visión general sobre la problemática de los métodos de identificación a las especies de Candida y argumenta la importancia del estudio. El capítulo II describe los estudios sobre los métodos convencionales y moleculares que se han realizado a este microorganismo y se expone el fundamento teórico del género Candida y las especies más importantes. El Capítulo III detalla el tipo de estudio y muestras utilizadas, asimismo se puntualizan los materiales y métodos empleados. El Capítulo IV presenta los hallazgos de esta investigación y los representa en tablas y gráficos. Finalmente, el Capítulo V se da respuesta a la pregunta de investigación con análisis crítico a los resultados obtenidos y las recomendaciones para estudios similares.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas moleculares correctamente estandarizadas e implementadas son una opción diagnóstica, al ser comparada con técnicas convencionales no solo brinda tiempos de respuesta más rápidos, con mayor sensibilidad y especificidad; sino también permite la disminución de costos operativos (Liguori et al., 2010) y ofrece un panel más especializado en relación a las cepas circulantes del país. El aislamiento puro de las cepas no es un requisito necesario, en el caso de existir una coinfección con otro microorganismo, los cebadores utilizados en la PCR son altamente específicos. Además, el límite de detección es mínimo puesto que no requiere grandes cantidades del material genético para su detección (Taira, Okay, Delgado, Ceccon, et al., 2014).

Los métodos fenotípicos convencionales para la detección de hongos tardan varios días y es un parámetro crítico en la identificación ya que cualquier retraso afectará drásticamente el pronóstico cuando se trate de candidiasis invasiva y complicará una administración relevante. Actualmente se ha reportado un aumento en la presencia de candidiasis en pacientes susceptibles sometidos a procedimientos invasivos, neoplasias, enfermedades crónicas debilitantes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y que han recibido trasplantes, por lo que es necesario realizar un monitoreo y vigilancia epidemiológica de las especies de *Candida* (Ortigoza Medrano & Arroyo Espinosa, 2014). La aparición de nuevas especies, y el surgimiento de levaduras resistentes hacen necesario el control de los perfiles de susceptibilidad que van ligados de una correcta identificación (López Ávila, Dzul Rosado, Lugo Caballero, Arias León, & Zavala Castro, 2016).

Estas técnicas se convierten entonces en métodos de referencia alcanzando una sensibilidad óptima (Estrada Barraza, Dávalos Martínez, Flores Padilla, Mendoza De Elias, & Sánchez Vargas, 2011). Permitiendo dar diagnóstico oportuno y por ende el tratamiento adecuado en aislamientos de importancia clínica. Este proyecto se realizó con la finalidad de realizar estudios académicos en beneficio a la universidad, mejorar las limitantes ya mencionadas de las técnicas fenotípicas, la falta de concordancia entre identificación de levaduras por morfología y molecular ya que muchas veces es inexacto o inexistente, provocando errores en el diagnóstico y mal manejo de la terapia además de un mal

monitoreo epidemiológico. Además, el tiempo requerido para el diagnóstico / identificación también es crítico, ya que cualquier retraso afectará drásticamente el pronóstico cuando se trate de candidiasis invasiva y complicará una administración relevante.

### **1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las técnicas convencionales de identificación en el laboratorio de micología clínica, actualmente presentan muchas dificultades, ya que las pruebas convencionales fenotípicas no llegan a dar resultados de género y especie, conduciendo generalmente a la identificación errónea y por lo tanto la permanencia prolongada de los pacientes (Estrada-Barraza et al., 2011).

El uso de técnicas automatizadas como el Vitek®2 aunque altamente sensible y específico dependerán del cultivo primario es decir la obtención de colonias completamente aisladas lo que aumenta el tiempo de respuesta. También es necesario un laboratorio que cumpla con normas de bioseguridad y equipamiento apropiado, experticia del operador y altas concentraciones del microorganismo (Ochiuzzi, Cataldi, Guelfand, Maldonado, & Arechavala, 2014). Por otro lado, el agar cromogénico también muy utilizado en el país brinda resultados sensibles y específicos (Daef et al., 2014a); sin embargo, depende de igual manera de un cultivo primario y de las exigencias ya expuestas. Su principal limitante es que no permite la identificación de todas las especies del género *Candida*.

Para solucionar el inconveniente anteriormente descrito es necesario el uso de diferentes técnicas que puedan abarcar todas las especies de *Candida* (Daef et al., 2014a). Una prueba bioquímica comercial es API 20 C AUX que ha contribuido a que los laboratorios puedan identificar con mayor éxito las especies de *Candida*, pero es necesario los requisitos antes mencionados en las otras técnicas, software especializado y tiempo de cultivo prolongado (Biomérieux S.A., 2010).

Las técnicas moleculares PCR optimizan el tiempo de respuesta y a su vez identifican especies que reportan resistencia como *Candida krusei* y *Candida glabrata*, mejorando así

la eficacia en la terapia (Pagès et al., 2017), además que al ser altamente precisa permiten la vigilancia epidemiológica.

El error en la identificación de las especies de *Candida* conduce a un tratamiento inadecuado y el uso indiscriminado de antifúngicos como parte del tratamiento empírico, contribuyendo a que en la actualidad se reporten resistencia a las principales opciones terapéuticas (López Ávila et al., 2016).

**Pregunta del problema:** ¿Cuáles son las características moleculares de las especies de *Candida* almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en la ciudad de Quito correspondientes al período de enero 2000 a agosto 2007?

#### **1.4. OBJETIVOS**

##### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Identificar las características moleculares de las especies de *Candida* almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en la ciudad de Quito correspondientes al período de enero 2000 a agosto 2007.

##### **1.4.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Determinar mediante técnicas fenotípicas las especies de *Candida* almacenadas en el cepario del laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE en los periodos mencionados.
- Identificar el género y especie de las cepas de candidas almacenadas del laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE con la aplicación de la técnica PCR.
- Establecer el nivel de concordancia entre las técnicas fenotípicas y genotípicas para la identificación de las cepas de *Candida* spp. almacenadas en la PUCE.

### **1.4.3. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO**

La información y conclusión obtenidas de este estudio solo serán aplicables a las cepas almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina correspondientes al período de enero 2000 a agosto 2007.

## CAPÍTULO II

### 2.1. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1.1. Antecedentes

En Ecuador la incidencia de infecciones ocasionadas por *Candida* spp. oscila de 0.2 a 0.46 casos por 10000 pacientes, con una mortalidad del 40%, datos que coinciden con países como Colombia y Estados Unidos en los cuales estas infecciones ocupan el cuarto lugar dentro del rango de mortalidad (Arias et al., 2012; Falagas, Roussos, & Vardakas, 2010).

Galarza & Herrera, (2012) realizaron un estudio en el Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito, sobre la prevalencia de candidemia según el tipo de material para hemocultivo automatizado, se estudiaron 90 pacientes de diferentes servicios del hospital (Unidad de Cuidados Intensivos, Cirugía y Gastroenterología), obteniendo una prevalencia de 7.8%. La candidemia fue más común en quienes tenían colonización concurrente por candida no sistémica seguida de ventilación mecánica y antibióticoterapia, concluyendo que las infecciones asociadas a la atención en salud, causadas por levaduras son provocados en un 80% de los casos por especies de *Candida*.

Por otro lado, de acuerdo con una revisión de Jafari y colaboradores, (2017), se argumentó que, en la década de 1980, *C. albicans* representaba más del 80% de todos los aislados de candidas recuperados durante una infección de levadura relacionada a la atención en salud, sin embargo, este dato dista de lo encontrado en la actualidad ya que *C. albicans* constituye menos del 50% de todos los aislados, predominando las demás especies de este microorganismo. En un artículo realizado por Sardi y colaboradores (2013), concuerdan que el aumento de mortalidad encontrado es debido a infecciones relacionadas con especies de *Candida no albicans*.

Mediante un estudio de comparación entre la (PCR) y métodos convencionales para la identificación de especies de *Candida* realizado por Estrada-Barraza y colaboradores (2011), se estudiaron 79 aislamientos clínicos usando como métodos fenotípicos al: Chromagar *Candida*, morfogénesis en agar harina de maíz; demostrando que la

identificación por estos métodos se requiere de tiempos largos, permiten una identificación presuntiva rápida de *C. albicans* directamente al observar el color de las colonias aisladas mediante Chromagar teniendo una alta sensibilidad y especificidad para esta especie pero hay que tomar en cuenta que existen diferentes especies y este método tiene el limitante de reconocer solamente 4 especies y se requiere de altos costos. Otro método que se usó fue ATB ID32C ha sido elegido como el estándar de oro por diversos autores al igual API 20C por su amplio número de pruebas, pero se requiere de tiempos largos para la identificación (18 a 72 horas) y como método genotípico el PCR teniendo alta especificidad y sensibilidad (100%) con respecto al sistema ID32C AUX ya que tiene la gran capacidad de identificar las diferentes especies de *Candida* y en menor tiempo (2-16 horas).

Otro estudio similar realizado en Irán por Jafari y colaboradores (2017), con 20 cepas estándar suministradas por Teikyo University Institute of Medical Mycology (TIMM), Tokio, Japón y 87 aislados clínicos que formaban parte de una gran colección ya aislada de varias muestras clínicas obtenidas de diferentes hospitales en Teherán, Irán dando un total de 107 cepas. La identificación de los aislados se realizó mediante tres métodos: el uso de CHROMagar como método fenotípico convencional, PCR-RFLP y PCR-FSP como métodos genotípicos. Concluyendo que el uso de CHROMagar identificó 29 cepas (33.3%) mientras que ambos ensayos moleculares PCR-RFLP y PCR-FSP, facilitó la identificación de 83 (95.4%) y 80 (91.9%) aislados clínicos, respectivamente. Así evidenciando que los métodos de PCR permite la selección de la técnica más eficiente para una diferenciación rápida y correcta.

## **2.2. MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1. Generalidades**

El género *Candida* es un grupo heterogéneo de levaduras que mide aproximadamente 4-6 $\mu$ . Su reproducción es asexual por blastosporos que se incluyen dentro de los hongos imperfectos. Estos no producen la formación de ascosporas ni teliosporas. Mayormente estas especies son dimórficas. Pueden formar filamentos verdaderos y pseudofilamentos en el tejido o en cultivos. Si se trata de un saprobio, sólo existe blastosporas. *C. albicans* forma parte de la flora normal de cavidades y pueden encontrarse en gran cantidad de

superficies. Estos se consideran agentes oportunistas causantes de micosis superficiales y profundas (López, Giro, Ramos, Ramadán, & Bulacio, 2005).

### **2.2.2. Especies de Género Candida**

Las especies de Candida son organismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi. Su alimentación proviene de materia orgánica en descomposición (sapro=putrefacto y fyton=planta) (Buzón et al., 2017). Estos organismos son referentes al Phylum Ascomycotina, comensales de la mucosa humana y animal que causan una amplia gama de enfermedades debilitantes en pacientes inmunocomprometidos y otros individuos susceptibles (Dabiri, Shams-Ghahfarokhi, & Razzaghi-Abyaneh, 2018).

Se han identificado 150 especies, de las cuales 15 han sido considerados como patógenos: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* y *C. norvegensis* (Yapar, 2014).

#### **2.2.2.1. *C. albicans***

Es el agente más conocido en el reino Fungi, patógeno oportunista que existe como comensal inofensivo en el aparato digestivo y aproximadamente el 75% de las mujeres han sufrido de infección por candida. Principal agente que produce Candidiasis de la mucosa del TGI y el más aislado en candidemias en Argentina y el mundo. Su aislamiento invasivo se asocia mayormente a pacientes inmunocomprometidos (mayormente con cáncer), infecciones mucocutáneas, pielonefritis, peritonitis, infecciones hematógenas, meningitis e infecciones hepatoesplénicas (Academy, Academy, & Trakt, n.d.; García et al., 2017; Kabir, Hussain, & Ahmad, 2012).

#### **2.2.2.2. *C. auris***

Esta especie se describió en el 2009 en Japón posterior a eso de informaron casos en Corea por infección en el torrente sanguíneo determinando que esta especie puede causar infecciones invasivas. Pronto se empezó a diseminar en varias partes del mundo.

*C. auris* es un patógeno emergente, multirresistente asociado a la asistencia sanitaria con una alta tasa de mortalidad. Exhibe resistencia al fluconazol y a varios azoles, anfotericina B. Fenotípicamente se parece a *C. haemulonii* por lo que requiere el uso de métodos

moleculares, pero no se encuentra disponible inmediatamente pero su identificación se da por MALDI-TOF o secuenciación de la región D1-D2 del 28S rDNA (Lockhart et al., 2016).

En 2015, se notificó a la CDC varios brotes que empezaron en Pakistán y continuaron a la India y Sudáfrica, al igual notificando casos en Venezuela, así alertando al centro de control sobre el aumento de esta especie y para mejorar comprender la epidemiología al igual el grado de resistencia (Lockhart et al., 2016).

#### 2.2.2.3. *C. glabrata*

Clasificada inicialmente como *Cryptococcus glabratus* en 1917, se define como una levadura con colonias lisas, blanda y color crema. En la Morfología se presenta en forma de ovoides abundantes, estas son incapaces de formar pseudohifas o pseudomicelios, como máximo pueden formar una corta cadena de levaduras ovoides. La gemación es multilateral ya que no produce cápsula ni artrosporas, refiriéndose a una levadura haploide a diferencia de *C. albicans* (Torres Rodriguez, Morera, & Lopez, 2015).

Se considera a esta especie de *Candida* como un patógeno emergente, ya que un número considerable de cepas pueden ser resistentes a los antifúngicos triazólicos y menos susceptible al Fluconazol. De acuerdo a su frecuencia se tiene un porcentaje bajo de (2,64%) en Latinoamérica y es la especie más frecuente en 2 lugar en Estados Unidos (Academy et al., n.d.). Referente a su población destaca en los pacientes ancianos (27%) y pacientes con prótesis dental (estomatitis) del 22-25%. También se puede observar un 5-25 % en estómago y con el mismo porcentaje en mujeres sin vaginitis (Torres Rodriguez et al., 2015).

Los mecanismos de resistencia a los azoles se debe a un aumento en la síntesis de ergosterol dependiente del citocromo P-450 y la ayuda de la bomba de eflujo que se activa por el fluconazol (Torres Rodriguez et al., 2015).

#### 2.2.2.4. *C. guilliermondii*

Es una especie poco común que se asocia con candidiasis sistémica y endocarditis, en adictos a drogas intravenosas. Aunque existe poca información sobre la epidemiología y el perfil de susceptibilidad de esta especie se tienen un reporte de Pfaller et al., 2006 donde se tiene 1,029 aislamientos clínicos de *C. guilliermondii* teniendo un aumento en América

Latina de 0,6 – 1,1% a 3,7%. No se encuentra resistencia a los azoles entre los aislados contra la caspofungina, tiene una resistencia reducida al fluconazol y es la 6ta especie más frecuencia en el estudio se considera un patógeno emergente en América Latina. Se debe tomar en cuenta que existe poca información sobre epidemiología y perfil de susceptibilidad de *C. guilliermondii* (García et al., 2017; Pfaller et al., 2006).

#### 2.2.2.5. *C. parapsilosis*

Se lo aisló por primera vez en Puerto Rico en 1928. Es un microorganismo diploide con células redondeadas, ovaladas o alargadas y produce pseudohifas, pero es incapaz de formar hifas verdaderas. Recientemente es considerada esta especie como un importante patógeno emergente, por crecimiento en infecciones clínicas.

Se ha aislado comúnmente a equipos médicos su mal uso, contaminaciones, profesionales del área de salud y principalmente con infecciones en neonatos. En Argentina es el 2do agente más aislado detrás de *C. albicans* (Academy et al., n.d.; Treviño Rangel, González González, Garza González, & González, 2012).

#### 2.2.2.6. *C. krusei*

Se encuentra mayormente en pacientes con neoplasias hematológicas, candidemia, endoftalmitis, diarrea en neonatos y para receptores de trasplantes (especialmente de médula ósea). De acuerdo a su frecuencia se observa mayor porcentaje en República Checa y menor en Indonesia, Corea del Sur y Tailandia. Se le ha reconocido como un patógeno fúngico potencialmente resistente a múltiples fármacos por su resistencia intrínseca al fluconazol pero poco común (García et al., 2017; Pfaller et al., 2008).

#### 2.2.2.7. *C. tropicalis*

Ha sido identificada como la especie de levadura más frecuente de *Candida no albicans*. Se conoce que *C. albicans* ha causado con mayor frecuencia las enfermedades en pacientes inmunocomprometidos de candidiasis, pero se han registrado aumentos a nivel mundial de *C. tropicalis* por estas infecciones ya que tiene una gran capacidad invasiva relacionándose con infecciones profundas en personas inmunocomprometidas (mayormente personas con cáncer o que sufren de Leucemia). Así determinándola como un patógeno emergente y por su resistencia al fluconazol (Kothavade, Kura, Valand, & Panthaki, 2010).

### **2.2.3. Candidiasis**

Es una infección primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, muco-cutáneas, profundas ó diseminadas y alérgicas que arrojan una elevada mortalidad (Biasoli, 2013).

Estas infecciones habitualmente están producidas por *C. albicans* continuando en frecuencia *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Se pueden causar al igual infecciones de forma esporádica mediante otras especies como: *C. famata*, *C. guilliermondii*, etc (Biasoli, 2013). En los ancianos se está incrementando la frecuencia de *C. glabrata* específico en las infecciones urinarias e infecciones invasivas y se encuentra con gran frecuencia colonizada la cavidad orofaríngea provocando con reincidencia en estomatitis (Losada. & Pascual, 2007).

### **2.2.4. Características microbiológicas de Candida**

Es importante recalcar que las especies del género *Candida* para su crecimiento óptimo el medio de cultivo debe tener un pH de 5.6 y contener concentraciones altas de diferentes azúcares como glucosa, galactosa, etc. aparte de estas indicaciones el medio debe poseer antibióticos ejm: cloranfenicol, así evitando la contaminación con diferentes bacterias y poder obtener un cultivo puro (Pérez, Cárdenas, & Hoyos, 2011). Su temperatura oscila entre 25-37 °C en un período de 24-48 horas (Murray, Rosenthal, & Pfäuer, 2014).

De acuerdo a su crecimiento se observarán colonias blancas, cremosas y lisas, de acuerdo a la especie a estudiar y microscópicamente se observan blastoconidios, clamidosporas, hifas y pseudohifas, dichas estructuras serán de gran importancia para identificar las especies del género *Candida* (Murray et al., 2014).

### **2.2.5. Características genéticas**

*Candida albicans* posee un genoma organizado en ocho pares de cromosomas, llamados históricamente del 1 al 7 y R, con 32 Mb y contiene en total 12405 ORF's (Quintana et al., 2017). *Candida parapsilosis* su tamaño es de 13.08, al igual que la anterior especie constituido por 8 pares de cromosomas, su porcentaje de CG es de 38.7% y contiene un total de 5733 genes. *Candida glabrata* tiene un tamaño de 12.24 constituido por 13 pares

de cromosomas, su porcentaje de CG es similar a *C. parapsilosis* de 38,6% y formado por un total de 5499 genes.

Seguidamente con *C. tropicalis* su tamaño genómico es de 14.5, su constitución es semejante a la de *C. albicans* de 8 pares de cromosomas, con 33.1% de CG y formado por 6441 genes. Como último se tiene a *C. guilliermondii* patógeno menos aislado, su tamaño es de 10.6 con un porcentaje de 43.8% CG y su total de genes de 6062 (Canónico González, 2015).

### **2.2.6. Factores de virulencia**

Características que aportan a su patogenicidad:

#### **2.2.6.1. Morfología Celular**

Puede ser polimórfica teniendo la forma de levadura (blastosporas) o como filamentos (pseudohifas). Estas también se pueden convertir de forma reversible a células de levadura con crecimiento de hifa o pseudohifa. La transición de levadura a hifa es uno de los atributos de virulencia denominado morfogénesis (Mayer, Wilson, & Hube, 2013).

#### **2.2.6.2. Actividad enzimática extracelular**

Estas tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos así inactivando las moléculas que ayudan en la defensa del organismo: proteasas, fosfolipasas y lipasas.

Proteasas: familia de enzimas de secreción aspártico proteinasa (SAP), que proporcionan al hongo un sistema proteolítico. Estos genes de la familia SAP son únicos en las especies patógenas de candida. Las proteasas hidrolizan proteínas secretadas por el hospedero en una infección, ejm: el colágeno, mucina, inmunoglobulinas, etc; pasando las barreras del tejido conjuntivo, proporcionando la colonización en los tejidos (De la Calle Rodríguez, Santa Vélez, & Cardona Castro, 2012).

Fosfolipasas: se han identificado 4 fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD). Solo una ha demostrado ser necesaria para la virulencia en candidiasis (PLB1). Esta enzima

glucoproteína de 84kDa que secreta y detecta en las hifas durante la invasión a los tejidos (Murray et al., 2014).

#### 2.2.6.3. Factores de adherencia

Una adhesina se define como una biomolécula que inicia la adherencia de candida a las células del huésped. Existen diferentes tipos de adhesinas en el género *Candida*, como: ALS, Hwp1p, Int1p y Mnt1p.

Entre las más importantes se encuentra la secuencia tipo aglutinina nombradas ALS indispensable para el reconocimiento célula- célula. Constituye de ocho proteínas (ALS1-7 y ALS9), tomando en cuenta que la adhesina ALS3 es primordial en la expresión de genes de adhesión. La Int1 juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *Candida albicans* (Mayer et al., 2013).

#### 2.2.6.4. Hidrofobicidad a la superficie celular

La HSC es la capacidad de adherencia a plástico y a células epiteliales bucales (CEB), así como formación de biocapa. La adherencia de *C. albicans* a las células del huésped constituye el primer paso para la colonización y producción de la infección. Ocurre mediante varias fases: La primera se basa en fuerzas de atracción y repulsión aquí interviene la hidrofobicidad de las superficies con ayuda de la glucosilación de las manoproteínas eliminando los fosfolipomananos (PM) por delección del gen MNN4 (Hall & Gow, 2013), así permitiendo la colonización. Continuado por interacciones específicas entre proteínas de la pared celular de la candida actuando como adhesinas y receptores de la célula epitelial. Una vez finalizado este paso, el microorganismo es capaz de formar una biocapa siendo un sistema de vida que le protege, así favoreciendo a su supervivencia (Blanco et al., 2010).

#### 2.2.6.5. Biopelícula

Diferentes medios médicos se asocian con este factor como catéteres IV o SV y TOT están relacionados con infecciones y se detecta la formación de biopelículas en la superficie de objetos extraños para el huésped como: marcapasos, reemplazos de articulaciones, válvulas.

La biopelícula es una comunidad de microorganismos unidos irreversiblemente a una superficie que contiene matriz exopolimérica y con propiedades fenotípicas diferentes. Así incrementando en la resistencia a los agentes antifúngicos y la protección de las defensas del huésped (Castrillo-River, Palma-Ramos, & Padilla-Desgarenes, 2013).

#### 2.2.6.6. “Switching” o variabilidad fenotípica y antigénica

Es una variación espontáneo, habitual y reversible entre diferentes fenotipos distinguibles por la morfología de la colonia o celular (Biasoli, 2013). Todas las especies de *Candida* presentan los factores de virulencia ya mencionados excepto *Candida glabrata* ya que al no tener hifas ni pseudohifas pasa a ser una especie menos patógena pero en personas inmunocomprometidas se puede diseminar rápidamente (Chakrabarti, 2015).

### 2.2.7. Métodos de diagnóstico

Existen métodos sencillos y complejos, las cuales son:

#### 2.2.7.1. Estudios Morfológicos

Examinación microscópica directa: son examinadas con solución de KOH 20%, muestras de esputo, lavado o cepillado bronquial y fragmentos de tejido (Arenas, n.d.). La tinción con azul de lactofenol es ventajosa para observar las estructuras del microorganismo y su morfología como son: blastosporas, pseudohifas, hifas (Murray et al., 2014). Al igual se puede observar con tinción Gram la forma y el color de las levaduras que se estudian en esta investigación.

Tubo germinal: es una prueba útil para diferenciar *C.albicans*, *C.dublinskiensis* de *Candida no albicans*. Se realiza a partir de una colonia fresca (24-48 h de crecimiento) utilizando plasma fresco o suero humano (0.5 ml) con glucosa incubando a 37 °C de 2-3 horas. El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin constricción en su sitio de unión con la blastoconidia, que da lugar a hifas verdaderas (Sicilia & Cuesta, 2016). El 95-97% de *C. albicans* y *C.dublinskiensis* producen verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas de aspecto similar pero con blastoconidias más grandes que las de *C. albicans* (Sicilia & Cuesta, 2016).

#### 2.2.7.2. Medios de Cultivo

Agar Harina de Maíz – Tween 80: se puede observar micromorfología de especies de *Candida* (Alfonso et al., 2010). La utilización de este medio permite la visualización del tubo germinal y también de clamidiosporas. Para su realización se estría una pequeña porción de la colonia sobre al agar TOC, seguido se coloca con suavidad un cubre-objetos estéril (flameándolo con cuidado) sobre la superficie inoculada (para evitar la acumulación de humedad es preciso no presionar el cubre-objeto (Sicilia & Cuesta, 2016), el uso de Tween 80 en el medio ayuda a mayor crecimiento de las cepas.

Agar Mycosel: Medio altamente selectivos para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras con gran cantidad de flora de otros hongos y bacterias. Contiene nutrientes suministrados por peptona, adición de cicloheximida inhibiendo determinados hongos no patógenos. Al igual contiene cloranfenicol, inhibiendo una amplia variedad de bacterias. Presenta un pH bajo. Se usa con mayor frecuencia en muestras clínicas o materiales por sospecha de contaminación (Usar, 2003).

Agar Sabouraud: Este agar con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras, es un medio útil para el cultivo de dermatofitos, hongos patógenos y no patógenos, pH de 5,6 ideal para el crecimiento de hongos y evitar el crecimiento de bacterias. Contiene caseína y tejido animal digeridos suplementados con glucosa (Murray et al., 2014).

CHROMagar® *Candida* Medium: para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*. CHROMagar *Candida* permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio. La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37 °C durante 48 h para que las levaduras desarrollen completamente el color. Al cabo de este tiempo, las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45 °C. *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea. *C. krusei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco. *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y

tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio (Sicilia & Cuesta, 2016). Pero hay que tomar en cuenta que muchas veces estos colores son similares por lo que no se puede identificar bien.

COLOREX Candida: es un nuevo medio cromogénico y diferencial que facilita la identificación presuntiva de algunas de las levaduras de mayor importancia en clínica (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) (Sicilia & Cuesta, 2016).

#### 2.2.7.3. Estudios Bioquímicos

Auxonograma: se fundamenta en la aplicación de diferentes nutrientes, hidrocarbonados (glucosa, xilosa, adonitol, galactosa, inositol, sorbitol, celobiosa, lactosa, maltosa, trehalosa, rafinosa y ácido láctico) o nitrogenados, sobre un medio sintético base para distinguir el crecimiento selectivo de una levadura con los nutrientes necesarios para su desarrollo (Arenas, n.d.; Sicilia & Cuesta, 2016).

Zimograma: degradación anaeróbica de carbohidratos para la identificación de levaduras. En esta prueba se detecta a través de la producción de gas (hidrógeno y anhídrido carbónico). Medio líquido alcalino con indicador de pH y su lectura es de 24-48 horas (Arenas, n.d.; Identlev, n.d.).

#### 2.2.7.4. Prueba Rápida: API 20 C AUX

Se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados permitiendo realizar 19 pruebas y 1 control. Se puede observar por turbidez si en caso las levaduras son capaces de usar el sustrato que le corresponde. Se puede identificar 34 especies diferentes (Sicilia & Cuesta, 2016).

#### 2.2.7.5. Métodos Automatizados

Los sistemas automatizados son más rápidos en la identificación, pero requieren de un costo alto por lo que muchos laboratorios no pueden acceder a estos equipos. Entre ellos los más conocido son: Sistema Vitek 2® es un sistema que detecta del metabolismo fúngico que puede identificar estos microorganismos en un laxo de tiempo de 15h. Esta

técnica se basa en fluorescencia, compuesto por tarjetas de 63 pocillos. Este sistema permite identificar 51 especies diferentes (Arenas, n.d.; Sicilia & Cuesta, 2016).

Otro de los métodos conocidos está el Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®, identificación rápida de 40 especies de levaduras. Su fundamento es la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados (Sicilia & Cuesta, 2016).

#### 2.2.7.6. Métodos Moleculares

Los métodos moleculares son basados en la PCR teniendo una mayor sensibilidad y especificidad que los métodos convencionales. Permite identificar aquellas especies que no se han podido determinar por métodos fenotípicos. Pero estas tienen un mayor costo y se necesita de personal especializado por lo que se usa mayormente en laboratorios de referencia (Arenas, n.d.; Identlev, n.d.).

La PCR es un método de gran alcance permitiendo la amplificación exponencial de fragmentos específicos de DNA (Canónico González, 2015). En caso de levaduras se usa especialmente los que tienen como diana las secuencias de los genes ribosomales (Biasoli, 2013). Para el estudio de estos microorganismos se estudian dos regiones (ITS1 e ITS2), separan los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S. El desarrollo de la PCR y diseño de primers han facilitado los estudios taxonómicos, características y fitogenéticas de hongos. La sensibilidad del método es de 96.9% y la identificación de las especies se realiza aproximadamente en 8 horas.

Otro método molecular muy utilizado es el Polimorfismo de Longitud en los fragmentos de Restricción del rDNA/rRNA (RFLP), que consiste en la diferenciación mediante el análisis de los patrones de corte que se generan en sitios específicos del genoma. El patrón de RFLP producido por cada especie de *Candida* tiene una mayor especificidad por lo que es poco probable que alguna de las especies pueda ser identificada erróneamente (Arenas, n.d.; Canónico González, 2015).

### 2.3. MARCO CONCEPTUAL

**ALS:** los genes de la familia Als de *Candida albicans* codifican glucoproteínas grandes de la superficie celular que están relacionadas con el proceso de adhesión a las células del huésped (Castrillón Rivera, Ramos, & Desgarenes, 2005).

**Fosfolipomano (PM):** estos polisacáridos estructurales son los principales encargados de conferir resistencia y dar forma a la pared (Capilla, 2017).

**Hidrofobicidad:** cuando la molécula no puede interactuar con las moléculas de agua ni por interacciones ión-dipolo ni mediante puentes de hidrógeno.

**Levadura:** las levaduras son hongos unicelulares muy pequeños, que solo pueden ser vistos con microscopio y que presentan formas variadas, suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoides o alargadas. Unas pocas presentan hifas (Carrillo & Audisio, 2007).

**Manoproteínas:** las manoproteínas se extraen de las paredes celulares de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* por métodos físico-químicos o enzimáticos. Tiene diferentes estructuras según su masa molecular, su grado y tipo de glicosilación y su carga (López-Cordón, 2010).

**Morfogénesis:** crecimiento constante de la célula, es el resultado del conjunto de actividades metabólicas de la célula.

**ORF's:** los genes TLO son una familia de ORF asociados a telómeros en los patógenos fúngicos *Candida albicans* y *C. dubliniensis* que codifican una subunidad del complejo mediador (Haran et al., 2014).

**Patógeno:** son agentes infecciosos que pueden provocar enfermedades a su huésped, alteran la fisiología normal del huésped. (virus, bacteria, hongos, etc).

**Perfil de susceptibilidad antifúngica:** hoy en día se ha demostrado un aumento en este tema por el aumento en la población de pacientes severamente enfermos o inmunocomprometidos, al uso cada vez más frecuente de procedimientos médicos invasivos, al tratamiento con esteroides o antifúngicos de amplio espectro, a estancias intrahospitalarias prolongadas, a la mayor sobrevivencia de los pacientes prematuros (Paredes, 2009).

**SAP:** son codificadas por los genes de la familia SAP, que cuenta con diez miembros y que está regulada diferencialmente, La presencia de los genes de la familia SAP en

*Candida albicans* proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista (Castrillón Rivera et al., 2005).

**Vigilancia epidemiológica:** es uno de los instrumentos de la Salud Pública con mayor aplicación en el mundo para registrar sistemáticamente la ocurrencia de enfermedades en un área geográfica determinada, con la finalidad de conocer su frecuencia y sus tendencias, así como para llevar acciones sanitarias para su control o eliminación. Recopilación, análisis e interpretación sistemática (Valenzuela, 2009).

## CAPÍTULO III

### 3.1. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1. Materiales y métodos

##### 3.1.1.1. Tipo de Estudio

El trabajo de investigación fue de tipo observacional porque no existió manipulación por parte del investigador, descriptivo ya que se conocieron características morfológicas de las distintas cepas; transversal debido a que se identificó y analizó una sola vez las diferentes variables de las especies del género *Candida* del cepario almacenado del laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica.

##### 3.1.1.2. Tipo de Muestreo

Se trabajó con todas las cepas que se encontraron almacenadas de acuerdo a lo establecido en los POE'S LM D1-01 y LM-D3-01, en la caja N° 3 de crioviales pertenecientes a hongos levaduriformes de la micoteca del Laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina de la PUCE.

##### 3.1.1.3. Tamaño de Muestra

No existió cálculo de muestra ya que se trabajó con todas las cepas que se encuentran en el cepario del laboratorio de Micología Clínica de la PUCE, conformado por un total de 170 cepas, es decir con el universo.

##### 3.1.1.4. Criterios de Inclusión

- Cepas identificadas como *Candida* spp. del cepario del laboratorio de Micología Clínica de la PUCE.
- DNA extraído en óptimas condiciones de concentración y pureza.

##### 3.1.1.5. Criterios de Exclusión

- Muestras mal etiquetadas

- Cepas contaminadas por otros microorganismos que puedan alterar el estudio y que no se puedan recuperar mediante cultivo para su desarrollo.

#### 3.1.1.6. Análisis Estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para conocer la frecuencia de la distribución de especies e histogramas para la representación gráfica de los hallazgos. Se realizó un estudio de concordancia a través del cálculo de índice kappa de Cohen, comparando los métodos: AHM y PCR a todas las cepas incluidas en la investigación.

### **3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

#### **3.2.1. Variable Principal:**

Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de candidas

#### **3.2.2. Variable Secundaria:**

Cepas almacenadas del laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE.

**Tabla 1. Operacionalización de Variables**

<b>Variable Principal</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Sub-dimensión</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Niveles de medición</b>	<b>Instrumento de medición</b>
Caracterización fenotípica de las cepas de candidas	<i>Candida</i> spp. No <i>Candida</i> spp.	<i>C. albicans</i> <i>C. auris</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. parapsilosis</i>	Los rasgos fenotípicos cuentan con rasgos tanto físicos como conductuales. Un fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.	Frecuencia relativa (%)	Cualitativo	Nominal	Agar Morfología Tubo germinal API 20C AUX
Caracterización genotípica de las cepas de candidas	Presencia de genes Ausencia	<i>Candida</i> spp ITS 1 -2 <i>C. albicans</i> <i>C. auris</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	Estudio de genes y sus diferencias. Los cuales se examinan a través de diferentes instrumentos y diversas técnicas moleculares para obtener el ADN y así identificar algunos de los genes que lo conforman.	Frecuencia relativa (%)	Cualitativa	Nominal	PCR y Electroforesis
<b>Variable Secundaria</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Sub-dimensión</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Instrumento de medición</b>
Cepas de candidas obtenidas del cepario de la PUCE	Cepas viables de <i>Candida</i> spp	<i>C. albicans</i> <i>C. auris</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	El cultivo de micelio de los hongos en medios nutritivos preparados y mantenidos bajo condiciones estériles.	Crecimiento de la cepa	Cualitativo	Nominal	Base de datos

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

### **3.3. MATERIALES Y PROCESO**

#### **3.3.1. Materiales**

Cultivo e identificación fenotípica de Candida

- Agar Sabouraud con cloranfenicol
- Agar Harina de Maíz + Tween 80
- Tubo germinal
- API 20C AUX

Conservación de cepas de candidas

- Agar Difco Skim Milk

Materiales complementarios de laboratorio

- Mechero bunsen
- Cajas petri plásticas
- Asas
- Tubos cónicos plásticos de 1,5 mL
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pinzas
- Pipeta 0.1- 2  $\mu$ L
- Pipeta 0.5-10  $\mu$ L
- Pipeta 20-200  $\mu$ L
- Pipeta 100-1000  $\mu$ L
- Puntas desechables
- Papel desechable
- Gradillas
- Cámara de electroforesis
- Frasco de vidrio 100 ml
- Tubos Eppendorf 1.7 ml

#### **3.3.2. Reactivos**

- DNA mini kit Invitrogen
- Agarosa

- Ladder 100 pb
- Taq Master Mix
- Agua grado Molecular
- Agua destilada
- Agente Intercalante Syber Safe
- Loading buffer
- TAE 1X
- Tween 80
- Suero Humano

### **3.3.3. Equipos**

- Microscopio óptico
- Incubadora 37 °C
- Incubadora 25 °C
- Ultra congelador -80 °C
- Refrigeradora -20 °C
- Vortex
- Medidor de Turbidez
- Termociclador
- Centrifuga
- Incubadora para la extracción
- Estereomicroscopio
- NanoDrop 2000
- Computadora

## **3.4. PROCEDIMIENTO**

Este estudio se realizó en cuatro fases:

### **3.4.1. Fase Uno:**

#### **3.4.1.1. Recolección de datos y selección de cepas**

Para la realización del proyecto de investigación se seleccionaron las cepas de *Candida* spp. obtenidas del laboratorio de Micología Clínica teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. Por lo que al final se trabajó con 166 cepas que se lograron recuperar.

### **3.4.2. Fase Dos:**

#### 3.4.2.1. Control de Calidad

El control de calidad de este estudio manejó el procedimiento operativo estándar de Identificación de hongos levaduriformes (LM-D3-01). En el agar Sabouraud se sembró la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 al igual en un tubo germinal. Esta cepa presentó las características macroscópicas propias de la especie como la formación de clamidiosporas dando de esta manera validez al medio. A su vez se utilizó tarjetas API 20C AUX en las cuales se realizó el mismo proceso de siembra de la *Candida albicans* ATCC 10231. En cuanto a la identificación genotípica se emplearon las siguientes cepas: *C. albicans* ATCC 10231, *C. auris* ATCC 11903, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. guilliermondii* ATCC 20316, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* ATCC 750. Así comprobar la validez de los cebadores para amplificar los genes que permitan la caracterización de las diferentes cepas ya mencionadas.

#### 3.4.2.2. Replicación de cepas de candidas en Agar Sabouraud

Posterior a la selección de las cepas se replicaron en Agar Sabouraud. A continuación, se incubaron a 37 °C por 12-24 horas; así aislando las colonias de candidas y confirmando la viabilidad de las cepas.

### **3.4.3. Fase Tres:**

#### 3.4.3.1. Identificación fenotípica de las especies del género *Candida*

- *Tinción Gram*

Esta tinción ayudó a observar el desarrollo de las muestras. Se colocó una gota de agua molecular en el centro del portaobjetos, con el asa previamente esterilizada, se tomó la

muestra y se colocó en el portaobjetos, procurar que se expanda y no quede acumulado. Secar a temperatura ambiente, fijar la muestra al calor. Para la tinción se agregó cristal violeta durante 1 min en toda la placa, enjuagar con agua. Posteriormente colocar lugol y enjuagar después de 1 min. En seguida se colocó alcohol acetona por 15 segundos y, por último, se colocó safranina, esperar 1 min y enjuagar (López-Jácome et al., 2006).

- *Tubo Germinal*

Se tomó un inóculo de la colonia fresca en Agar SBD (12-24 horas de crecimiento) y se mezcló con 300 ul de suero humano en tubos de vidrio esterilizados, se incubó a 37 °C por máximo 3 horas. A continuación, se colocó 100 ul de la siembra en un porta objetos para observar microscópicamente las estructuras y evidenciar o no la presencia de clamidosporas (Sicilia & Cuesta, 2016).

- *Morfología en Agar Harina de Maíz + Tween 80*

La siembra en Agar Harina de maíz + Tween 80 se desarrolló mediante la técnica de Dalmau; con un asa en L se tomó una pequeña colonia de la muestra sembrada en Agar Sabouraud y se realizó un corte en el AHM de aproximadamente 1,5 cm en un ángulo de 45°, se colocó un cubreobjetos encima del corte y se dejó incubar a 37 °C por 48 horas para la primera lectura y 72 horas para la confirmación. Así evidenciando microscópicamente: filamentos, blastoconidias y clamidosporas (Espina, Guillen, Calvo, & Meza, 2005).

- *API 20 C AUX*

Este método se efectuó a cepas que presentaron discrepancias entre la técnica de Dalmau e identificación genotípica mediante PCR. Se preparó una suspensión con una turbidez igual a 2 McFarland con colonias fresca (12-24 horas de crecimiento en Agar SBD). Esta suspensión debe usarse inmediatamente después de la preparación, en una ampolla del medio API C se transfirió 100 µl de la suspensión anterior. Se homogenizó con la pipeta, evitando la formación de burbujas, después se llenó las cúpulas de la tarjeta api identificando el número de muestra con la suspensión de la ampolla. Es importante no llenar demasiado o insuficiente las cúpulas (la superficie debe ser ligeramente convexa), de lo contrario, se pueden obtener resultados incorrectos y evitar tocar las cúpulas para no

traspasar los azúcares al siguiente pocillo. Se colocó la tapa en la bandeja e incubó a 27 ° C ± 2 ° C durante 48-72 horas (Biomérieux S.A., 2010; Databases, n.d.).

### 3.4.3.2. Identificación genotípica de las especies del género *Candida*

El análisis molecular consistió en la extracción de ADN y amplificación de los genes de identificación, ensayos que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética de la PUCE.

#### - Extracción de ADN:

El material genético fue extraído de cepas de 12-24 horas de crecimiento en Agar SBD, siguiendo el protocolo del Mini kit comercial Invitrogen (Anexo.1).

#### - Amplificación:

Se aplicó la técnica previamente estandarizada PCR para la identificación de las especies de *Candida* utilizando los siguientes cebadores (Tabla 2):

**Tabla 2.** Secuencias de cebadores utilizados para la identificación de las especies de *Candida*

Especie	Primer	Secuencia 5'-3'	Gen	Pb	Referencia
<i>Candida</i> spp.	UNI1	GTCAAACCTTGGTCATTTA			
	UNI2	TTCTTTTCCTCCGCTTATTG			
<i>C. albicans</i>	Calb	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	ITS1	446-583	(Carvalho et al., 2007)
<i>C. glabrata</i>	Cgla	TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG		ITS2	
<i>C. guilliermondii</i>	Cgui	TTGGCCTAGAGATAGGTTGG		512-668	
<i>C. krusei</i>	Ckru	CTGGCCGAGCGAACTAGACT		169-590	
<i>C. tropicalis</i>	Ctrop	GATTTGCTTAATTGCCCCAC		507-583	
<i>C. auris</i>	CauF	CGCACATTGCGCCTTGGGGTA	5.8S rDNA	163	(Kordalewska et al., 2017)
	CauR	GTAGTCCTACCTGATTTGAGGCGAC			
<i>C. parapsilosis</i>	CparF	AGCAATCAAGGAGAGGTCCCA	Topoisomerasa II	370-570	(García et al., 2017)
	CparR	CTCGTACCAGCCTTGTTTGCATC			

#### - PCR

La preparación de la master mix para PCR fue realizada acorde a las cantidades y concentraciones detalladas en las Tablas 3,4.

**Tabla 3.** Preparación de la Master Mix para la identificación de las especies de *Candida* (Alb, Gla, Gui, Kru, Tro)

<b>Master mix Identificación de especies de Candida</b>			
<b>Alb, Gla, Gui, Kru, Tro</b>			
	<b>Concentración</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Agua molecular</b>	-	-	0.75 µL
<b>Primer UNI1</b>	0.2	µM	0.50 µL
<b>Primer UNI2</b>	0.2	µM	0.50 µL
<b>Primer Reverse*</b>	0.15	µM	0.38 µL
<b>Taq Master Mix</b>	1x		3.125 µL
<b>DNA</b>			1 µL
<b>Volumen Final</b>			6.25 µL

\*Primer Reverse es de acuerdo a la especie a identificar.

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

**Tabla 4.** Preparación de la master mix para la identificación de *Candida auris* y *C. parapsilosis*

<b>Master mix Identificación de especies de Candida</b>					
	<b><i>C. auris</i></b>		<b><i>C. parapsilosis</i></b>		<b>Unidad/C.</b>
	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>	
<b>Agua molecular</b>	-	3.65 µL	-	1.525 µL	-
<b>Primer Forward</b>	0.24	0.3 µL	0.48	0.3 µL	µM
<b>Primer Reverse</b>	0.24	0.3 µL	0.48	0.3 µL	µM
<b>Taq Master Mix</b>	1x	6.25 µL	1x	3.125 µL	
<b>DNA</b>		2 µL		1 µL	
<b>Volumen Final</b>		12.5 µL		6.25 µL	

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa se realizó para cada par de cebadores de acuerdo al protocolo indicado en la tabla 5. Se programaron en el termociclador y cada uno consistió en una denaturación inicial con tiempos y temperaturas establecidas, seguidos de n ciclos con tres etapas, denaturación, hibridación y elongación, y por último una elongación final. Para posteriormente almacenar los amplicones a una temperatura de 2 a 8 °C.

**Tabla 5.** Protocolo para la amplificación de genes de las especies de *Candida*

<b>Especies de <i>Candida</i></b>										
<b>ETAPA</b>	<b>Alb.</b>		<b>Aur</b>		<b>Tro/Gla/Gui</b>		<b>Parap</b>		<b>Kru</b>	
	Tiempo	T°	Tiempo	T°	Tiempo	T°	Tiempo	T°	Tiempo	T°
<b>Denaturación inicial</b>	10 min	94 °C	10min	95 °C	10min	94 °C	10min	94 °C	10min	94 °C
<b>Denaturación</b>	15 s	94 °C	30s	95 °C	15s	94 °C	15s	94 °C	15s	94 °C
<b>Hibridación</b>	30 s	55 °C	30s	63 °C	30s	53 °C	30s	61 °C	30s	54 °C
<b>Elongación</b>	45 s	74 °C	30s	74 °C	45s	70 °C	45s	70 °C	45s	70 °C
<b>Elongación final</b>	10 min	74 °C	10min	74 °C	10min	70 °C	10min	70 °C	10min	70 °C
<b>N° ciclos</b>	40 ciclos		30 ciclos		40 ciclos		40 ciclos		40 ciclos	

Alb: *Candida albicans*, Aur: *Candida auris*, Tro: *Candida tropicalis*, Gla: *Candida glabrata*, Gui: *Candida guilliermondii*, Parap: *Candida Parapsilosis*, Kru: *Candida krusei*

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

### 3.4.4. Fase Cuatro:

#### 3.4.4.1. Análisis de resultados

Una vez recolectada toda la información se procedió a crear una base de datos en Microsoft Office Excel 2010. A continuación, se calculó la frecuencia de cada especie representando en porcentaje de acuerdo a las 170 cepas estudiadas. Para el análisis estadístico se utilizó tablas de contingencia para así calcular el índice Kappa de Cohen e identificar la concordancia entre los métodos fenotípicos y genotípicos evaluados en esta investigación.

## CAPITULO IV

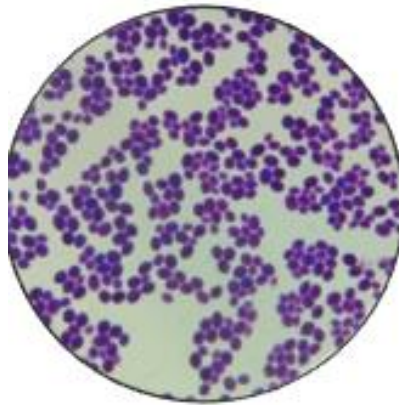
### 4.1. RESULTADOS

#### 4.1.1. Identificación fenotípica de las especies del género *Candida*

Se obtuvo un total de 166 cepas las cuales se analizaron mediante los métodos mencionados tomando en cuenta que 4 cepas analizadas se encontraron doble población, lo que significa que aumenta el número total de cepas a 170.

##### 4.1.1.1. Tinción Gram

A todas las muestras se les realizó tinción Gram donde se observaron microorganismos de forma ovalada y coloración morado oscuro, como se aprecia en la Figura 1.

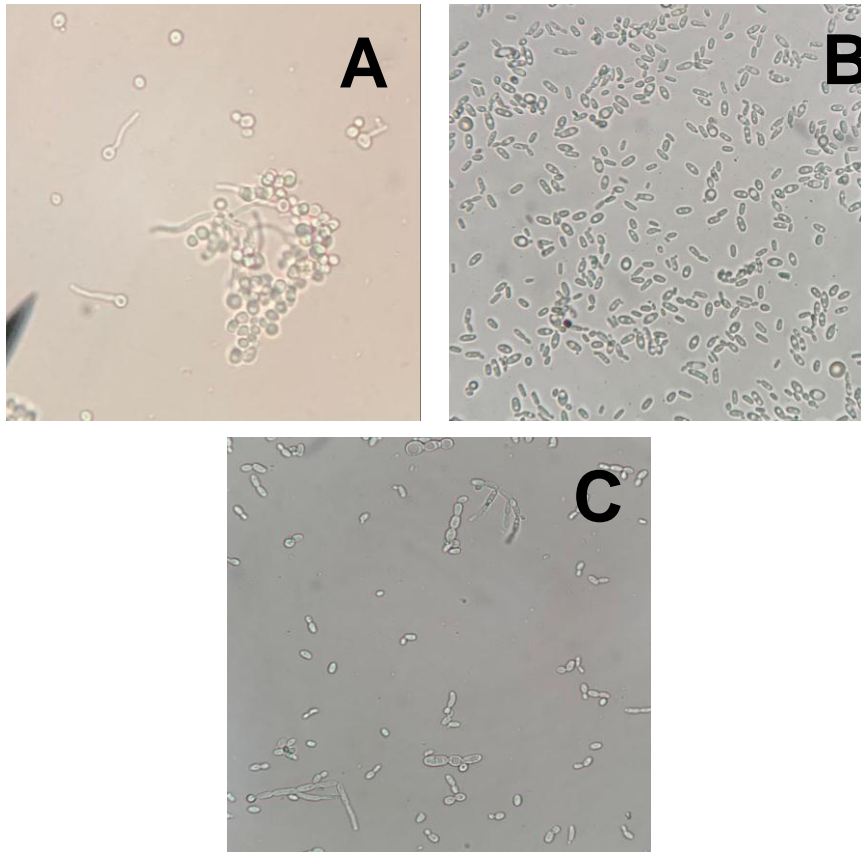


**Figura 1.** Coloración Gram en donde se puede observar levaduras ovaladas de coloración morado oscuro, visto en 100x correspondiente a *Candida albicans*.

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

##### 4.1.1.2. Tubo Germinal

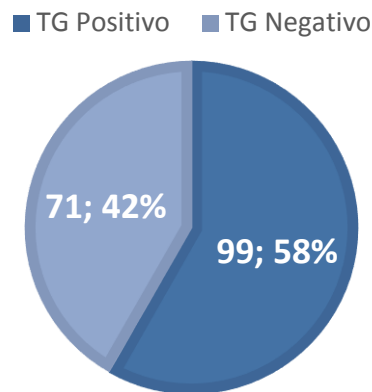
Es una de las pruebas complementarias ya que se puede observar en el microscopio la formación de micelio dando un tubo germinal positivo o la unión de levaduras formando cadenas evidenciando negativo en el tubo germinal, como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Formación de Tubo Germinal: A) Tubo Germinal positivo; *C. albicans*, B) Tubo Germinal negativo; *C. krusei*, C) Tubo Germinal negativo; *C. guilliermondii*. Observación en 40x.

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

De las 170 muestras estudiadas, 99 produjeron tubo germinal positivo, lo que nos permitió identificar rápidamente a estas cepas como correspondientes de *C. albicans* y 71 cepas con tubo germinal negativo, así inferir sobre la identidad de las demás cepas (Figura 3).

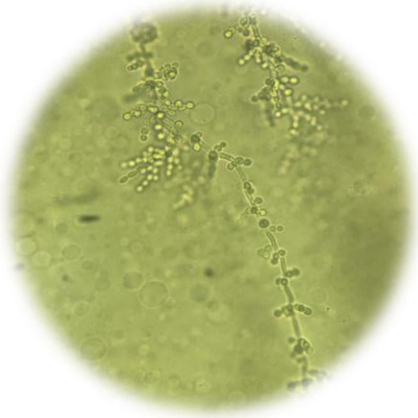
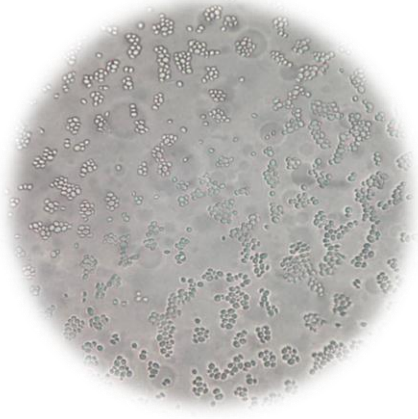
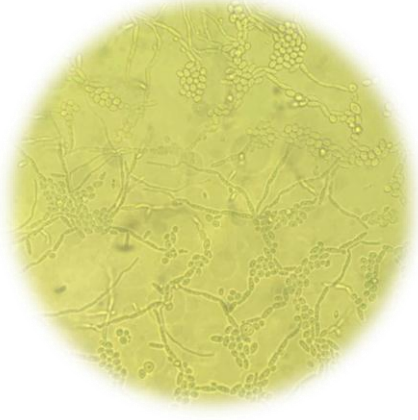


**Figura 3.** Distribución de Tubo germinal cepas de candidas

#### 4.1.1.3. Morfología en Agar Harina de Maíz + Tween 80

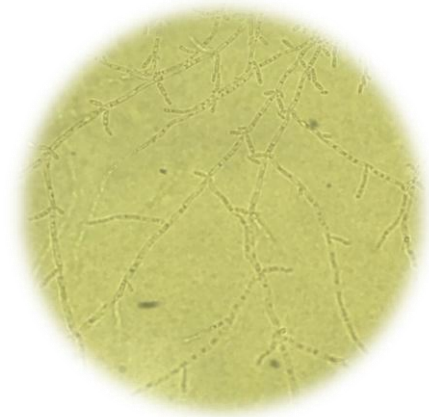
Se logra visualizar en la Tabla 6 la descripción de las características morfológicas de cada especie.

**Tabla 6.** Morfología en AHM

Especie de Candida	Descripción	Fotografía
<i>Candida albicans</i>	Pseudohifas septadas con racimos de blastosporas (redondas) Presencia de clamidosporas (paredes gruesas)	
<i>Candida glabrata</i>	No se observan pseudohifas. Abundantes blastosporas agrupadas (redondas).	
<i>Candida guilliermondii</i>	Pequeñas células de levaduras Pocas pseudohifas cortas, con pequeños grupos de blastosporas en el septo (racimos).	

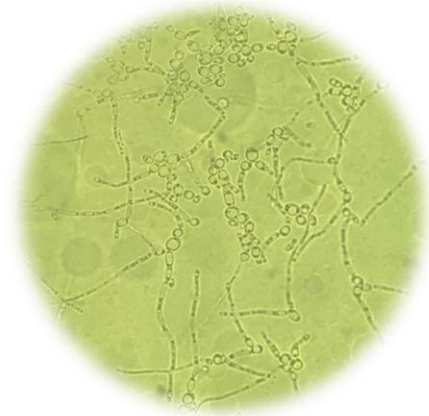
*Candida krusei*

Pseudomicelo con  
blastosporas alargadas  
(apariencia a palos cruzados).



*Candida tropicalis*

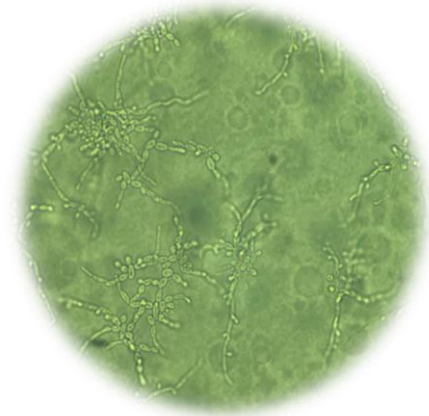
Blastosporas (ovaladas) solas  
o en grupos muy pequeños a  
lo largo de las pseudohifas.



*Candida  
parapsilosis*

Blastosporas, solas o en  
pequeños grupos a lo largo  
del pseudomicelio.

Presencia de grandes  
micelios.



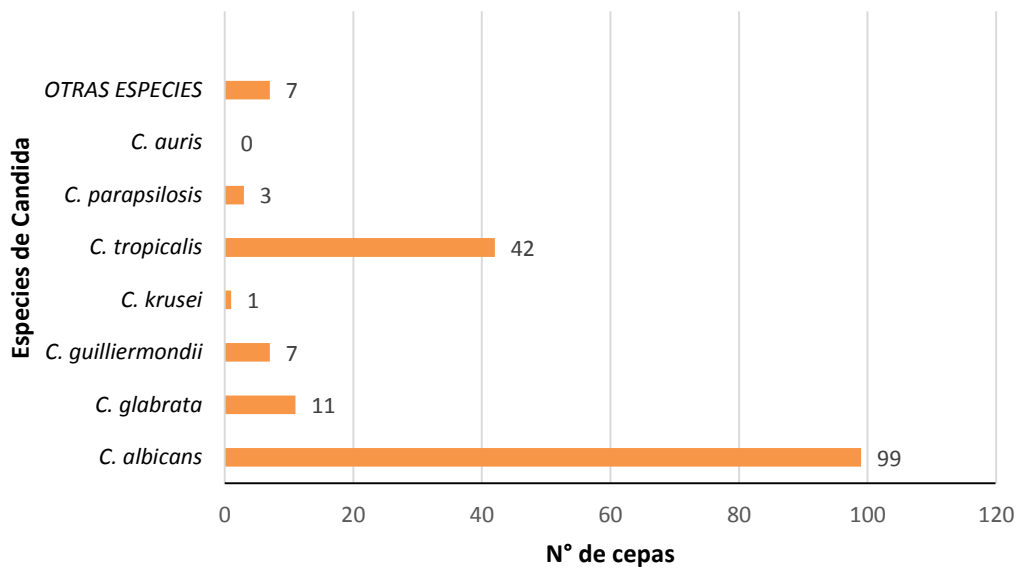
*Candida auris*

No se encontró ninguna  
muestra correspondiente a  
esta especie

-

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

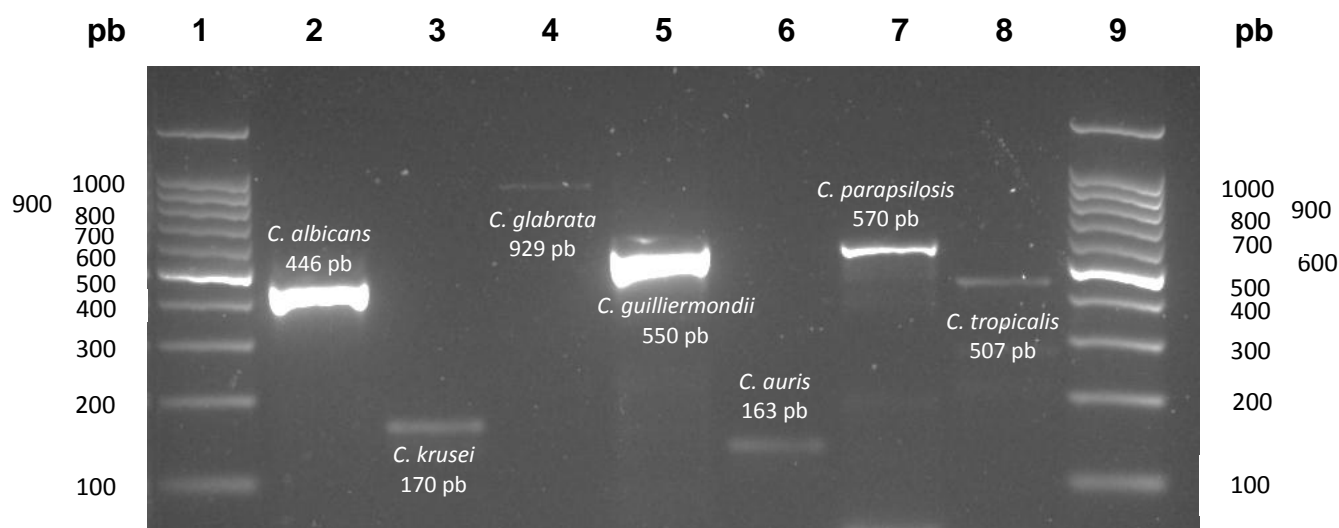
Fueron estudiadas las 170 cepas de las cuales, se observó la formación abundante de blastosporas con pseudohifas al igual una pequeña cantidad se pudo reconocer la formación de clamidosporas así clasificar esas cepas como *C. albicans* con 58% (99/170) siendo la especie más frecuente, a continuación *C. tropicalis* 25% (42/170), *C. glabrata* 6% (11/170), identificándolas con la ausencia de pseudomicelios y abundantes blastosporas, *C. guilliermondii* 4% (7/170), *C. parapsilosis* y Otras especies se encontraron 7 cepas de cada una con un porcentaje de 4%, *C. krusei* 1% (1/170) y *C. auris* no se encontró en el estudio refiriéndose al 0%, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Frecuencia de las diferentes especies de Candida por método AHM.

#### 4.1.2. Identificación genotípica de las especies del género Candida

Los productos amplificados fueron detectados por gel de agarosa al 2,5 % y la electroforesis en una cámara pequeña a 80 Volteos por 90 min, colocando en cada pocillo de la cámara 0,7 uL del amplicón. En Anexo. 2 se distingue algunas de las imágenes de gel de agarosa que se obtuvieron durante el estudio.



**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % de los productos de la PCR para la identificación de *Candida* spp. con sus respectivos pesos moleculares.

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

Se amplificaron los productos de la PCR con sus cebadores específicos referente a los controles de cada especie: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. auris*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* obteniendo amplicones específicos con los siguientes tamaños (446, 170, 929, 550, 163, 570 y 507 pb respectivamente). Los tamaños de los amplicones observados fue igual al esperado (Figura 5).

Entre las 170 muestras de candidas, la más frecuente fue *C. albicans* 58% (99/170), seguido de *C. tropicalis* 16% (28/170), *C. glabrata* 4% (7/170), *C. guilliermondii* 3% (5/170). Sin embargo, no se obtuvieron ningún porcentaje con las especies: *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. auris*. (Tabla 7). Hay que tomar en cuenta que 31/170 cepas no se pudieron determinar lo que equivale al 18% de las cepas estudiadas.

**Tabla 7.** Distribución de la identificación molecular de las especies de *Candida*.

ESPECIE	N° cepas	%
<i>C. albicans</i>	99	58
<i>C. glabrata</i>	7	4
<i>C. guilliermondii</i>	5	3
<i>C. krusei</i>	0	0
<i>C. tropicalis</i>	28	16
<i>C. parapsilosis</i>	0	0
<i>C. auris</i>	0	0
No determinadas	31	18
<b>TOTAL</b>	<b>170</b>	<b>100</b>

Mediante el método molecular se pudieron identificar 139/170 cepas. Entre ellas se tiene 99 cepas que corresponden a *C. albicans* y 40 cepas correspondientes a *C. no albicans*. Las 31 cepas restantes no se pudieron identificar mediante PCR pertenecientes a *C. no albicans*. (Tabla 8).

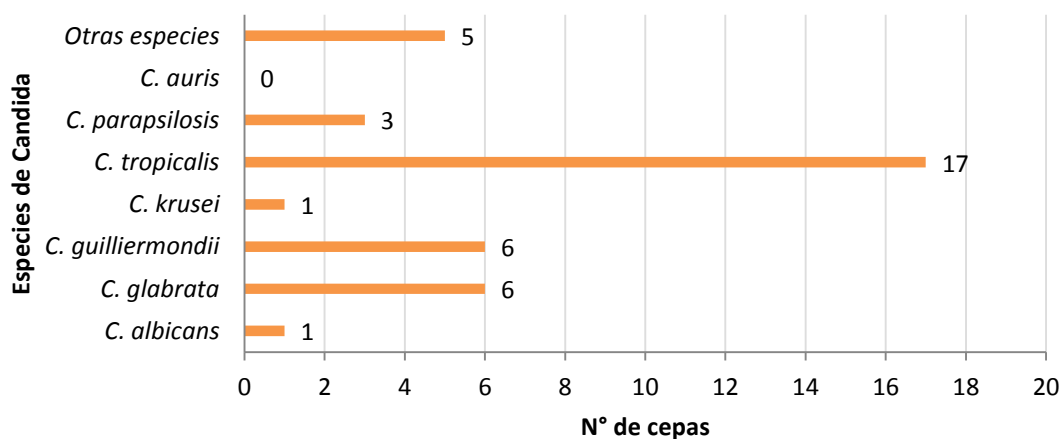
**Tabla 8.** Identificación de *Candida albicans* y *no albicans* mediante el método de PCR.

Género	Total de cepas	PCR			
		Identificadas		No Identificadas	
		N °	%	N °	%
<i>Candida albicans</i>	99	99	100	0	0
<i>Candida no albicans</i>	71	40	56	31	44
<b>TOTAL</b>	170	139		31	

#### 4.1.3. Identificación de las especies de *Candida* con API 20 C AUX

A las cepas que presentaron discrepancias en la identificación genotípica que no se encuentre entre los cebadores a usar se realizó correlación entre la técnica Dalmau y el API 20C AUX.

Utilizando el sistema comercial API 20C, de las 39 cepas estudiadas se obtuvo los siguientes resultados: un mayor porcentaje en la identificación de *C. tropicalis* 44% (17/39), continuando con *C. glabrata* 15% (6/39) al igual *C. guilliermondii*, otras especies 13% (5/39), *C. parapsilosis* 8% (3/39), *C. krusei* 3% (1/39) al igual *C. albicans* y por último no se encontraron cepas de *C. auris*. (Figura 6).



**Figura 6.** Frecuencia de las diferentes especies de *Candida* por Prueba API 20C AUX

#### 4.1.4. Concordancia entre métodos

En este estudio se tomaron las muestras del cepario almacenado y se compararon entre métodos fenotípicos y genotípicos. Como se puede observar en la tabla 9.

**Tabla 9.** Comparación entre los métodos fenotípicos convencionales y PCR en la identificación de especies de *Candida*.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS							
<i>Candida</i> spp.	N ° aislamientos por:				TOTAL	%	
	TG	AHM	PCR	API		% AHM	% PCR
<i>C. albicans</i>	99	99	99	1	99	100	100
<i>C. glabrata</i>	-	11	7	6	11	100	64
<i>C. guilliermondii</i>	-	7	5	6	9	78	56
<i>C. krusei</i>	-	1	0	1	1	100	0
<i>C. tropicalis</i>	-	42	28	17	42	100	67
<i>C. parapsilosis</i>	-	3	0	3	3	100	0
<i>C. auris</i>	-	0	0	0	0	0	0
Otras especies	-	7	0	5	5	0	0
<b>TOTAL</b>		170		39	170	96	48

Elaborado por: Dayana Yáñez, 2019

Los presentes resultados fueron obtenidos mediante cultivo y PCR para cada una de las especies de *Candida*. La diferencia de positividad de cada procedimiento está directamente relacionada con la frecuencia con que se identificaron las 7 especies.

Comparando los resultados conseguidos para la caracterización de cada especie de *Candida* por cultivo en AHM y por PCR, en *C. albicans* el cultivo mostró en total 99 cepas identificadas. Cuando en este medio se identificó una especie, esta también se detectó por PCR. Teniendo un Índice Kappa de 1 lo que indica que la concordancia para esta especie entre ambas metodologías es Muy buena.

*C. glabrata*, mediante el método fenotípico se encontraron 11 cepas y en PCR 7 cepas logrando un índice kappa substancial con un valor de 0.76. Referente a *C. guilliermondii* el cual existe una concordancia casi perfecta en relación a las otras especies de *Candida* debido que el índice Kappa es 0.83. De acuerdo con *C. tropicalis*, el índice kappa de 0.75

indica que hay una concordancia substancial entre el método de morfología y el método molecular en relación a las otras especies de Candida.

Para *C. krusei* y *C. parapsilosis* no se puede determinar el nivel de concordancia ya que al caracterizar en método genotípico no dio resultado alguno en cambio en morfología AHM se observó 1 cepa de *C. krusei* y 3 cepas de *C. parapsilosis*. y Referente a *C. auris* no se observó presencia de esta especie en ninguna cepa del estudio. (Tabla 10).

De acuerdo con la tabla se obtuvo 0.77 de índice kappa general entre el método AHM y método molecular, indicando una Buena concordancia entre los métodos mencionados para las 4 especies. La interpretación del valor de k es útil disponer de una escala como la que se muestra en Anexo 4.

**Tabla 10.** Índice kappa de cada especie de Candida y general de acuerdo al método AHM y PCR.

	AHM							Total	Índice kappa c/e	Índice kappa
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. krusei</i>	Otras especies	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>			
PCR	<i>C. albicans</i>	99	0	0	0	0	0	99	1	0.77
	<i>C. glabrata</i>	0	7	0	0	0	0	7	0.76	
	<i>C. guilliermondii</i>	0	0	5	0	0	0	5	0.83	
	<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	28	28	0.75	
	Otras especies	0	4	2	1	7	3	14	31	
<b>Total</b>	99	11	7	1	7	3	42	170		

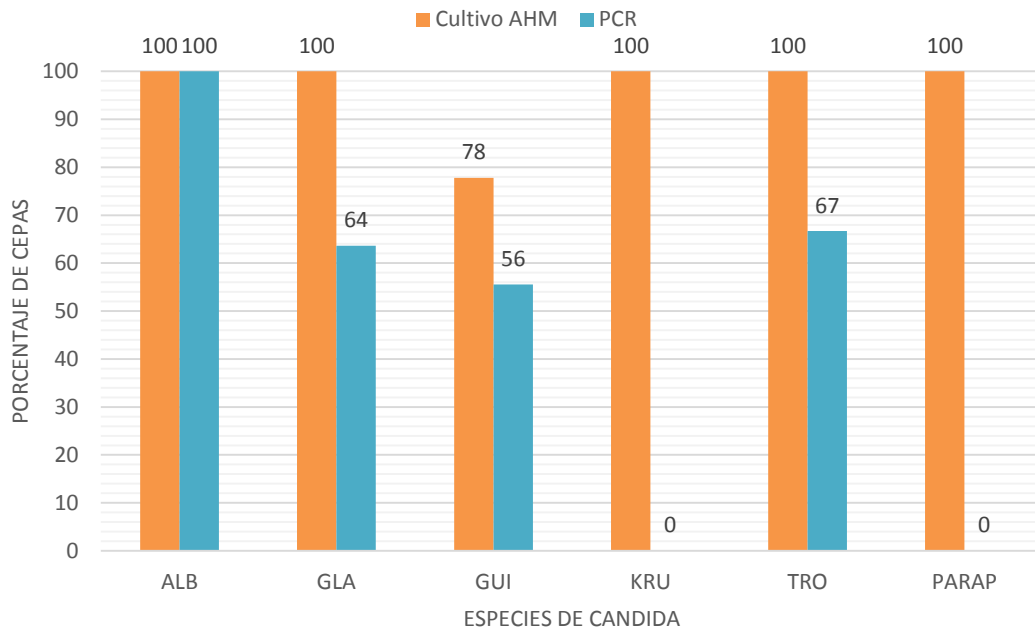
Interpretación del Valor k de Cohen. \* < 0.01 = No acuerdo; \* 0.01-0.020 = Ninguna a escaso; \* 0.21-0.40 = Regular o razonable; \* 0.41-0.60 = Moderado; \* 0.61-0.80 = Substancial o Buena; \* 0.81-1.00 = Casi perfecto o Muy buena (Manterola et al., 2018)

**Elaborado por:** Dayana Yáñez, 2019

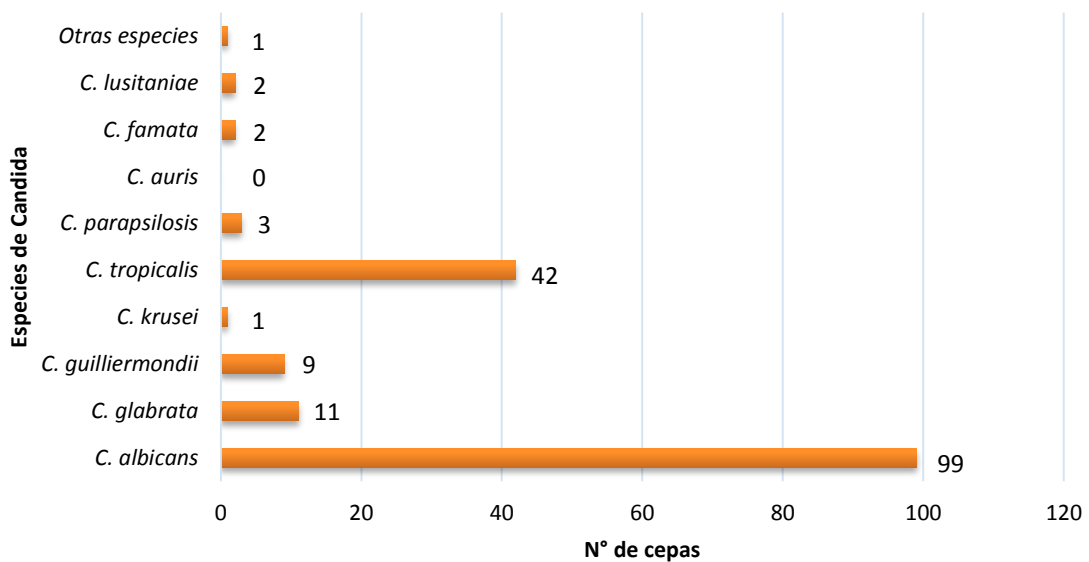
En este estudio se realizó la comparación del método fenotípico y genotípico de las cepas almacenadas en la carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE como se puede observar en la Figura 7, los porcentajes que se identificaron por método AHM y PCR.

De 170 cepas dando como resultado general, 99 (58%) cepas de *C. albicans*, 42 (25%) de *C. tropicalis*, 11 (6%) de *C. glabrata*, 9 (5%) de *C. guilliermondii*, 3 (2%) de *C. parapsilosis* y 1 (1%) de *C. krusei*. Con un 3% (5 cepas) se identificaron como otras especies ya que se halló usando el método API 20C AUX para la caracterización de

levaduras: *C. famata* y *C. lusitaniae* y por último no se encontró ninguna cepa reconocida como *C. auris*. Todas las cepas fueron identificadas usando cada uno de los métodos mencionados (Figura 8).



**Figura 7.** Correlación entre el resultado de la PCR y el cultivo en AHM para la detección de las cuatro especies de Candida.



**Figura 8.** Distribución de las especies de Candida.

Se puede observar en el Anexo.3 todas las cepas que se estudiaron con su resultado correspondiente de cada método.

## CAPITULO V

### 5.1. DISCUSIÓN

Las especies de *Candida* son las responsables de la mayoría de las infecciones micóticas, causa de gran mortalidad y morbilidad en pacientes mayormente inmunocomprometidos. Se estima que la tasa de mortalidad en la candidemia que va entre 22 – 33% de pacientes con infecciones diseminadas y posible llegar a 71% en inmunocomprometidos, por lo que es importante un diagnóstico rápido y confiable para poder dar un tratamiento oportuno y a la vez eficaz para el paciente (Camacho Cardoso et al., 2017; Estrada Barraza et al., 2011).

Algunos de los autores consideran que el cultivo es un método de referencia para la identificación de las especies y diagnóstico de candidiasis invasiva, pero otros no confían por la contaminación o manipulación del operador (Camacho Cardoso et al., 2017).

Se han publicado varios estudios que caracterizan la epidemiología, la microbiología, los factores de riesgo y los resultados de los pacientes asociados a estos patógenos, teniendo *C. albicans* como el agente líder, seguido de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. En una investigación de 2139 aislados clínicos de Colombia, Ecuador y Venezuela, la proporción de aislamientos de *C. albicans* fue mayor (62%), pero *C. parapsilosis* (11%) y *C. tropicalis* (8,5%) fueron nuevamente las especies no albicans más frecuentes, y *C. glabrata* representó solo el 3.5% de los aislamientos. Lo que coincide con esta investigación de 170 cepas almacenadas se halló 58% de *C. albicans* siendo la cepa con mayor frecuencia seguida de *C. tropicalis* (25%), *C. glabrata* (6%), *C. guilliermondii* (5%), Otras especies con (3%), *C. parapsilosis* (2%) y *C. krusei* (1%). No se ha registrado *C. auris* en Latinoamérica excepto en Venezuela se obtuvo registros en el 2015 es importante su identificación ya que es considerado como un patógeno multirresistente (Lockhart et al., 2016; Nucci, Queiroz-Telles, Tobón, Restrepo, & Colombo, 2010).

Otro estudio realizado por Guerrero Miranda, 2016. Se determina una mayor frecuencia en *C. albicans* seguido de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y por último *C. lusitaniae*, lo que coincide con esta investigación.

Las pruebas de laboratorio rutinarias para la detección de *Candida* spp. se basan en técnicas microbiológicas como tubo germinal, AHM, pruebas bioquímicas, medios cromogénicos, etc. Uno de los objetivos principales de este estudio fue la identificación fenotípica de las especies de *Candida* y en consecuencia se obtuvo con mayor frecuencia a *C. albicans* 99 cepas, *C. tropicalis* con 42 cepas, *C. glabrata* 11 cepas, *C. guilliermondii* con 7 cepas, *C. parapsilosis* 3 cepas y *C. krusei* solo se identificó 1 cepa. Esta frecuencia es similar a la que menciona Camacho Cardoso et al., 2017, el cual es una recopilación de datos dando a conocer que utilizando métodos fenotípicos se reportó una frecuencia de aislamiento de *C. albicans* del 68.6%, seguido de *C. parapsilosis* 8.6%. Al igual otro estudio realizado en México con aislados de *Candida* spp. reportaron *C. parapsilosis* como especie más frecuente (37,9%), seguido de *C. albicans* (31.9%), *C. tropicalis* (14.8%) y *C. glabrata* (8%) resultados que se adquirieron de poblaciones pediátricas, pero al incluir población adulta *C. parapsilosis* se identificó en un bajo porcentaje (Camacho Cardoso et al., 2017).

Utilizando el sistema comercial API 20C AUX, de las 39 cepas se reconocieron *C. tropicalis* (17 cepas), *C. glabrata* (6 cepas) al igual para *C. guilliermondii*, otras especies (5 cepas), *C. parapsilosis* (3 cepas) y *C. krusei* (1 cepas). Lo que difiere con López et al., 2005, de los 44 aislamientos clínicos estudiados 43 (98%), presentaron perfiles de comportamiento que coinciden con el catálogo dando como resultado: 27 aislamientos identificadas como *C. albicans*, 10 como *C. parapsilosis*, 2 como *C. krusei*, 2 como *C. glabrata*, 2 como *C. tropicalis* y 1 aislamiento no se pudo determinar. La discrepancia puede deberse a que en este estudio se aplicó este método únicamente a las cepas que presentaban inconsistencias por morfología y PCR, así no analizando las cepas que se identificaron como *C. albicans* siendo las más frecuentes.

Como las técnicas fenotípicas basadas en el cultivo son lentas. El otro objetivo propuesto fue la identificación genotípica de las especies de *Candida* así numerosos métodos se implementaron para el diagnóstico de infecciones por *Candida*. En el presente estudio, ensayos de PCR dirigidos a secuencias específicas de especies se utilizaron para la detección de 7 especies de *Candida* (Daef et al., 2014a).

El desarrollo de un enfoque simple para la identificación de las especies de *Candida* se basó en el uso de cebadores que amplifican los genes ITS1, ITS2 y el gen de la Topoisomerasa II y no mostraron resultados confiables ya que solo se pudo encontrar con mayor eficacia *C. albicans*, con un 100%, tanto el primer universal como el fragmento específico de la especie dan como resultado una banda característica con su peso molecular esperado, lo que permite un fácil reconocimiento de la especie en cuestión. Sin embargo, la metodología molecular para la identificación de *Candida no albicans* con un total de 42% en toda la investigación. No se logró determinar mediante el método de PCR el 44% de las cepas *no albicans* teniendo varios inconvenientes con los cebadores utilizados, como se muestra en la Tabla 8.

Los resultados obtenidos por el método genotípico difieren con varias publicaciones como Carvalho et al., (2007); García et al., (2017), Estrada Barraza et al., (2011) donde mencionan que la metodología molecular es altamente sensible y muestra resultados confiables, rápidos y repetibles. En uno de los estudios utilizando los cebadores ya mencionados, se encontraron con los siguientes rangos: 96,8% (ITS1) y del 99,7% (ITS2), comprobando que se identificaron todas las especies por esta metodología.

Uno de los objetivos importantes en esta investigación fue establecer el nivel de concordancia entre los métodos tradicionales y moleculares utilizados para identificar los aislados de *Candida* a nivel de especie.

Los resultados presentados en este estudio arrojaron una buena concordancia (0.77) entre el PCR y el método convencional, dando los siguientes resultados para cada especie: (100% compatibles) entre AHM y PCR para *C. albicans*  $\kappa=1$ , (100%) en AHM y (64%) en PCR para *C. glabrata*  $\kappa=0.76$ , referente a *C. guilliermondii* en AHM (78%) y PCR (56%)  $\kappa=0.83$  y *C. tropicalis* en AHM (100%) y PCR (67%)  $\kappa=0.75$ . Las cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis* no se puede tener porcentaje entre los dos métodos ya que solo se logró identificar mediante AHM y no se observó amplificación en PCR. Como se puede observar en la Figura 7. Esto discrepa con los datos obtenidos por Daef, Moharram, Eldin, Elsherbiny, & Mohammed, (2014b) donde tiene un 97.5% de concordancia general de la

snPCR con los métodos convencionales, agregando a su estudio el uso del medio CHROMagar Candida. La razón de esta discrepancia es que este estudio se realizó por método snPCR que tiene mayor especificidad que el método PCR.

También en una publicación realizada por Camacho Cardoso et al., (2017), indica que la PCR fue notablemente superior en la detección de especies (34.1%) respecto al CHROMagar Candida teniendo como resultados de cada especie: *C. albicans* (81%) PCR y (57.1%) Cultivo, *C. tropicalis* (31%) PCR y (9.5%) CHROMagar, *C. glabrata* (23.8%) PCR y (9.5) CHROMagar y *C. parapsilosis* (4.8%) PCR y (0) CHROMagar. Sin embargo un estudio elaborado por Sahiner et al., (2011) informaron que los métodos fenotípicos tradicionales, incluido el medio CHROMagar Candida proyectan resultados (100% compatibles) que las técnicas moleculares y dado que estos métodos fenotípicos eran simples y rentables en comparación con las técnicas moleculares, se deben considerar en la determinación de estos patógenos.

Se logró una identificación rápida con PCR para *C. albicans* siendo la única especie que se pudo reconocer por métodos fenotípico (AHM) y genotípico sin necesidad del Sistema API 20C AUX. Pero a diferencia de las demás especies no se obtuvieron resultados confiables por lo que se comparó con la metodología del Sistema API 20C AUX (Estrada Barraza et al., 2011).

La discrepancia que se encontró fue entre 26/170 cepas que se identificaron fenotípicamente como: *C. glabrata* (11/11 cepas), *C. guilliermondii* (7/9 cepas), *C. krusei* (1/1 cepa), *C. tropicalis* (42/42 cepas), *C. parapsilosis* (3/3 cepas) y por método molecular: *C. glabrata* (7/11 cepas), *C. guilliermondii* (5/9 cepas), *C. krusei* y *C. parapsilosis* no se halló molecularmente y *C. tropicalis* (28/42 cepas), así mostrando resultados negativos cuando se probaron con todos los cebadores de las especies. Como observa en la Tabla 9. Esto coincide con los datos de Daef et al., (2014b) que obtuvieron 3 de 127 aislamientos por método fenotípico y dieron resultados negativos por el método molecular. Ellos mencionan que la discrepancia que existe no se tiene clara la razón, pero se puede estar relacionado con insuficiencia en los métodos de identificación y puede ser necesaria una confirmación adicional por secuenciamiento de ADN. Al igual se tiene un hallazgo similar

por Ahmad, Mustafa, Khan, Al-Rifaiy, & Khan, (2004) encontraron que no se logró amplificar en snPCR a *C. krusei*, *C. dubliniensis* y *C. lusitaniae*.

Los métodos moleculares tienen la capacidad de disminuir el tiempo del laboratorio en la identificación de los patógenos que tienen un crecimiento lento o dificultades al cultivar; así, una de las ventajas de la PCR es su corto tiempo de procesamiento: al momento que se obtiene la muestra se procede a la extracción de ADN que tiene una duración aproximada de 2 h 30, continuando con la amplificación por PCR de ADN aislado con un estimado de 2 h 30 y 1 h para realizar electroforesis en gel de agarosa, incluido el tiempo requerido para preparar la mezcla de PCR y agarosa gel. Por lo tanto, las especies pueden identificarse dentro de tan poco como 6 h aproximadamente. Dando un tiempo casi similar a la mención de Carvalho et al., (2007) que tiene una duración de 5 h y Camacho-Cardoso et al., (2017) que tiene la misma duración a la investigación de 6 h comparado con este estudio. De acuerdo con Daef et al., (2014b) al realizar un snPCR su tiempo de identificación a cada especie de *Candida* fue de 8-10 horas y referente al estudio de Taira, Okay, Delgado, Esther, et al., (2014), el tiempo para los resultados de la PCR fue de 24 horas considerando a los pacientes en esta investigación.

En contraste con los métodos fenotípicos que pueden tomar varios días. Como la identificación en AHM se demora un lapso de 48-72 h al igual que el sistema API 20 C AUX y la prueba de tubo germinal siendo una prueba corta de 3 h es poco confiable especialmente en la identificación de *Candida no albicans*. Esto concuerda con varias publicaciones referente a la identificación de especies de *Candida*.

De acuerdo con varios estudios ya mencionados la PCR se considera un método con una alta sensibilidad y especificidad para las especies de *Candida* y los métodos fenotípicos tiene poca sensibilidad, gran riesgo a contaminación, variabilidad de los morfotipos, produciendo resultados falsos en los ensayos de asimilación de los sustratos y en las pruebas de tubo germinal (5 - 10 % de las cepas de *C. albicans* no producen tubo germinal y, también, es probable encontrar falsos positivos en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) de acuerdo con García et al., (2017). Acorde con Estrada Barraza et al., (2011), el cultivo en AHM es ampliamente validado para identificar las diversas capacidades de filamentos de

las diferentes especies, concordando con esta investigación que el método fenotípico dio con mayores resultados de especies de *Candida* que el método molecular y con la ayuda del sistema API 20C AUX se confirmaron las especies que obtuvieron problemas al reconocer en ambos métodos.

Se estima que un 5% entre todas las enfermedades asociadas a *Candida* spp. involucra a más de una levadura. Camacho-Cardoso et al., (2017) detecta asociaciones de dos y tres especies en la misma muestra biológica. Menciona que el encuentro de coinfecciones por dos o más especies en muestras clínicas también han sido reportada por otros autores. Lo que concuerda con este estudio ya que se encontraron 4 cepas que se determinaron con doble población. De acuerdo con Taira, Okay, Delgado, Esther, et al., (2014) *C. albicans* es a menudo involucrado en episodios de candidemia mixta, esto la especie estuvo presente en 2 cepas combinada con *C. tropicalis* siendo la segunda especie más frecuente en el estudio.

## 5.2. CONCLUSIONES

Entre las 170 cepas que se estudiaron obtuvimos: 99 cepas correspondientes a *C. albicans*, 42 cepas de *C. tropicalis*, 11 cepas *C. glabrata*, 9 cepas de *C. guilliermondii*, 3 cepas de *C. parapsilosis* y 1 cepa de *C. krusei*. Al igual se identificaron 5 cepas clasificadas en otras especies y no se encontró cepa de *C. auris* ya que no ha existido reporte en el Ecuador considerado como un patógeno emergente.

El agar harina de maíz + Tween 80 resulta muy útil para la identificación respecto a la capacidad de filamentación de las especies de *Candida*, ya que se puede observar con claridad la diferencia que existe y de esta manera identificar correctamente la levadura, pero este método debe estar acompañado de pruebas complementarias.

El método genotípico fue implementado para tener una mayor facilidad de identificación a las 7 especies que se estudiaron en este proyecto, cabe recalcar que como se menciona en muchas publicaciones se utilizó para 5 de las especies los primers universales ITS1 y ITS2, pero no fueron adecuados para la investigación a diferencia de los primers utilizados para *C. auris* y *C. parapsilosis*. Hay que tener en cuenta que los pesos moleculares de las especies de *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicales* fueron muy similares por lo que es necesario realizar un PCR simple para todas las muestras y poder identificarlas con mayor facilidad sin existir confusiones.

De acuerdo al índice kappa se obtuvo una buena concordancia entre los métodos utilizados en la investigación lo que sugiere que la PCR no se puede sustituir en su totalidad al método Dalmau y se requeriría la confirmación mediante secuenciación. Sin embargo para la identificación de *Candida albicans* se obtuvo un  $\kappa=1$  y para *C. guilliermondii* un  $\kappa=0.83$ , lo que sugiere que la PCR es de mucha utilidad para distinguir estas dos especies.

Según los resultados, el AHM mostró tres ventajas principales respecto al PCR: 1) se obtuvo un 15% más de resultados positivos; 2) fue posible detectar dos poblaciones y 3) el costo es mucho menor a la implementación de técnicas moleculares para cualquier

laboratorio. Estas características fundamentan la propuesta de utilizar esta técnica como válida para la identificación de las especies causantes de candidiasis o candidemias que en Ecuador no ha sido suficientemente estudiado este tipo de patógenos.

### 5.3. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar metodologías con un alta sensibilidad y especificidad como el CHROMagar y técnica de Dalmau siendo un método fácil y preciso para la identificación presunta de la *Candida* spp. y aplicar estos métodos en laboratorios de diagnóstico clínico con la finalidad de realizar una adecuada identificación de las especies de *Candida* y saber con exactitud la epidemiología de este patógeno y obtener más datos e investigar si existe presencia de *C. auris* en el país.

Para una correcta identificación de las diferentes especies de *Candida* se sugiere conocer datos de la historita clínica del paciente que ayudaran a una mejor implementación tanto de las técnicas moleculares como de las técnicas convencionales.

Los cebadores utilizados en este estudio no fueron muy específicos por lo que la PCR no pudo sustituir en su totalidad al método fenotípico. Es por ello que se recomienda realizar un mejor alineamiento de los primers con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de esta técnica molecular y complementar con una secuenciación para una identificación más específica de la especie.

Debido a las dificultades en la amplificación de los genes por los primers utilizados, varios autores proponen el uso de cebadores de cada especie en específico como son: CTR1 y CTR2 para *C. tropicalis*, CGL1 y CGL2 para *C. glabrata*, CPA1 y CPA2 para *C. parapsilosis*, etcétera. Así evitando confusiones que se dan al emplear primers universales.

*C. albicans* representa un serio problema de salud pública por su incremento y por la aparición de cepas resistentes a las opciones micóticas. Se propone dar continuación a este estudio investigando los factores de virulencia de las especies más conocidas de *Candida* y las más importantes que son: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. También determinar si existe alguna resistencia a diferentes antimicóticos hacia estas especies de *Candida*. Con el objetivo de dar mayor información que carece en Ecuador referente a estos patógenos.

## 5.4. BIBLIOGRAFÍA

- Academy, T., Academy, R., & Trakt, S. S. (n.d.). CANDIDIASIS. *Appl. Phys. A*, 73, 1–29.
- Ahmad, S., Mustafa, A. S., Khan, Z., Al-Rifaiy, A. I., & Khan, Z. U. (2004). PCR-enzyme immunoassay of rDNA in the diagnosis of candidemia and comparison with amplicon detection by agarose gel electrophoresis. *International Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.01.002>
- Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, M. del C., Guelfand, L., & Bianchi, M. (2010). Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2), 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.008>
- Arenas, R. (n.d.). *Micología médica ilustrada* (4ta ed.).
- Arias, A., Valderrama, M., Parra, D., Marín, J., Mazo, L., & Montoya, C. (2012). Caracterización clínica y epidemiológica de los pacientes con infección del tracto urinario asociadas al cuidado de la salud. *Investigacion & Educación En Enfermeria*, 30(1), 28–34. Retrieved from [http://0-www.index-f.com.llull.uib.es/new/cuiden/extendida.php?cdid=675775\\_1](http://0-www.index-f.com.llull.uib.es/new/cuiden/extendida.php?cdid=675775_1)
- Biasoli, D. M. (2013). *C a n d i d i a s i s*.
- Biomérieux S.A. (2010). Api20 C AUX Yeast identification system.
- Blanco, M. T., Sacristán, B., Lucio, L., Blanco, J., Pérez-Giraldo, C., & Cándido Gómez-García, A. (2010). La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.09.001>
- Buzón, L. M., Blanco, A. L., Loureiro, J., Franco, E., Antón Santos, J. M., & Campo, B. de M. (2017). *Manual AMIR*. (J. C. PAVÓN, B. R. MATEOS, E. F. DÍEZ, & AIDA SUÁREZ BARRIENTOS, Eds.) (6ta ed.).
- Camacho-Cardoso, J. L., Martínez-Rivera, M. Á., Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., López-Martínez, R., & Hernández-Hernández, F. (2017). Detección molecular de especies de *Candida* en especímenes de pacientes hospitalizados. *Gaceta Medica*

*de Mexico*, 153(5), 581–589. <https://doi.org/10.24875/GMM.17002535>

Canónico González, Y. (2015). *MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE Candida parapsilosis*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/9382/1/1080214879.pdf>

Capilla, B. H. (2017). *Caracterización del papel del dimorfismo y la respuesta humoral frente a Candida albicans en un modelo de colonización gastrointestinal*.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Carrillo, L., & Audisio, M. C. (2007). MANUAL de MICROBIOLOGÍA de los ALIMENTOS, (1), 1–191.

<https://doi.org/http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/4%20levaduras.pdf>

Carvalho, A., Costa-De-Oliveira, S., Martins, M. L., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Ludovico, P., & Rodrigues, F. (2007). Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology*, 45(7), 619–627.

<https://doi.org/10.1080/13693780701501787>

Castrillo-River, L., Palma-Ramos, A., & Padilla-Desgarenes, C. (2013). Biopelículas Fungicas. *Dermatologia Rev Mex*, 57(5), 350–361.

Castrillón Rivera, L. E., Ramos, A. P., & Desgarenes, C. P. (2005). Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatologia Revista Mexicana*, 49(1), 12–27.

Ceballos Garzón, A., Cortes, G., Morio, F., Zamora Cruz, E. L., Linares, M. Y., Ariza, B. E., ... Parra-Giraldo, C. M. (2019). Comparison between MALDI-TOF MS and MicroScan in the identification of emerging and multidrug resistant yeasts in a fourth-level hospital in Bogotá, Colombia. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1482-y>

Chakrabarti, A. (2015). *Candida glabrata* candidemia. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 19(3), 138. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.152753>

Dabiri, S., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in

- Candida species isolated from clinical specimens. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(3), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.009>
- Daef, E., Moharram, A., Eldin, S. S., Elsherbiny, N., & Mohammed, M. (2014a). Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of Candida species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 26(2), 255–262.
- Daef, E., Moharram, A., Eldin, S. S., Elsherbiny, N., & Mohammed, M. (2014b). Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of Candida species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 255–262. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000040>
- Databases, I. (n.d.). Api & Id 32. *Biomérieux*. Retrieved from <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>
- De la Calle Rodríguez, N., Santa Vélez, C., & Cardona Castro, N. (2012). Virulence factors of candida albicans and dermatophytes in keratinized tissues infection. *CES Medicine*, 26(1), 43–55. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a05.pdf>
- Espina, M., Guillen, G., Calvo, B., & Meza, L. (2005). Caracterización morfológica y fisiológica de las especies Cándida aisladas de la cavidad bucal de pacientes geriátricos. *Ciencia Odontológica*, 2, 110–119.
- Estrada-Barraza, D., Dávalos Martínez, A., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.003>
- Estrada Barraza, D., Dávalos Martínez, A., Flores Padilla, L., Mendoza De Elias, R., & Sánchez Vargas, L. O. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.003>

- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(11), 954–966. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.04.006>
- Galarza, L., & Herrera, P. (2012). Prevalencia de candidemia según el tipo de material para hemocultivo automatizado. *Revista De La Facultad De Ciencias Medicas*, *37*(1), 25–30. Retrieved from [http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS\\_MEDICAS/article/view/295](http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/295)
- García, L. T., Luna, L. J., Velasco, T. K., & Guerra, B. E. (2017). Nueva reacción en cadena de la polimerasa múltiple para el diagnóstico específico de especies implicadas en la candidiasis humana. *Biomédica*, *37*(June), 200–208.
- Guerrero Miranda, E. J. (2016). Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de *Cándida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016., 1–95. Retrieved from [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12484/IDENTIFICACIÓN%2C SUSCEPTIBILIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE CANDIDA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12484/IDENTIFICACIÓN%2C%20SUSCEPTIBILIDAD%20Y%20DISTRIBUCIÓN%20DE%20ESPECIES%20DE%20CANDIDA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Hall, R. A., & Gow, N. A. R. (2013). Mannosylation in candida albicans: Role in cell wall function and immune recognition. *Molecular Microbiology*, *90*(6), 1147–1161. <https://doi.org/10.1111/mmi.12426>
- Haran, J., Boyle, H., Hokamp, K., Yeomans, T., Liu, Z., Church, M., ... Moran, G. P. (2014). Telomeric ORFs (TLOs) in *Candida* spp. Encode Mediator Subunits That Regulate Distinct Virulence Traits. *PLoS Genetics*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004658>
- Identlev, P. (n.d.). Levaduras de interés médico. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/identlev.pdf>
- Jafari, Z., Motamedi, M., Jalalizand, N., Shokoohi, G. R., Charsizadeh, A., & Mirhendi, H. (2017). A comparison between CHROMagar, PCR-RFLP and PCR-FSP for identification of *Candida* species. *Current Medical Mycology*, *3*(3), 10–15.

<https://doi.org/10.29252/cmm.3.3.10>

Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans* : A Model Organism for Studying Fungal Pathogens . *ISRN Microbiology*, 2012(April 2014), 1–15.

<https://doi.org/10.5402/2012/538694>

Kordalewska, M., Zhao, Y., Lockhart, S. R., Chowdhary, A., Berrio, I., & Perlina, D. S. (2017). Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), 2445–2452.

Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873–880.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>

Liguori, G., Gallé, F., Lucariello, A., Onofrio, V. Di, Albano, L., Mazzarella, G., ... Rossano, F. (2010). Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp . identification. *NEW MICROBIOLOGICA*, 33, 63–67.

Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Govender, N. P., Colombo, A. L., ... Anastasia, P. (2016). *Clinical Infectious Diseases Advance Access* published October 20, 2016, 1–24.

López-Cordón, N. E. (2010). El papel de las manoproteínas. *Learning*, 21–23.

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2006). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología - *Medigraphic*, 3, 10–18. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>

López Ávila, K., Dzul Rosado, K. R., Lugo Caballero, C., Arias León, J. J., & Zavala Castro, J. E. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. *Mechanisms of Antifungal Resistance of Azoles in Candida Albicans. A Review.*, 27(3), 127–136.

López, C., Giro, L., Ramos, L., Ramadán, S., & Bulacio, L. (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista*

*Argentina de Microbiología*, 37, 16–21.

- Losada., M. del mar M., & Pascual, C. R. (2007). Candidiasis. In *Tratado de geriatría para residentes* (pp. 443–448). Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19851308467.html>
- Manterola, C., Grande, L., Otzen, T., García, N., Salazar, P., & Quiroz, G. (2018). Confiabilidad, precisión o reproducibilidad de las mediciones. Métodos de valoración, utilidad y aplicaciones en la práctica clínica. *Revista Chilena de Infectología*, 35(6), 680–688. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000600680>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mouriño, R. R. (2010). acción de dos métodos moleculares para la identificación rápida de especies del género *Candida* en muestras vaginales.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfäuer, M. (2014). *Microbiología Médica*. <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A., & Colombo, A. L. (2010). Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 561–570. <https://doi.org/10.1086/655683>
- Ochiuzzi, M., Cataldi, S., Guelfand, L., Maldonado, I., & Arechavala, A. (2014). Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 107–110.
- Ortigoza Medrano, E., & Arroyo Espinosa, D. I. (2014). Susceptibilidad in vitro de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el hospital de especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. *Medicina Interna de Mexico*, 30(4), 373–380.
- Pagès, A., Iriart, X., Molinier, L., Georges, B., Berry, A., Massip, P., & Juillard-Condât, B. (2017). Cost Effectiveness of *Candida* Polymerase Chain Reaction Detection and Empirical Antifungal Treatment among Patients with Suspected Fungal Peritonitis in the Intensive Care Unit. *Elsevier*, 20(10), 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.06.009>

- Paredes, C. V. T. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect*, 26(2), 144–150. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000200005>
- Pérez, J. E., Cárdenas, C., & Hoyos, A. M. (2011). Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la onicomicosis en un laboratorio de referencia, Manizales (Caldas), 2009. *Infectio*, 15(576), 168–176. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70081-9](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70081-9)
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S., ... Santiago, A. (2008). *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 515–521. <https://doi.org/10.1128/JCM.01915-07>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Mendez, M., Kibbler, C., Erzsebet, P., Chang, S. C., ... Santiago, A. (2006). *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3551–3556. <https://doi.org/10.1128/JCM.00865-06>
- Quintana, S. M. C., Sjoström, P. D., Baldeón, G. M., Socarrás, D. A., Paz, M. C., & Molina, A. H. (2017). Genome of *Candida albicans* and drug resistance. *Salud Uninorte*, 33(3), 438–450. <https://doi.org/10.14482/sun.33.3.10914>
- Sahiner, F., Ergünay, K., Ozyurt, M., Ardiç, N., Hoşbul, T., & Haznedaroğlu, T. (2011). Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as nosocomial pathogens. *Mikrobiyoloji Bulteni*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21935781>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, Mendes, M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1–31.
- Sicilia, L. M., & Cuesta, S. F. (2016). *Identificación de Levaduras*.

- Taira, C. L., Okay, T. S., Delgado, A. F., Ceccon, M. E. J. R., de Almeida, M. T. G., & Del Negro, G. M. B. (2014). A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-406>
- Taira, C. L., Okay, T. S., Delgado, A. F., Esther, M., Rivero, J., Teresa, M., ... Del, B. (2014). A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infectious Diseases*, *14*(406), 1–7.
- Torres Rodriguez, J. M., Morera, Y., & Lopez, O. (2015). *Candida glabrata*: un patógeno emergente. *Biociencias*, *10*(1), 89–102. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..1.2859>
- Treviño Rangel, R., González González, J. G., Garza González, E., & González, G. (2012). *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Elsevier*, *14*(56), 155–163. Retrieved from [www.elsevier.es/en/node/2090153](http://www.elsevier.es/en/node/2090153)
- Usar, P. (2003). *BD Mycosel Agar • BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol and Cycloheximide*. Becton, Dickinson and Company.
- Valenzuela, M. T. (2009). *Vigilancia Epidemiologica*. Universidad de los Andes. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2006.11.007>
- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *10*(1), 95–105. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>

## 5.5. ANEXOS

### ANEXO.1 Protocolo de extracción de DNA Mini Kit

#### LISIS:

1. Resuspender las bacterias en 180ul de PureLink® Genomic Digestion Buffer.
2. Añadir 20 µL de proteinasa K y pasar brevemente por vortex.
3. Incubar el tubo a 60 ° C previamente pasar por vórtex 1 minuto, hasta que la lisis esté completa (2 horas).
4. Añadir 20 µL de ARNasa A al lisado, mezclar bien con vortex, e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
5. Añadir 200 µl de Lisis Genómica PureLink® y mezclar bien por Vórtex para obtener una solución homogénea.
6. Añadir 200 µl de etanol 96-100% al lisado. Mezclar bien con vortex durante 5 segundos para producir una solución homogénea.

Nota: Al procesar varias muestras, puede preparar un Buffer/Etanol Mezcla mezclando 200 µl de Lysis/Binding Buffer y 200 µl 96-100% Etanol para cada muestra.

#### Binding DNA:

1. Añadir el lisado 600µl preparado a la columna PureLink® Spin.
2. Centrifugar la columna a 13.300rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Desechar el tubo de recolección y colocar la columna PureLink® Spin en un tubo de recolección nuevo.

#### Lavado de DNA:

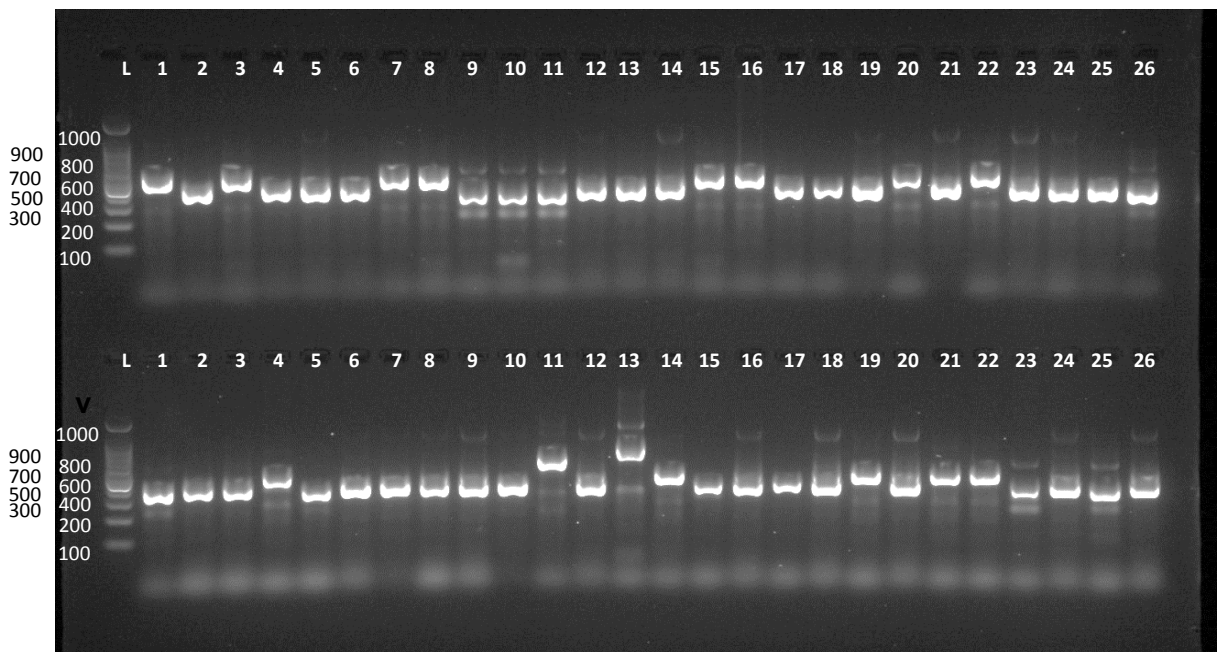
1. Añadir 500 µl de tampón de lavado 1 preparado con etanol a la columna.
2. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a 13.300rpm durante 1 minuto.
3. Deseche el tubo de recogida y coloque la columna de giro en un tubo limpio

4. Añadir 500  $\mu$ l de tampón de lavado 2 preparado con etanol a la columna.
5. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 3 minutos
6. Deseche el tubo de recogida.

Elución DNA:

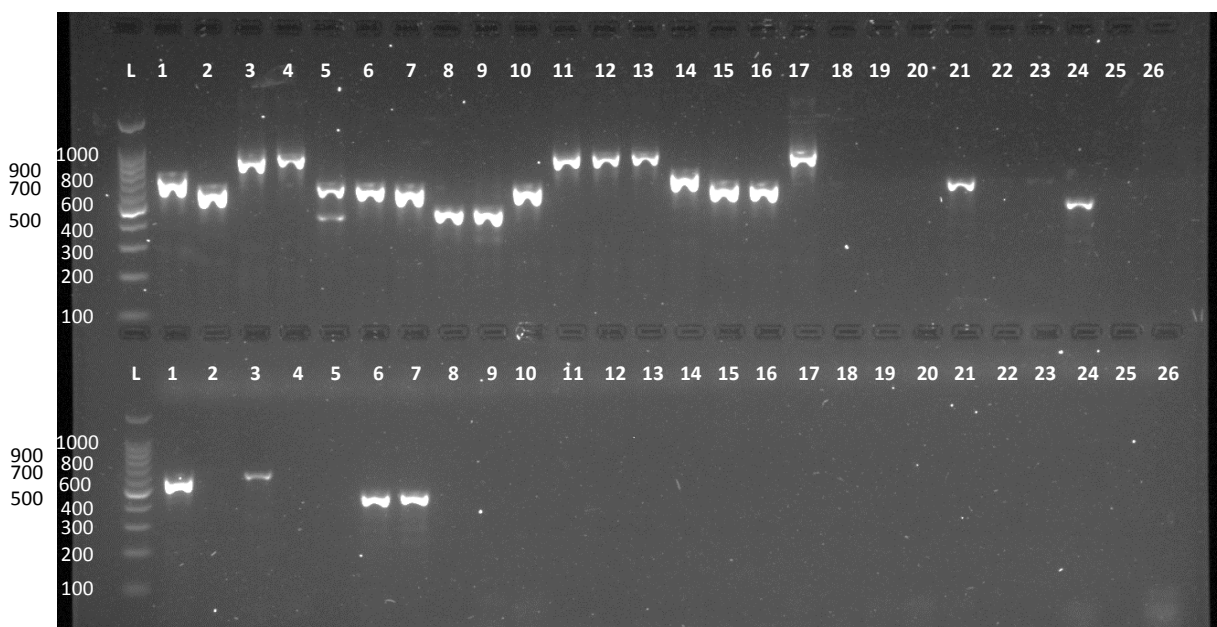
1. Coloque la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífugo estéril de 1,5 ml.
2. Añadir 100  $\mu$ l de PureLink® Genomic Elution Buffer a la columna.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna en Velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN genómico.
4. Repetir el proceso con la misma columna en un nuevo tubo estéril de 1,5 ml para recuperar más ADN.
5. Almacenar ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO.2 Electroforesis en gel de agarosa de cepas almacenadas



**Figura 9.** Gel 1 de agarosa que muestra los resultados obtenidos para la PCR de ADN genómico de levadura aislado: L, Ladder escalera de ADN de 100 pb

Primer carril: 1, *C. guilliermondii*; 2, *C. albicans*; 3, *C. tropicalis*; 4, 5, 6 *C. albicans*; 7, OE; 8, *C. tropicalis*; 9, *C. albicans*; 10, OE; 11, ND; 12, 13, *C. albicans*; 14, 15, 16, *C. guilliermondii*; 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, *C. albicans*; 26, *C. tropicalis*. Segundo Carril: 1, *C. tropicalis*; 2, 3, *C. albicans*; 4, *C. tropicalis*; 5, ND; 6, 7, 8, 9, 10, *C. albicans*; 11, ND; 12, *C. albicans*; 13, *C. glabrata*; 14, *C. tropicalis*; 15, 16, 17, 18, *C. albicans*; 19, *C. tropicalis*; 20, *C. albicans*; 21, *C. tropicalis*; 22, 23, ND; 24, *C. albicans*; 25, ND; 26, *C. albicans*.



**Figura 10.** Gel 2 de agarosa que muestra los resultados obtenidos para la PCR de ADN genómico de levadura aislado L, Ladder escalera de ADN de 100 pb. Primer carril: 1, *C. albicans*; 2, *C. tropicalis*; 3, *C. glabrata*; 4, *C. glabrata*; 5, *C. parapsilosis*; 6, *C. tropicalis*; 7, *C. tropicalis*; 8, *C. tropicalis*; 9, *C. tropicalis*; 10, *C. tropicalis*; 11, *C. glabrata*; 12, *C. glabrata*; 13, *C. glabrata*; 14, *C. albicans*; 15, *C. tropicalis*; 16, *C. guilliermondii*; 17, *C. glabrata*; 21, *C. albicans*; 24, *C. tropicalis*. Segundo carril: 1, *C. tropicalis*; 3, *C. albicans*; 6, *C. guilliermondii*; 7, *C. albicans*. Los pocillos que no presentan banda se realiza una confirmación con todos los cebadores que se utilizarán en el estudio.

### ANEXO.3 Identificación de las cepas de *Candida* spp. almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la PUCE

**Tabla 11.** Resultados de la identificación de especies de *Candida* almacenados en la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE.

N ° de muestra	Teórico	Resultado	TG	AHM	API	PCR	OB
1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	NR	+	
2	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	+	+	
3	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
5	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
6	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
9	<i>C. tropicalis</i>	Otras especies	-	ND	ND	ND	
10	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
11	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
12	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
13	Otras especies	<i>C. famata</i>	-	ND	+	ND	
14	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
15	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
16	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
17	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
18	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
19	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	NR	+	
20	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
21	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	+	+	
22	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
23	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	NR	+	
24	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
26	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
27	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
28	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
29	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
30	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
31	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
32	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
33	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
34	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
35	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
36	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	

37	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
38	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
39	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
40	<i>Otras especies</i>	<i>C. lusitaniae</i>	-	ND	+	ND	
41	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
42	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
43	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
44	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
45	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
46	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
47	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
48	<i>C. pseudotropicalis</i>	<i>C. famata</i>	-	ND	+	ND	
49	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
50	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	NR	+	
51	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
52	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
53	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
54	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
55	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
56	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
57	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
58	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
59	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	DP
60	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
61	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
62	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
63	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	-	ND	+	ND	
64	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
65	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
66	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
67	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
68	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
69	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
70	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
71	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
72	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	NR	+	
73	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	+	+	
74	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
75	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	+	+	ND	
76	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
77	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
78	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
79	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	

80	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
81	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
82	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
83	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
84	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
85	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
86	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	+	+	
87	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
88	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
89	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	DP
90	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
91	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
92	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	
93	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	NR	+	
94	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
95	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
96	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	ND	+	ND	
97	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
98	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
99	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	+	ND	
100	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
101	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
102	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
103	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
104	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
105	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
106	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
107	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
108	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
109	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
110	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
111	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
112	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
113	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
114	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
115	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
116	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
117	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
118	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
119	<i>C. glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	ND	+	ND	
120	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	DP
121	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
122	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	

123	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
124	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
125	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	+	ND	
126	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	+	+	ND	
127	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-	+	+	ND	
128	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	+	ND	
129	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	+	ND	
130	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
131	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	+	ND	
132	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
133	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
134	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
135	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
136	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	+	ND	
137	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	-	+	+	ND	
138	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
139	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
140	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
141	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
142	<i>C. tropicalis</i> y <i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	DP
143	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
144	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
145	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
146	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
147	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
148	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	
149	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	
150	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
151	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
152	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
153	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
154	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	
155	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
156	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	ND	
157	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
158	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
159	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
160	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
161	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
162	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
163	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
164	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	

165	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
166	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	+	+	NR	+	
59-1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	-	+	NR	+	
89-1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
120-1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	+	NR	+	
142-1	<i>C. tropicalis</i> y <i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	-	+	NR	+	

\*NR: no se realizó prueba; \*TG: formación de tubos germinativos; \*AHM: agar harina de maíz; \*API: API20C; \*PCR: PCR single; \*+,: resultados específicos; \*,-: resultado negativo; \*ND: resultados que no permiten determinar inequívocamente la especie; \*DP: doble población; \*OB: Observación.