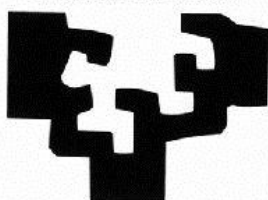


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Odontología
Medikuntza eta Odontologia Fakultatea

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Immunologia, Microbiologia eta Parasitologia Saila

Caracterización de aislamientos atípicos de *Candida dubliniensis*

Tesis Doctoral

Olatz Albaina Bacaicoa

Leioa, 2012



Agradecimientos

En estas líneas quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este trabajo.

Las primeras palabras de este apartado van necesariamente dirigidas desde una sincera y profunda emoción a la memoria del Dr. José Pontón, uno de los directores de esta tesis, que magistralmente esbozó y definió el contenido de este proyecto y a nivel humano supo ilusionarme, apoyarme, orientarme incondicionalmente. Su enorme fortaleza y espíritu luchador han sido una fuente inagotable de inspiración para mí durante estos largos años de trabajo.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. María Dolores Moragues por asumir con una entereza digna de mención la dirección de esta tesis en un momento duro para todos pero muy especialmente para ella. Gracias por la cercanía y la ilusión que me has transmitido. Por la confianza, disponibilidad y el tiempo que me has dedicado. Muchísimas gracias.

Agradecimiento absoluto también para el Dr. Iñigo Fernández de Larrinoa, por asumir la dirección de la tesis en una fase tan avanzada y por conseguir renovar mi energía y entusiasmo por este proyecto. Muchísimas gracias.

Agradezco al Dr. Ramón Cisterna, Director del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología por haberme permitido realizar esta tesis en su departamento.

Gracias al Dr. Guillermo Quindós, responsable de modificar definitivamente mi carrera y expectativas profesionales al sugerirme y brindarme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación. Gracias por guiar mis primeros e inexpertos pasos en este apasionante y no exento de dificultades campo.

A la Dra. Elena Eraso, gracias por tu generosidad, profesionalidad, amistad y apoyo absoluto. Has sido mi soporte más firme y constante durante todas y cada una de las etapas de este proyecto, pero también en todos los momentos personales difíciles que he afrontado y, como no, también en todos los buenos momentos.

Dra. Carmen Amurrio por velar durante todo este camino por este proyecto que hoy ve la luz. Tu apoyo y orientación a nivel personal han sido absolutamente claves para mí. Gracias.

A todos mis compañeros de mi laboratorio por el apoyo de todos estos años: Marilú, Esti, Arantza, Inés y en especial a Jonathan con quien he compartido momentos de crisis, de dudas, de ofuscación, de dificultades técnicas pero también de risas, ilusión y confianzas. Os deseo muchísima suerte.

A todos mis compañeros del laboratorio en el que di mis primeros pasos (Laboratorio de Guillermo Quindós): María, Samba, Aketza, Marcelo, Sandra y especialmente a mis dos amigas y compañeras Cristina y a Ilargi. Cristina gracias por dedicarme tu tiempo cuando el laboratorio era un desconocido para mí, por el cariño que siempre me has demostrado y que va muchísimo más allá de lo estrictamente profesional. Muchas gracias Ilargi por tu maravillosa capacidad para contagiar tu alegría y positivismo en todos estos años, la he necesitado en muchos momentos. Mucha suerte.

A los del labo de Ciencias Ana, Andoni y Dalila, gracias por ayudarme y enseñarme todo cuanto he necesitado.

A Mariangel, Almudena, Jon, Enrique y Juan por resolverme todos los problemas de papeleo que me surgían cada día.

A Ricardo y Alex por su ayuda con la microscopía electrónica y confocal. A Kerman por su disponibilidad y ayuda con la proteómica y a Irati por su ayuda con las secuencias genómicas.

Tengo que agradecer a David Coleman y a Derek Sullivan por haberme dado la oportunidad de compartir parte de mi tesis con vosotros. Quiero agradecer también a toda la gente del laboratorio: Mary, Gary, Francesco, Peter, Anna, Phillipa, Maria, Orla, Emma Louise y especialmente a Judy y Brenda por toda la ayuda recibida. El recuerdo de mi estancia en Dublín permanecerá siempre unido a vosotros, que me acogisteis con los brazos abiertos tanto a nivel profesional como para disfrutar de una buena Guinness.

Por último y más importante, quiero agradecer a mi familia. A mis padres, a quien dedico este trabajo por animarme y escucharme siempre que lo he necesitado. Por apoyarme en todas las decisiones tanto buenas o no tan buenas que he tomado y por enseñarme a luchar por lo que quiero. A mis hermanas Estitxu, Josune e Itziar por el cariño, por estar siempre que os he necesitado y animarme en todo momento, habéis sido mi gran apoyo durante todos estos años.

Gracias a Mónica por animarme y transmitirme su positivismo.

Un agradecimiento muy especial a Miguel Angel, por su comprensión y paciencia, por el apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar, pero principalmente por hacerme feliz. Parte de este trabajo te pertenece.

A todos ellos, muchas gracias.

A mis padres

Índice

1. Introducción	1
1.1. Características del género <i>Candida</i>	3
1.1.1. Distribución	4
1.2. <i>Candida dubliniensis</i>	4
1.2.1. Distribución y prevalencia.....	4
1.2.2. Morfología.....	5
1.2.3. Genoma.....	6
1.2.4. Ciclo sexual	7
1.2.5. Factores de virulencia.....	9
1.2.5.1. Dimorfismo	9
1.2.5.2. Secreción de enzimas hidrolíticas	12
1.2.5.2.1. Proteinasa aspárticas (Sap).....	12
1.2.5.2.2. Fosfolipasas	13
1.2.5.3. Adhesión	13
1.2.5.4. Carácter hidrofóbico.....	14
1.2.5.5. Cambio fenotípico o <i>switching</i>	14
1.2.6. Métodos de identificación de <i>C. dubliniensis</i>	15
1.2.6.1. Métodos fenotípicos	16
1.2.6.1.1. Fenotipo en medios cromogénicos.....	16
1.2.6.1.2. Producción de clamidosporas	18
1.2.6.1.3. Crecimiento a distintas temperaturas	19
1.2.6.1.4. Formación de tubo germinal	20
1.2.6.1.5. Pruebas bioquímicas: Asimilación de azúcares	20
1.2.6.2. Métodos inmunológicos	21
1.2.6.3. Métodos genotípicos	22
1.2.6.3.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
1.2.6.3.2. Amplificación aleatoria de secuencias de ADN (RAPD)	24
1.2.6.3.3. Hibridación con sondas específicas	25
1.2.7. Sensibilidad de <i>C. dubliniensis</i> a los antifúngicos.....	26
1.2.7.1. Bases de la resistencia a fluconazol	26
1.2.7.2. Bases de la resistencia a 5-fluorocitosina.....	27
1.3. La pared celular de <i>Candida</i>	28
1.3.1. Estructura y composición	29

1.3.1.1. Mananos	30
1.3.1.2. Glucanos.....	30
1.3.1.3. Quitina.....	31
1.3.1.4. Lípidos.....	31
1.3.1.5. Proteínas y glicoproteínas	31
1.3.2. Características antigénicas de la pared celular de <i>Candida</i>	32
1.4. Candidiasis.....	34
1.4.1. Candidiasis superficiales	34
1.4.2. Candidiasis sistémica.....	35
1.5. Terapia de la candidiasis.....	35
2. Justificación y Objetivos.....	37
3. Materiales y Métodos.....	41
3.1. Microorganismos	43
3.2. Plásmido pNIM1	44
3.3. Sueros policlonales y anticuerpos monoclonales.....	45
3.4. Medios y condiciones de cultivo.....	45
3.4.1. Medios de cultivo para <i>Candida</i>	45
3.4.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación para la formación de clamidosporas	47
3.4.3. Medios de cultivo y reactivos para bacterias.....	49
3.5. Obtención de extractos antigénicos de pared con DTT	50
3.6. Métodos para la caracterización de aislamientos de <i>C. dubliniensis</i>	51
3.6.1. Métodos fenotípicos	51
3.6.1.1. Capacidad de crecimiento a 45 °C.....	51
3.6.1.2. Producción de tubo germinal.....	52
3.6.1.3. Producción de clamidosporas.....	52
3.6.1.4. Crecimiento en medios cromogénicos	52
3.6.1.5. Asimilación de nutrientes: Galería API ID 32C® (bioMérieux)	53
3.6.2. Métodos inmunológicos	54
3.6.2.1. Test de aglutinación de partículas de látex (Bichro-Dubli® Fumouze).....	54
3.6.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	54
3.6.2.2.1. IFI con microscopía de fluorescencia	55
3.6.2.2.2. IFI con microscopía de láser confocal	57
3.6.2.3. IFI en blastosporas tratadas con DTT.....	57

3.6.3. Métodos moleculares.....	58
3.6.3.1. Extracción del ADN.....	58
3.6.3.2. Medida de la concentración de ADN.....	60
3.6.3.3. Técnica de PCR para diferenciar entre especies de <i>Candida</i>	61
3.6.3.3.1. Identificación en base a las diferencias en la región ITS y el gen de la topoisomerasa II.....	61
3.6.3.3.2. Identificación en base a las diferencias en el gen <i>HWPI</i>	62
3.6.3.4. Técnica de PCR para identificar los genotipos de <i>C. dubliniensis</i>	63
3.6.3.5. Técnica de PCR para determinar el tipo de <i>MTL</i> de <i>C. dubliniensis</i>	64
3.6.3.6. Secuenciación de la región D1/D2 de los aislamientos clínicos de <i>C. dubliniensis</i>	65
3.6.3.7. Electroforesis y visualización.....	66
3.7. Secuenciación nucleotídica del gen que codifica para la metionina sintasa de <i>C. dubliniensis</i> (<i>CdMET6</i>).....	67
3.7.1. Diseño de cebadores.....	67
3.8. Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR.....	68
3.8.1. Selección de genes a ensayar.....	69
3.8.2. Diseño de los cebadores.....	69
3.8.3. Determinación de la eficiencia de la reacción de amplificación.....	71
3.8.4. Extracción de ARN de levaduras.....	72
3.8.5. Transcripción inversa del ARN.....	72
3.8.6. Amplificación mediante qRT-PCR.....	73
3.8.7. Análisis de los resultados.....	74
3.9. Sensibilidad in vitro a los antifúngicos.....	75
3.10. Técnicas de análisis de proteínas.....	75
3.10.1. Determinación de la concentración de proteínas.....	75
3.10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	76
3.10.3. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).....	78
3.10.4. Tinción de geles con Azul de Coomassie.....	80
3.10.5. Electrotransferencia.....	81
3.10.6. Inmunodetección de antígenos.....	82
3.10.7. Detección de glicoproteínas mediante Concanavalina A.....	82
3.10.8. Aislamiento de componentes proteicos mediante electroelución.....	83
3.10.9. Desglicosilación de proteínas.....	84
3.10.10. Secuenciación de proteínas.....	84
3.10.11. Análisis de las secuencias.....	85

3.11. Expresión de <i>CdMET6</i> en <i>C. albicans</i>	85
3.11.1. Diseño de cebadores	86
3.11.2. Amplificación de la secuencia codificante	87
3.11.3. Plásmido pNIM1	88
3.11.3.1. Purificación del plásmido.....	88
3.11.3.2. Digestión con endonucleasas de restricción.....	88
3.11.4. Ligación.....	89
3.11.5. Transformación de células competentes	89
3.11.6. Rastreo de clones positivos.....	90
3.11.7. Transformación de células de <i>C. albicans</i> por electroporación.....	90
3.11.8. Rastreo de colonias transformadas	91
3.12. Microscopía electrónica de transmisión.....	93
4. Resultados.....	97
4.1. Caracterización de aislamientos atípicos de <i>C. dubliniensis</i>	99
4.1.1 Caracterización de los aislamientos atípicos del grupo blp (98-277, 95-677 y 94-234)	
.....	100
4.1.1.1. Métodos fenotípicos	100
4.1.1.1.1. Características morfológicas	100
4.1.1.1.2. Producción de tubo germinal	101
4.1.1.1.3. Capacidad de crecimiento a 45 °C	102
4.1.1.1.4. Producción de clamidosporas	102
4.1.1.1.5. Medios cromogénicos	104
4.1.1.1.6. Asimilación de azúcares	106
4.1.1.2. Métodos inmunológicos	107
4.1.1.2.1. Prueba de Bichro-Dubli Fumouze®.....	107
4.1.1.2.2. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	108
4.1.1.3. Métodos genotípicos	110
4.1.1.3.1. PCR.....	110
4.1.1.3.2. Determinación del genotipo de <i>C. dubliniensis</i>	111
4.1.1.3.3. Tipo de apareamiento de <i>C. dubliniensis</i>	112
4.1.1.3.4. Secuenciación de la región D1-D2 de los aislamientos de <i>C. dubliniensis</i>	
.....	113
4.1.1.4. Sensibilidad a antifúngicos <i>in vitro</i> : Sensititre YeastOne YO8	115
4.1.2. Caracterización de los seis aislamientos atípicos del grupo rosa.....	115

4.2. Estudio mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de la expresión de ocho genes asociados con la formación de clamidosporas	119
4.3. Identificación de un antígeno reconocido por el AcM 12F7-F2	125
4.3.1. Caracterización del componente proteico de la pared de alto peso molecular (>200 kDa)	125
4.3.1.1. Electroelución del componente de >200 kDa.....	125
4.3.1.2. Tratamientos enzimáticos: desglicosilación	126
4.3.2. Secuenciación del componente de 90 kDa	127
4.4. Secuenciación y análisis de la expresión del gen <i>CdMET6</i>	130
4.4.1. Secuenciación nucleotídica de <i>CdMET6</i>	130
4.4.2. Expresión del gen <i>CdMET6</i>	136
4.4.3. Inserción del gen <i>CdMET6</i> en <i>C. albicans</i>	137
4.4.4. Caracterización de la cepa <i>C. albicans-CdMET6</i>	139
4.4.4.1. Métodos fenotípicos	139
4.4.4.2. Métodos inmunológicos	139
4.4.4.2.1. Reacción con el AcM 12F7-F2 por microscopía confocal.....	140
4.4.4.2.2. Reacción del AcM 12F7-F2 frente a extractos de pared separados mediante electroforesis monodimensional y bidimensional (2D-PAGE)	141
4.5. Efecto del tratamiento con DTT de las blastosporas de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i> sobre la reacción con el AcM 12F7-F2	153
4.6. Localización celular del antígeno reactivo con el AcM 12F7-F2 mediante inmunocitoquímica.	154
5. Discusión	161
6. Conclusiones	179
7. Bibliografía	183

Abreviaturas

AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN de la hebra complementaria
AMB	Anfotericina B
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosín trifosfato
CAS	Casposfungina
Chaps	3 (cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
CMI	Concentración mínima inhibitoria
c.s.p.	Cantidad suficiente para
CWP	Proteína de la pared celular (Cell Wall Protein)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EE.UU.	Estados Unidos
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
y cols.	y colaboradores
5-FC	5-Fluorocitosina
FCZ	Fluconazol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
ITS	Espaciador Transcrito Interno
ITZ	Itraconazol
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltio
KTZ	Ketoconazol
M	Molar
mA	Miliamperio
MAP	Proteínas activadas por mitógenos

Mb	Megabase
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
mM	Milimolar
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
ORF	Marco de lectura abierta
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-TA	PBS con Azul de Evans y Tween 20
PBS-Ca-Mg	PBS con CaCl ₂ Ca y MgCl ₂ ·6H ₂ O
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCZ	Posaconazol
pI	Punto isoelectrico
PIR	Proteína de repeticiones internas
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
p/v	Peso/volumen
PVDF	Polivinilidenofluoruro
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RAPD	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR a tiempo real
R.U.	Reino Unido
SAP	Proteinasas aspárticas de secreción
sida	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
TBS	Tampón tris salino
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano

TRITC	Tetrametilrodamina de isotiocianato
U	Unidades enzimáticas
UPV/EHU	Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea
V	Voltio
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VCZ	Voriconazol
v/v	Volumen/volumen

1. Introducción

Los hongos son organismos eucariotas pertenecientes al reino *Fungi* que presentan un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, por lo que en la naturaleza se encuentran bien asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales, o bien como patógenos oportunistas de animales y plantas ⁽²¹⁾.

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías, una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos producen colonias algodonosas o pulverulentas. Observados al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares, formadas por múltiples células, que se denominan hifas. Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas cremosas. Observados al microscopio óptico, estos hongos presentan formas ovoides o esféricas y se reproducen por gemación o por fisión binaria ⁽²¹⁾.

1.1. Características del género *Candida*

Los hongos del género *Candida* fueron descritos por primera vez por Christine Marie Berkhout en 1923 ⁽¹⁸⁾. La clasificación actual engloba al género *Candida* dentro del reino *Fungi*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Ascomycotina*, clase *Ascomycetes*, orden *Saccharomycetales* y familia *Saccharomycetaceae*.

El género *Candida* comprende más de 200 especies de levaduras ⁽²²⁸⁾ que difieren por su capacidad de asimilar distintos compuestos, por la composición de los polisacáridos de la pared celular y por la capacidad de presentar diferentes morfologías. Solamente un pequeño número de estas especies son patógenas para los humanos, de hecho, el 65% de ellas son incapaces de crecer a 37 °C, primer requisito necesario para el éxito de cualquier organismo patógeno ⁽²⁹⁶⁾.

La gran mayoría de las infecciones fúngicas están producidas por *Candida albicans*, sin embargo cabe destacar otras especies patógenas oportunistas comunes responsables de causar enfermedades en el ser humano como *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis* o *Candida tropicalis* ^(124,142,248,264,286,332).

1.1.1. Distribución

Las especies del género *Candida* forman parte de la microbiota normal en aproximadamente el 50% de las personas ^(229,305), aunque los datos pueden variar dependiendo de la población estudiada. *Candida* es un comensal habitual en la cavidad oral, en el aparato digestivo y en la vagina. La especie que más frecuentemente se aísla dentro de este género es *C. albicans*, constituyendo un 60-80% de los aislamientos en la cavidad oral ^(223,272,291,292) y un 80-90% de los vaginales ⁽²⁷²⁾. Otros lugares anatómicos donde también se aísla *C. albicans* son las regiones húmedas o dañadas de la piel y las uñas ⁽²⁷²⁾.

C. glabrata también se encuentra comúnmente en la piel, en los ojos, en la cavidad oral, en el aparato digestivo y genital; *C. dubliniensis* puede causar candidiasis oral y vaginal, siendo más común en personas inmunodeficientes, principalmente infectadas por el virus de la inmunodeficiencia (VIH) ^(206,331). Otras especies del género como *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* son también colonizadoras habituales de la piel ⁽²⁷²⁾.

1.2. *Candida dubliniensis*

En 1995 se describió una nueva especie de *Candida*, *Candida dubliniensis*. El nombre de esta especie fue propuesto por Sullivan y cols. ⁽³³²⁾ puesto que este microorganismo fue inicialmente aislado de la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH en Dublín, Irlanda. Fue allí, mientras se realizaba una investigación epidemiológica de la candidiasis oral en personas con VIH y enfermos de sida, donde se observó que ciertos aislamientos tipificados en principio como *C. albicans* producían tubos germinales y clamidosporas pero no hibridaban de manera eficiente con la sonda de ADN 27A específica para *C. albicans* ^(298,328,332).

1.2.1. Distribución y prevalencia

Desde que *C. dubliniensis* fue descrita como una nueva especie, son numerosos los artículos que han confirmado su presencia en diferentes continentes tanto en Europa como en América, Sudáfrica o Asia ^(65,67,261,327,330). Este microorganismo ha sido aislado principalmente en la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH y en enfermos con sida con candidiasis oral ⁽³³²⁾, no obstante se ha descrito también su presencia, aunque en menor porcentaje, en la cavidad oral de sujetos sanos y más recientemente en pacientes con diabetes y en enfermos con cáncer

(15,258,301,352). Otros focos infecciosos donde también se ha aislado *C. dubliniensis* son la vagina, la orina, los esputos y la sangre (32,102,109,258).

Los datos acerca de la prevalencia de *C. dubliniensis* son bastante variables (172). Las tasas de prevalencia más elevadas de esta especie se han registrado en la cavidad oral de pacientes infectados por el VIH, con valores que oscilaban entre el 1,2 y el 48% (12,23,24,36,55,67,86,89,135,137,154,175,193,293,341), mientras que en pacientes con infecciones orales sin VIH, como la estomatitis protésica, se han registrado unas tasas de prevalencia inferiores con valores que oscilaban entre el 1,36 y el 8,9% (101,182,208).

Varios estudios relacionados con las tasas de prevalencia de este microorganismo en pacientes con otro tipo de patologías han registrado unos valores relativamente elevados: la diabetes con valores entre el 3,6 y el 18,23% (181,352), la fibrosis quística con un 11,1% (236) y el cáncer con valores entre el 2 y 4,64% (69,70).

Cabe destacar un estudio epidemiológico realizado por Blignaut y cols. en Sudáfrica, en el que observaron que la prevalencia de *C. dubliniensis* en individuos de raza caucásica con VIH (9%) era mayor que en individuos de raza negra (1,5%) (24).

1.2.2. Morfología

C. dubliniensis puede presentar 4 tipos morfológicos diferentes en función de las condiciones ambientales: levaduras o blastosporas, pseudohifas, hifas verdaderas y clamidosporas (76,105,326,329,332) (Figura 1.1).

Las levaduras son células de forma esférica u ovoide de 3 a 7 μm de diámetro, que se multiplican por gemación. Su crecimiento se ve favorecido en condiciones de aerobiosis, temperaturas inferiores a 33 °C y dentro de un rango de pH de 2,5-7,5.

Las pseudohifas están formadas por cadenas de blastosporas alargadas que simulan filamentos verdaderos.

El crecimiento en forma de hifas se ve favorecido por temperaturas superiores a 33 °C, la presencia de suero y pH cercano a la neutralidad. Las hifas tienen formas alargadas y están formadas por varias unidades celulares más o menos cilíndricas separadas por septos.

Las clamidosporas o clamidoconidias, son células grandes, redondeadas, con pared engrosada y baja actividad metabólica, que se producen en el micelio de forma intercalar o terminal, en

condiciones de escasez de nutrientes. Estas formas de resistencia, pueden dar lugar a nuevas levaduras o bien degenerar. Las clamidosporas se caracterizan por tener una capa externa compuesta principalmente por β -1,3 glucano y en menor proporción quitina, una gruesa capa interna compuesta por proteínas y una región central de la célula rica en ácido ribonucleico y glóbulos lipídicos ⁽¹⁴⁰⁾.

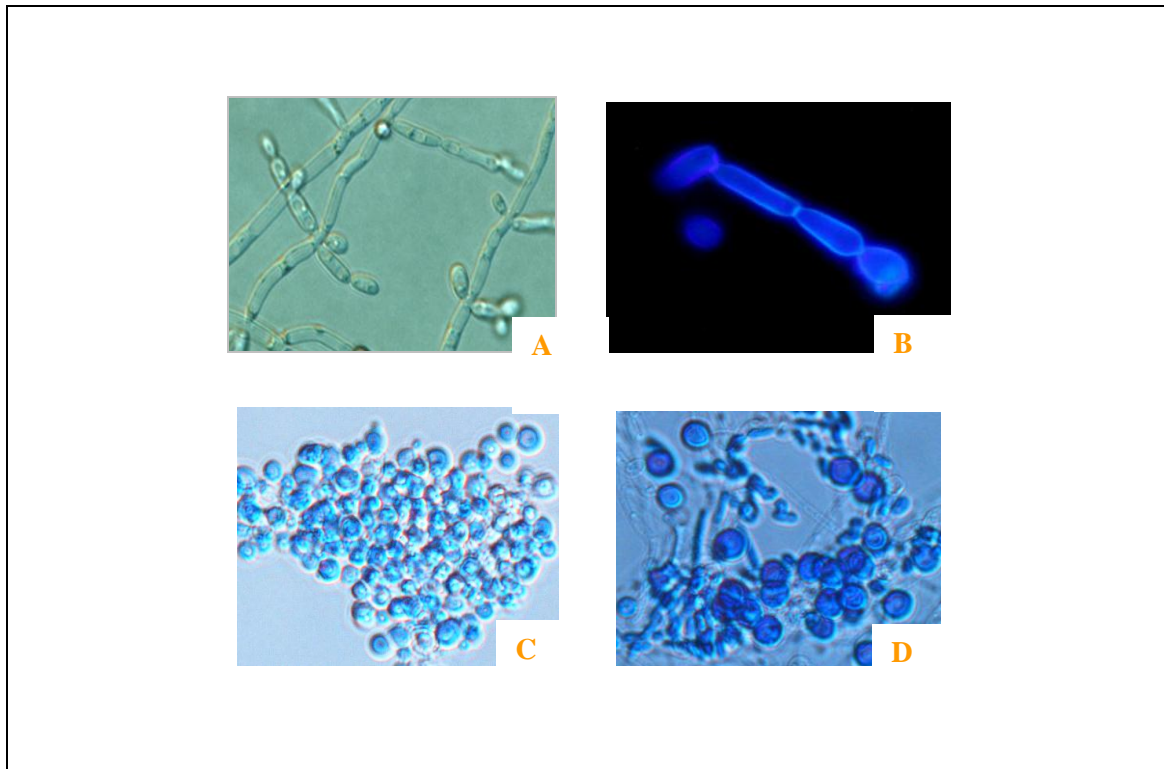


Figura 1.1. Morfología de *C. dubliniensis*. (A) Hifas; (B) pseudohifas teñidas con calcoflúor; (C) levaduras y (D) clamidosporas teñidas con azul de lactofenol.

1.2.3. Genoma

El genoma completo de *C. dubliniensis* fue secuenciado en el año 2009 ⁽¹³⁸⁾, está compuesto por ocho pares de cromosomas y se estima que su tamaño completo es de 14,6 Mb. La comparación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, revela que más allá de las diferencias cariotípicas, los genomas de las dos especies son muy similares, presentando una homología del 80% en el 96,3% de los genes (Tabla 1.1).

Muchas de las diferencias entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* se deben a la expansión de ciertas familias de genes relacionados con la virulencia en *C. albicans*. Algunos de los genes que están ausentes en *C. dubliniensis* están implicados en la formación de hifas, como los que codifican

para las proteínas de la superficie celular Hyr1 y Als3 y dos miembros de la familia de las proteinasas aspárticas, Sap5 y Sap6. Sin embargo, quizás la principal diferencia entre estas dos especies se deba al tamaño de la familia de genes telómero-asociado (TLO) que está compuesta por 14 genes en *C. albicans* y por dos genes en *C. dubliniensis* ^(138,201). Las diferencias entre ambos genomas, muestran las divergentes trayectorias evolutivas seguidas por ambas especies.

Tabla 1.1. Comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de varios genes representativos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* ⁽³²⁹⁾.

Gen	% homología nucleótidos	% homología aminoácidos	Referencia
<i>ACT1</i> (ORF)	98	99	(76)
<i>ACT1</i> (intrón)	83	No aplicable	(76)
<i>URA3</i>	93	98	(318)
<i>CDR1</i>	92	97	(202)
<i>MDR1</i>	92	96	(205)
<i>ERG11</i>	92	96	(239)
<i>SAP2</i>	90	94	(201)
<i>ERG3</i>	91	93	(252)
<i>PHR1</i>	89	92	(120)
<i>HWPI</i>	45	49	(201)

1.2.4. Ciclo sexual

Hasta hace unos pocos años *C. albicans* era considerado un organismo diploide con reproducción asexual, sin embargo, en 1996 se descubrió que posee un locus sexual homólogo al locus *MTL* (*Mating Type Like*) de *Saccharomyces cerevisiae* ⁽¹³⁰⁾. Debido a que la mayoría de los aislamientos clínicos de *C. albicans* son heterocigotos para el locus *MTL* (*MTLa/MTL α*) y por tanto expresan los dos tipos de información α y α , se pensó que ésta era la causa por la cual no se había observado un ciclo sexual en este organismo. Hull y cols. ⁽¹³⁰⁾ construyeron cepas homocigotas α/α o α/α y Magee y cols. ⁽¹⁷⁷⁾ crearon cepas que solamente expresaran un tipo de información de apareamiento (α/Δ y α/Δ), con las que lograron inducir el apareamiento sexual tanto *in vivo*, utilizando modelos de infección sistémica en ratones, como *in vitro*.

La homocigosis del locus *MTL* (*MTLa/MTLa* o *MTL α /MTL α*) de *C. albicans* no es suficiente para que se establezca el apareamiento. Se ha descrito que previamente es necesario un cambio fenotípico reversible de células blancas y lisas a células opacas y rugosas, y que estas últimas son 10^6 veces más eficientes para el apareamiento que las células blancas. Este cambio de fase

se mantiene en las células hijas durante varias generaciones y conlleva una reprogramación genética que implica aproximadamente unos 400 genes y produce células competentes para el apareamiento ^(196,307).

El locus *MTL* de *C. albicans* regula el cambio fenotípico de colonias blancas a opacas; el heterodímero $\alpha 1/\alpha 2$ es un represor que bloquea este cambio y por lo tanto el apareamiento al impedir la producción de células opacas (Figura 1.2) ⁽¹⁹⁶⁾. Se sabe que este cambio fenotípico que produce células competentes para el apareamiento está controlado por mecanismos epigenéticos que implican a los reguladores transcripcionales del locus *MTL* y éstos a su vez, regulan la expresión del gen *WOR1*, que es necesario para inducir este cambio fenotípico. La proteína Wor1p está presente a muy bajos niveles en células blancas, mientras que en células opacas su expresión aumenta ya que Wor1p se auto-regula activando su propia transcripción al unirse a su promotor, por lo que en células opacas, Wor1p se acumula ⁽³⁵⁷⁾.

Los mecanismos moleculares responsables de la de transición blanco-opaca de *C. albicans* están representados en *C. dubliniensis* con un 84% de homología, sin embargo, en esta última especie los mecanismos parecen ser menos uniformes y eficientes ⁽²⁶⁶⁾. Parece probable que esta variabilidad sea el resultado del alto nivel de inestabilidad genética característica de *C. dubliniensis* debido, en parte, al aumento de la frecuencia de recombinación mitótica ⁽¹⁴³⁾.

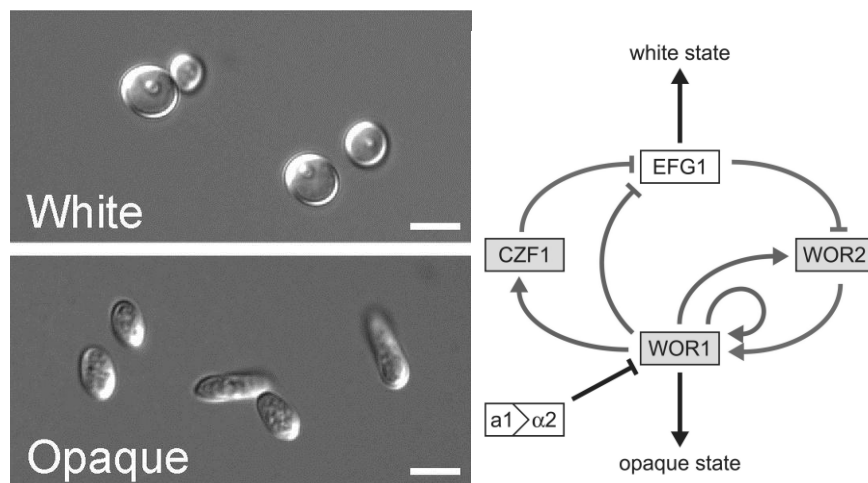


Figura 1.2. Cambio fenotípico en *C. albicans* de células blancas a células opacas ⁽³⁵⁶⁾.

1.2.5. Factores de virulencia

Identificar los factores asociados a la virulencia de las especies de *Candida* es una tarea complicada, debido a que estos hongos son patógenos oportunistas que suelen convivir en armonía con el huésped humano como parte de la microbiota comensal y sólo causan infección cuando las deficiencias del hospedador lo permiten ⁽²⁰³⁾.

En relación con la patogénesis, la especie mejor estudiada es *C. albicans*. En esta especie se han identificado diversos factores asociados con la virulencia, entre los que destacan las adhesinas, como por ejemplo el producto del gen *HWPI* ⁽³¹⁵⁾ o los de la familia de genes *ALS* ⁽¹²⁶⁾, junto con varias enzimas extracelulares como las proteinasas aspárticas ⁽²¹³⁾ y las fosfolipasas ⁽²¹⁶⁾. Uno de los factores de virulencia más importantes, es la capacidad de alternar entre levaduras y micelio ⁽³²⁴⁾ siendo ambas formas morfológicas esenciales para la virulencia. Las hifas desempeñan un papel clave en la adhesión, la invasión y la formación de biopelículas, mientras que las células de levadura es probable que sean requeridas para la difusión y la colonización inicial de las superficies del hospedador ⁽⁸⁸⁾.

C. dubliniensis comparte con *C. albicans* varios de estos factores de virulencia y quizás por ello, es difícil entender por qué hay tal disparidad en la capacidad de *C. albicans* y *C. dubliniensis* para colonizar y causar enfermedad en el ser humano ⁽²⁰³⁾.

1.2.5.1. Dimorfismo

Llamamos dimorfismo al proceso por el cual las levaduras de *C. albicans* experimentan un cambio estructural que afecta a la célula convirtiéndola en filamento miceliar (Figura 1.3.). La formación de micelio se relaciona con la virulencia debido a tres observaciones: la primera es que la filamentación se induce a 37 °C, y en presencia de suero y pH neutro, siendo estas condiciones similares a las que se encuentra *Candida* al infectar un huésped; segundo, se ha comprobado que los filamentos son más adherentes a las células de los mamíferos que las levaduras, y la adhesión es sin duda un paso previo a la penetración del hongo en los tejidos del huésped y, por último, las levaduras fagocitadas por macrófagos producen filamentos provocando la lisis de dichos macrófagos.

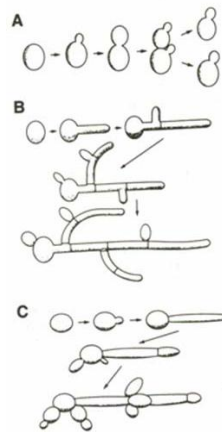


Figura 1.3. Formas de crecimiento de especies de *Candida*: levaduras (A), hifas (B) y pseudohifas (C) ⁽³⁹⁾.

C. dubliniensis manifiesta la capacidad de producir hifas ^(326,332) de una manera menos eficiente en comparación con *C. albicans* ^(105,204,219,321,321), siendo ésta una de las causas por las que *C. dubliniensis* es menos patógena que *C. albicans* ⁽³²¹⁾.

La expresión diferencial de genes que acompaña a la formación de hifas, es responsable de cambios tanto en el ciclo de división celular como en la composición y organización de la pared fúngica que originan el cambio morfológico (Figura 1.4). *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentan perfiles similares de expresión de genes, sin embargo, *C. albicans* muestra una mayor expresión de genes de virulencia específicos de hifas (por ejemplo, *ECE1*, *HWPI*, *HYR1* y *ALS3*), mientras que *C. dubliniensis* muestra una respuesta transcripcional más moderada y no expresa genes específicos de hifas como *HYR1* y *ALS3* ⁽¹³⁸⁾. Además, se han identificado varios genes con función desconocida que están específicamente regulados en *C. albicans*, mientras que están ausentes o muy divergentes en el genoma de *C. dubliniensis* (por ejemplo, *SFL2*) ⁽²⁰³⁾.

Uno de los reguladores de la transcripción más importantes que intervienen en el control de la morfogénesis de *C. albicans* es el producto del gen *NRG1*, cuya expresión en condiciones de inducción de hifas es baja, mientras que en *C. dubliniensis* su alto nivel de expresión en estas condiciones, evita la formación de hifas y hace que las células permanezcan en la fase de levadura ^(204,317).

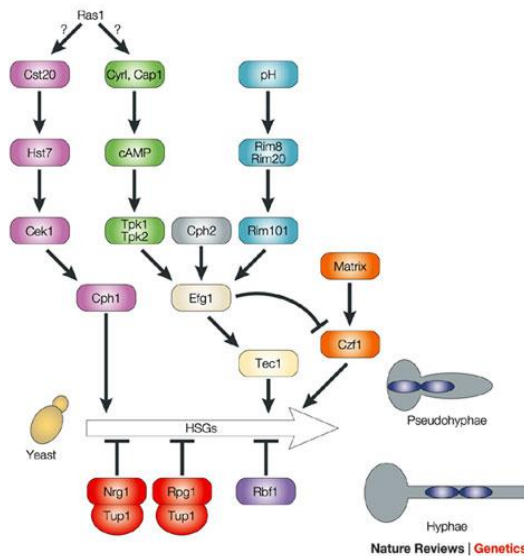


Figura 1.4. Esquema del control genético de la transición morfológica de *C. albicans* ⁽¹⁹⁾.

La formación de clamidosporas también se considera un proceso dimórfico. En ciertas condiciones de ausencia de oxígeno y escasez de nutrientes, parte de las hifas se rodean de una pared gruesa y se segregan del micelio parental en forma de clamidospora. Este cambio morfológico también está asociado con la expresión génica. En el repositorio de secuencias de *Candida* conocido como *SGD* (*Saccharomyces Genome Database*), se han reconocido hasta el momento 19 genes de *C. albicans* y 14 genes de *C. glabrata* implicados en el proceso de formación de clamidosporas. Entre ellos, algunos de los genes más relevantes son: *EFG1*, *NRG1*, *HOG1*, *OLE1*, *SUV3*, *SCH9*, *ISW2* y *RIM13* ⁽³¹⁶⁾.

El gen *EFG1* está involucrado en diferentes procesos morfológicos como la formación de clamidosporas, el cambio fenotípico blanco-opaco y el desarrollo de micelios ^(168,313,314,322). Deleciones en este gen bloquean la formación de hifas y de clamidosporas ⁽³¹³⁾.

El gen *NRG1* ⁽³¹⁷⁾ además de ser un gen regulador en la formación de hifas, también lo es en la formación de clamidosporas. El nivel de expresión de este gen es un factor determinante en la formación de clamidosporas, y diferencial entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En medios de inducción de clamidosporas como es el agar Staib, *C. albicans* presenta una sobreexpresión de este gen, lo que supone que la capacidad de formación de clamidosporas esté inhibida, creciendo las células en forma levaduriforme. Por el contrario, *C. dubliniensis* presenta una subexpresión del gen *NRG1*, favoreciendo la formación de clamidosporas y de hifas ⁽³¹⁷⁾.

El gen *HOG1* participa en dos procesos morfogénicos distintos, la transición de levadura a hifas y la formación de clamidosporas en *C. albicans* ^(10,79).

Krishnamurthy y cols. ⁽¹⁵⁸⁾ estudiaron el gen *OLE1* que codifica una desaturasa de ácidos grasos. Esta enzima es esencial para la síntesis de ácido oleico y es fundamental para la fluidez de la membrana. Estos autores demostraron que una baja expresión del gen *OLE1* permitía el crecimiento de *C. albicans*, pero inhibía la formación de hifas y bloqueaba el desarrollo de clamidosporas.

Nobile y cols. ⁽²¹⁷⁾ realizaron un amplio estudio acerca de los genes requeridos para la formación de clamidosporas en *C. albicans* y comprobaron que la delección de ciertos genes relacionados con la biogénesis mitocondrial (*SUV3*) ⁽¹⁹⁷⁾, el remodelamiento de la cromatina (*ISW2*) ⁽²¹⁷⁾ o la resistencia al estrés (*SCH9*) ^(85,342), impedían totalmente la formación de clamidosporas. El gen *RIM13*, que también favorece la formación de clamidosporas en *C. albicans*, codifica para una proteína que estimula este proceso mediante la activación del factor de transcripción Rim101p.

1.2.5.2. Secreción de enzimas hidrolíticas

La secreción de proteasas y otras enzimas hidrolíticas constituyen un factor de virulencia en *Candida* porque estas enzimas facilitan la progresión del hongo en los tejidos del hospedador ⁽⁵³⁾. Las principales enzimas hidrolíticas secretadas por *Candida* sp. son las proteinasas aspárticas (Sap) y las fosfolipasas.

1.2.5.2.1. Proteinasas aspárticas (Sap)

La familia de proteasas Sap es la responsable de la actividad proteolítica extracelular en *C. albicans*. Estas enzimas presentan su actividad óptima a un pH ácido. Esta característica es esencial para el hongo a la hora de infectar diversos tejidos ⁽¹²⁸⁾. Hasta el momento se conocen diez genes de la familia *SAP* (*SAP1* a *SAP10*), de los que *SAP4*, *SAP5* y *SAP6* se expresan específicamente en la forma micelial ^(129,212).

Aunque sólo tiene ocho genes *SAP*, *C. dubliniensis* presenta una elevada actividad proteolítica y adherencia a las células epiteliales bucales ^(74,105,114,190). Esta especie conserva sólo una de las proteasas relacionadas con la formación de hifas (*CdSAP4*) y carece de las otras dos (*CdSAP5* y *CdSAP6*) ⁽²⁰¹⁾.

La familia de genes *SAP* de *C. albicans* constituyen dianas potenciales para los agentes antifúngicos por lo que la búsqueda de genes *SAP* en *C. dubliniensis* y el estudio de las condiciones para su expresión diferencial podrían ayudar a discernir si la menor virulencia de *C. dubliniensis* es debida a sus diferencias genéticas, o más bien a que existan diferencias en la regulación de la expresión de sus genes.

1.2.5.2.2. Fosfolipasas

Son otro tipo de enzimas hidrolíticas extracelulares implicadas en la patogénesis de *C. albicans*. Aunque los primeros estudios señalaban que sólo *C. albicans* producía fosfolipasas extracelulares, posteriormente se ha comprobado que otras especies como *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* producen niveles detectables, pero significativamente menores de actividad fosfolipasa. La producción de fosfolipasas en *C. dubliniensis* además, presenta variaciones que dependen de los aislamientos clínicos y las condiciones de cultivo, entre otros factores ^(92,113,306).

1.2.5.3. Adhesión

La adhesión del hongo a los tejidos del huésped es un paso imprescindible para el inicio de la infección. El proceso de adhesión ocurre en varias fases. La primera fase es inespecífica y está basada en las fuerzas de atracción y repulsión entre las que destacan las interacciones hidrofóbicas de las superficies tisulares ⁽¹³⁴⁾. Esta etapa permite iniciar la colonización. A continuación, se establecen interacciones específicas entre proteínas de la pared celular de las levaduras que actúan como adhesinas y los receptores de las células epiteliales ⁽³⁴⁸⁾. Una vez adheridos, muchos microorganismos forman una biocapa, esto es una estructura tridimensional de levaduras e hifas envuelta en una matriz exopolimérica, y así establecen un sistema de vida que les protege ⁽⁷⁷⁾ y favorece su supervivencia e impide su erradicación ⁽²⁶⁷⁾.

Se han identificado diferentes adhesinas que promueven la adherencia de *C. albicans* a células del huésped o a ligandos de las mismas. Estudios genéticos han permitido identificar y aislar genes de *C. albicans* que potencialmente codifican estas adhesinas, entre los que se encuentran la familia génica *ALS*, y los genes *HWPI*, *INT1*, *MNT1* y *EAPI* ⁽⁴⁰⁾. Los productos de los genes *ALS1*, *ALS3* y *ALS5*, están implicados en la adhesión a las células huésped en *C. albicans*,

mientras que, *C. dubliniensis* expresa de una manera diferente estos genes y presenta tres secuencias diferentes de la familia *ALS* denominadas *ALSD1*, *ALSD2* y *ALSD3* ⁽¹²⁷⁾.

La proteína Hwp1p sólo se expresa en la forma miceliar y actúa como un sustrato para la enzima transglutaminasa, la cual es necesaria para establecer la unión covalente entre el hongo y las células huésped. En *C. dubliniensis* se ha identificado un homólogo de Hwp1, sin embargo ambas proteínas muestran significativas diferencias estructurales derivadas de la presencia de numerosas deleciones en el gen *HWP1* de *C. dubliniensis* ⁽²⁰¹⁾.

1.2.5.4. Carácter hidrofóbico

La hidrofobia de la superficie celular tiene un papel importante en la patogenia de los microorganismos. Se ha observado que las células hidrofóbicas de *C. albicans* se adhieren mejor que las hidrofílicas a una variedad de tejidos ^(118,119). Además, las células hidrofóbicas son también más resistentes que las hidrofílicas a la fagocitosis por macrófagos ⁽¹¹⁶⁾, por lo que una mayor hidrofobia proporciona a *C. albicans* protección frente a los mecanismos de defensa del huésped.

C. dubliniensis presenta una mayor adherencia a las células epiteliales de la boca, con respecto a *C. albicans* debido a sus diferencias en las propiedades hidrofóbicas ^(105,190,240). Se ha demostrado que mientras *C. albicans* pierde su carácter hidrofóbico a 37 °C, *C. dubliniensis* mantiene esta propiedad independientemente de la temperatura. Este comportamiento parece estar relacionado con la presencia de un tipo de N-glicanos que modulan la hidrofobia superficial de la célula de *C. albicans* ^(115,134) y son significativamente menos abundantes en *C. dubliniensis*. En contraposición al comportamiento descrito para *C. albicans*, las células hidrofóbicas de *C. dubliniensis* no son más resistentes a la fagocitosis ⁽²³⁷⁾.

1.2.5.5. Cambio fenotípico o *switching*

El cambio fenotípico en *C. albicans* fue caracterizado por primera vez por Slutsky y cols. ⁽³⁰⁸⁾ y Pomes y cols. ⁽²⁶⁰⁾. La transformación de levadura a micelio no es considerada como un cambio fenotípico, ya que cambia la morfología de toda la población, en respuesta a los factores ambientales. El fenómeno de cambio fenotípico ocurre en los lugares de infección ^(311,312) y se asume, además, que implica reordenamientos genéticos reversibles, tales como reordenamientos

cromosómicos ⁽²⁷⁹⁾. Se han descrito varios modelos de cambio fenotípico: formas lisas- rugosas ⁽²⁶⁰⁾, formas liso-micelial ⁽³¹²⁾ y formas blanco-opacas ⁽³⁰⁷⁾. Aunque el papel del cambio fenotípico en la virulencia de *C. albicans* todavía queda por determinar, se ha observado que las células opacas son más virulentas en infecciones cutáneas mientras que las células blancas son más virulentas en infecciones sistémicas ⁽¹⁶²⁾.

El cambio fenotípico se ha relacionado con la modulación de determinados factores de virulencia, como cambios en la capacidad antigénica, la morfología y tamaño celular, la adhesión, la secreción de proteasa ácida y fosfolipasas y la sensibilidad a los fármacos ^(148,164,307,310,312,347,350). Además, el cambio fenotípico altera de manera directa o indirecta, la expresión de muchos genes, como los reguladores transcripcionales (*EFG1* y *TUPI*) y algunos implicados en virulencia (*SAP*).

1.2.6. Métodos de identificación de *C. dubliniensis*

Candida dubliniensis presenta características fenotípicas casi idénticas a las de *Candida albicans* lo que hace difícil su identificación. Estas similitudes plantean un problema a la hora de realizar una correcta identificación de muestras clínicas en cuanto a especie de *Candida*. Para resolver este problema, se han desarrollado diversos métodos basados en sus características fenotípicas, genotípicas e inmunológicas con la finalidad de poder diferenciar entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*.

Algunos de los métodos fenotípicos se basan en el empleo de medios de cultivo diferenciales en los que se analiza el color de las colonias que desarrollan como consecuencia de la modificación de ciertos componentes del medio (medios cromogénicos), en el análisis de las características fisiológicas (prueba del tubo germinal o la prueba de termotolerancia), en la evaluación de características morfológicas microscópicas (formación de clamidosporas) o en las pruebas bioquímicas (asimilación de fuentes carbonadas). Entre los métodos inmunológicos hoy en día se dispone de una prueba de aglutinación con partículas de látex (Bichro-Dubli Fumouze[®]) para la identificación de *Candida dubliniensis*. En cuanto a los métodos moleculares existen diversas técnicas como la PCR, hibridación con sondas o RAPD que permiten diferenciar e identificar *C. dubliniensis* de *C. albicans*.

1.2.6.1. Métodos fenotípicos

1.2.6.1.1. Fenotipo en medios cromogénicos

La identificación de las especies de *Candida* por medios cromogénicos fue introducida por Nickerson en 1953, quien a través de la reducción del sulfito de bismuto y la morfología presentada en el medio BIGGY diferenciaba colonias de color beige o marrón a negras según la especie de *Candida* ^(214,215,218).

Posteriormente, en 1958, Pagano y cols. adicionaron al medio de agar Sabouraud dextrosa, un compuesto químico, el cloruro de trifenil-tetrazolio, cuya reducción por el hongo tiñe las colonias en varias tonalidades que permite diferenciar *C. albicans* de otras especies de *Candida* ⁽²³⁰⁾.

En los últimos años se ha promovido el uso de medios cromogénicos, ya que resulta un método muy atractivo por su sencillez y rapidez con el que, según los fabricantes, se obtiene la identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*. En la actualidad existen diferentes medios cromogénicos como por ejemplo CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Company, Francia), ChromID *Candida*® (bioMérieux, Francia) o Candiselect 4® (Bio-Rad, Francia).

El medio cromogénico CHROMagar *Candida*® (CAC) es un medio de cultivo que facilita el aislamiento y la identificación presuntiva de algunas especies del género *Candida* con relevancia en clínica. Este medio facilita el reconocimiento de cultivos mixtos de levaduras, de modo que la hidrólisis enzimática del agente cromogénico permite la identificación específica de las colonias de *C. albicans* por su color verde, las colonias de *C. dubliniensis* por su color verde oscuro (Figura 1.5); *C. tropicalis* por sus colonias de color azul rodeado por un halo de color rosa y las colonias de *C. krusei* por el color rosa y apariencia seca ^(17,20,45,65,67,95,96,100,107,123,125,195,227,265,351). Este medio resulta muy útil para identificar colonias de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en cultivos primarios de muestras clínicas después de 48 horas de incubación ^(65,67).

ChromID *Candida*® es un medio selectivo de levaduras que permite identificar la especie *C. albicans* y también es válido para la diferenciación presuntiva de un conjunto de especies de *Candida*, de modo que las colonias de color azul cobalto son *C. albicans* y las de color azul turquesa en general se corresponden con *C. dubliniensis* (Figura 1.5). En este medio, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr* desarrollan colonias de color rosa, mientras que el resto de las especies de *Candida* muestran color blanco ⁽⁸²⁾. Este medio presenta una alta sensibilidad y especificidad para discriminar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* ⁽⁸³⁾, sin embargo antes de

emitir un resultado definitivo hay que tener presente que aproximadamente un 8,6% de los aislamientos clínicos de *C. albicans* pueden desarrollar colonias de color azul turquesa ⁽⁸²⁾.

Candiselect 4[®] (CS4) es un medio de cultivo diferencial que facilita de manera presuntiva la identificación de *C. albicans* y otras especies de *Candida*; las colonias de *C. albicans* muestran un color rosa-morado y las colonias de *C. dubliniensis* verde oscuro ^(152,297), mientras que las colonias que ofrecen color turquesa engloban a las especies *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* ⁽³⁰²⁾.

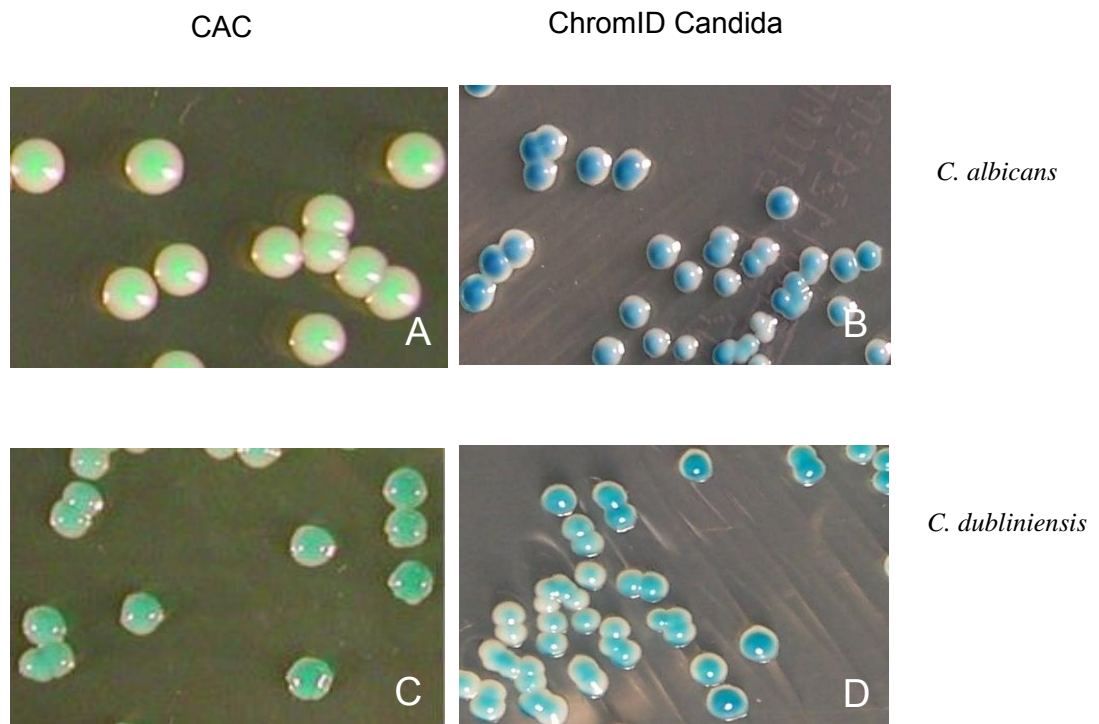


Figura 1.5. Color de las colonias en medio CHROMagar Candida a 37 °C durante 48 h. (A) *C. albicans* y (C) *C. dubliniensis*. Color de las colonias en medio ChromID Candida a 37 °C durante 48 h. (B) *C. albicans* y (D) *C. dubliniensis*. Fotografías modificadas a partir de una original de Eraso y cols. ⁽⁸³⁾.

1.2.6.1.2. Producción de clamidosporas

Se han desarrollado diferentes medios que contienen extractos de plantas o semillas y permiten la formación de clamidosporas en *C. dubliniensis*, mientras que en *C. albicans* no se forman clamidosporas y las colonias desarrolladas son lisas.

Algunos de los medios que promueven la formación de clamidosporas en *C. dubliniensis* son el agar Pal, elaborado con extractos de semillas de girasol (*Helianthus annuus*)^(6,231), o una modificación de este medio descrita por Sahand y cols.⁽²⁸³⁾ que mezcla a partes iguales medio CAC y agar Pal. Este último medio, denominado agar CHROM-Pal (CH-P), permite aislar y diferenciar los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* y los de *C. albicans* en base al color y aspecto de las colonias con una sensibilidad del 96,2% y una especificidad del 100% (Figura 1.6)⁽²⁸⁰⁾. Además, el componente CAC de este medio retiene la capacidad para diferenciar las colonias de *C. tropicalis* y *C. krusei*. En este medio, *C. dubliniensis* desarrolla colonias de color verde azuladas rugosas mientras que las de *C. albicans* son de color verde claro y lisas.

El agar Staib⁽³¹⁹⁾, elaborado con extractos de semillas de negrillo (*Guizotia abyssinica*) que fue desarrollado inicialmente para diferenciar *Cryptococcus neoformans* de otras levaduras, se ha mostrado también válido para diferenciar entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, debido a que induce la producción de clamidosporas en *C. dubliniensis*. Otros medios eficaces para la producción de clamidosporas son el agar caseína⁽²⁰⁹⁾, agar dicloran rosa bengala (DRBC)⁽²⁹⁷⁾, agar de zumo de tomate⁽¹¹⁾, agar de harina de maíz⁽³³²⁾, agar ácido cafeico citrato férrico⁽⁶⁾ o el agar tabaco^(150,159), sin embargo, este último medio no se considera adecuado para la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* puesto que el 96% de los aislamientos clínicos de *C. albicans* también producen clamidosporas en este medio⁽¹⁵⁹⁾.

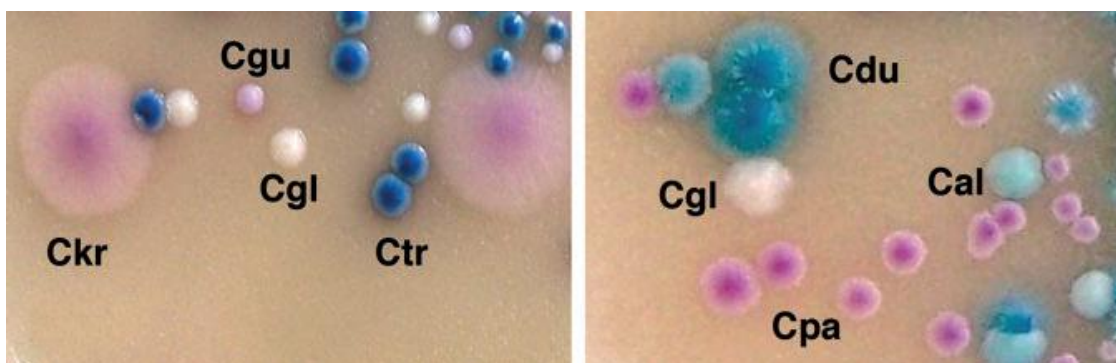


Figura 1.6. Color y morfología de las colonias desarrolladas en el medio CHROM-Pal. Cal, *C. albicans*; Cdu, *C. dubliniensis*, Cgl, *C. glabrata*; Cgu, *C. guilliermondii*; Ckr, *C. krusei*, Cpa, *C. parapsilosis*, Ctr, *C. tropicalis*⁽²⁸⁰⁾.

Además de los medios de producción de clamidosporas con extractos naturales, recientemente se ha desarrollado un nuevo medio sintético elaborado a partir del comercial Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB sin aa; Difco, EE.UU.) al que se adiciona galactosa y metionina ⁽⁶¹⁾. Se ha comprobado que en este medio *C. dubliniensis* es capaz de producir una gran cantidad de clamidosporas, mientras que las colonias de *C. albicans* crecen lisas sin producir clamidosporas.

1.2.6.1.3. Crecimiento a distintas temperaturas

C. dubliniensis y *C. albicans* crecen adecuadamente a 30 °C y 37 °C, produciendo unas colonias blancas cremosas en medios sólidos. *C. albicans* tiene la capacidad de crecer tanto a 42 °C como a 45 °C después de 48 horas de incubación; por el contrario, *C. dubliniensis* crece con dificultad a 42 °C y no crece a 45 °C (Figura 1.7) ^(65,326,332). Por lo tanto, el criterio de crecimiento diferencial a 45 °C es válido como método de discriminación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Sin embargo, antes de dar un resultado definitivo hay que tener en cuenta que aproximadamente el 10% de los aislamientos de *C. dubliniensis* son capaces de crecer débilmente a 45 °C ⁽³²⁶⁾ y que 8 de cada 12 aislamientos de *C. dubliniensis* son capaces de crecer a 42 °C ⁽³⁰⁰⁾.

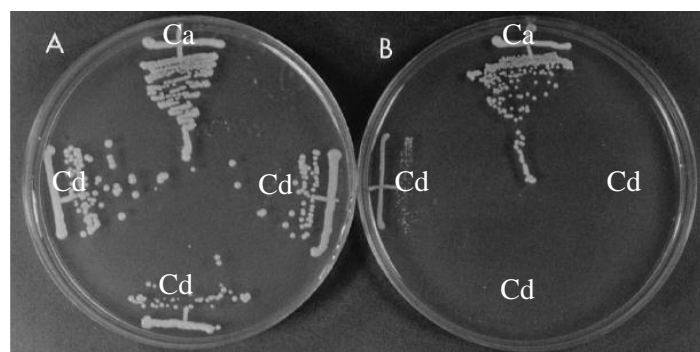


Figura 1.7. Crecimiento comparativo de aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* (Cd) y *C. albicans* (Ca) desarrollados en agar patata-dextrosa durante 48 h a 37 °C (A) y 42 °C (B). Imagen modificada de Sullivan y cols. ⁽³²⁶⁾.

1.2.6.1.4. Formación de tubo germinal

El tubo germinal es una extensión filamentososa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula parental y su longitud tres o cuatro veces mayor que ésta. La producción de tubo germinal, se trata de una prueba muy rentable, siendo además sencilla y rápida. Uno de los inconvenientes de este método es que las pseudohifas pueden ser confundidas con los tubos germinales, siendo necesario que el operador tenga experiencia previa para realizar una interpretación correcta del resultado.

En condiciones de inducción de tubo germinal, a temperaturas superiores a 33 °C y presencia de suero, *C. dubliniensis* y *C. albicans* son capaces de formar tubos germinales, sin embargo éstos son indistinguibles por lo que ésta no es una técnica que permita diferenciar entre ambas especies ^(224,332). Además, antes de emitir un resultado negativo se debe tener presente que, aproximadamente, un 5% de cepas de *C. albicans* no producen tubo germinal ⁽⁵⁰⁾ y que según un estudio realizado por Kim y cols. ⁽¹⁵³⁾ ciertos aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* no eran capaces de producir tubo germinal en suero de caballo pero sí con una combinación de suero de conejo y suero bovino fetal.

1.2.6.1.5. Pruebas bioquímicas: Asimilación de azúcares

Las pruebas bioquímicas se basan en la asimilación de azúcares y la detección de enzimas específicas, y son realizadas en la mayoría de los casos con galerías comerciales que mediante la presencia de turbidez por crecimiento celular o cambio de color del medio ponen de manifiesto un resultado positivo.

En la actualidad están disponibles diversos métodos semiautomáticos comercializados de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación ⁽⁹⁵⁾:

API 20C AUX[®] (bioMérieux) es un sistema comercial que permite la identificación de 34 especies diferentes de organismos levaduriformes. Se compone de 20 cúpulas conteniendo sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación (carbohidratos y glicerol).

API ID 32 C[®] (bioMérieux) es una galería de 32 cúpulas que permite realizar 29 pruebas de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos), un control negativo, una prueba de sensibilidad (cicloheximida) y una prueba colorimétrica (hidrólisis de la esculina). Incluye una

base de datos con 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y la lectura de los resultados después de 48 h de incubación a 30 °C puede realizarse de forma visual o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expresión o mini API.

Los sistemas comerciales API ID 32C[®] y API 20C AUX[®] (bioMérieux) permiten diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*^(331,332), puesto que los datos generados mediante estos sistemas revelan que el rango de los hidratos de carbono asimilables por *C. albicans* y *C. dubliniensis* son significativamente diferentes. Los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*, a diferencia de la gran mayoría de *C. albicans*, son incapaces de asimilar metil- α -D-glucósido, lactato o xilosa^{(154,331)(332)(285)}. Además, *C. dubliniensis* crece mucho más lentamente que *C. albicans* con D-trehalosa como única fuente de carbono.

Otra prueba de asimilación de azúcares son RapID Yeast Plus[®] (Innovative Diagnostic Systems, EE.UU.) que es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno de ellos contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos y de este modo permite identificar hasta 43 especies diferentes de levaduras⁽⁶⁸⁾. Otras de las pruebas son VITEK YBC[®] (bioMérieux) o el sistema automático VITEK 2 ID-YST[®] (bioMérieux)⁽²⁵⁰⁾ que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15 horas. Este último está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un *software* de análisis y un sistema experto avanzado. Permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*⁽⁶⁸⁾. Este último sistema permite diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* como consecuencia de las diferencias en la asimilación de los azúcares D-trehalosa, metil- α -D-glucósido y lactosa⁽⁴³⁾.

1.2.6.2. Métodos inmunológicos

La pared celular de *Candida* contiene un gran número de antígenos capaces de estimular potentes respuestas inmunológicas⁽²⁶²⁾. Es por ello que la composición y la estructura de la pared de *C. albicans* han sido ampliamente estudiadas con el objeto de identificar antígenos con relevancia diagnóstica⁽²²³⁾.

Diversos autores han publicado la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos a epítomos de naturaleza glucídica de la pared de *Candida* mediante la inmunización de animales con extractos de pared o células enteras^(33,47,333,344). Otros autores, han descrito la obtención de AcM frente a epítomos de naturaleza proteica mediante la inmunización con componentes

parcialmente purificados ^(46,186,200). Hasta el momento son pocos los AcM, anticuerpos policlonales, o fragmentos monocatenarios de anticuerpos que han demostrado ser capaces de diferenciar las células a nivel de especie, sin embargo Marot-Leblond y cols. ⁽¹⁸⁷⁾ han obtenido un AcM (3D9) que permite la identificación específica de *C. albicans* en fase micelial.

Bikandi y cols. ⁽²²⁾ desarrollaron un suero inmune que permitía la diferenciación de las blastosporas de *C. dubliniensis* de las de *C. albicans*, sin embargo, el uso de este suero inmune se limita a la técnica de IFI a causa de la reacción cruzada del suero con una variedad de antígenos intracelulares de otras especies de levaduras.

En el año 2006, Marot-Leblond y cols. ⁽¹⁸⁵⁾ desarrollaron un nuevo AcM, denominado 12F7-F2, que era específico por IFI para un antígeno de superficie de las células de *C. dubliniensis*. Estos autores no observaron reacción con otros géneros de hongos ni con otras especies del género *Candida*, incluyendo *C. albicans*. Con este AcM, se desarrolló una prueba comercial de aglutinación en látex (Bichro-Dubli Fumouze[®]; Diagnósticos Fumouze, Francia), que presenta una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de *C. dubliniensis* ⁽²⁸¹⁾.

1.2.6.3. Métodos genotípicos

Debido a la estrecha relación que existe entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, en algunas ocasiones se han producido identificaciones equívocas entre estas dos especies mediante los métodos fenotípicos ^(5,6,65,178,250,253,258,326,329-332). Como los métodos genéticos parecen mejorar la rapidez, la sensibilidad y a veces la especificidad, parece razonable pensar que éstos podrían ser la mejor herramienta para discriminar entre las dos especies de *Candida* ^(76,105,253,329,330), si bien es cierto que estas técnicas no están al alcance de todos los laboratorios.

Algunas de las técnicas que permiten identificar *C. dubliniensis* y diferenciarla de *C. albicans* son: RFLP, RAPD, huella dactilar de ADN, PCR o RT-PCR ⁽³³²⁾.

1.2.6.3.1. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada en 1986 por Kary Mullis ⁽¹⁶⁾ que presenta alta reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, por lo que cada vez es más utilizada en los laboratorios como base para la identificación de diferentes especies de hongos y otros microorganismos.

Existen varias modalidades de esta técnica: a) PCR convencional que consiste en amplificar un fragmento específico de ADN. b) PCR múltiple que permite la detección simultánea de varias

secuencias diana, incorporando múltiples parejas de cebadores en una misma reacción y c) PCR a tiempo real (RT-PCR) que permite medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado y registrar la cinética de la reacción de amplificación en cada instante ⁽¹²¹⁾.

- **Identificación en base a las diferencias en los genes del ARNr**

La región genómica más frecuentemente utilizada para identificar especies es la que incluye el complejo ribosomal (genes 18S, 5.8S y 28S). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos y también, dominios variables y regiones espaciadoras internas (ITS), altamente variables. Las secuencias conservadas se pueden utilizar para detectar la infección fúngica, mientras que las variables se pueden emplear para la identificación de las especies implicadas (Figura 1.8).

Actualmente, la región de los espaciadores es el fragmento que más se utiliza para la identificación de hongos, como por ejemplo *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Park y cols. ⁽²³³⁾ diseñaron unas sondas moleculares *beacon* a partir de las diferencias en la región ITS2 de las especies de *Candida*. Estas sondas específicas permitían identificar los aislamientos de *C. dubliniensis* y *C. albicans* de una manera rápida y fiable. Además, el análisis de esta región ha permitido a Gee y cols. describir cuatro genotipos de *C. dubliniensis* ⁽¹⁰²⁾.

Fell y cols. ⁽⁸⁷⁾ observaron que el análisis de la secuencia V3, correspondiente a la región variable de la subunidad mayor 18S del ARN ribosómico, proporcionaba información muy útil sobre las relaciones filogenéticas entre una variedad de microeucariotas marinos. El análisis de esta región, ha permitido a Gilfillan y cols. ⁽¹⁰⁵⁾, Kurzai y cols. ⁽¹⁶¹⁾ y Sullivan y cols. ⁽³³²⁾ diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*.



Figura 1.8. Estructura del ADN ribosómico con los fragmentos ITS.

- **Identificación en base a las diferencias asociadas con otros genes**

En estudios filogenéticos, se han estudiado ciertos genes como el gen *ACT1*, que codifica para la proteína actina. La comparación de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la actina de *C. dubliniensis* (*CdACT1*) con la de *C. albicans* (*CaACT1*) revela que los exones presentan una similitud del 97,9%, mientras que los intrones presentan sólo una similitud de 83,4%. El diseño de cebadores específicos a partir de una secuencia intrón del gen de *CdACT1* ha permitido identificar *C. dubliniensis* de una manera rápida y correcta mediante PCR⁽⁷⁶⁾. Otro de los genes con el que ha sido posible discriminar *C. albicans* y *C. africana* de *C. dubliniensis*, es el gen *HWPI*⁽²⁷³⁾. Kanbe y cols.⁽¹⁴⁵⁾ diseñaron cebadores específicos basados en la secuencia genómica de la topoisomerasa II (CDF28 y CDR110 R) para identificar *C. dubliniensis* mediante PCR. Por otra parte Innings y cols.⁽¹³¹⁾, tomaron como base el gen *RPR1* para diseñar sondas fluorescentes tipo *TaqMan* que permitió la detección, mediante RT-PCR múltiple de las ocho especies de *Candida* más frecuentes: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.

1.2.6.3.2. Amplificación aleatoria de secuencias de ADN (RAPD)

La técnica RAPD, denominada también por otros autores AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) o DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN mediante PCR, usando para ello un único cebador, cuya secuencia se elige al azar. Esta técnica se ha utilizado para estudiar los polimorfismos de ADN entre especies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis*^(166,332).

Con la ayuda de cinco oligonucleótidos Sullivan y cols. fueron capaces de caracterizar mediante RAPD, los aislamientos atípicos de *C. albicans*, que dieron lugar a la descripción de la especie *C. dubliniensis*⁽³³²⁾. Con esta técnica Mariano y cols. identificaron un 2% de aislamientos de *C. dubliniensis* en una colección de cepas que habían sido previamente catalogadas como *C. albicans*⁽¹⁸³⁾.

1.2.6.3.3. Hibridación con sondas específicas

La estructura de la población de *C. dubliniensis* fue inicialmente estudiada mediante una sonda de ADN específica para *C. dubliniensis*, denominada Cd25, la cual permitió dividir las cepas de la especie en tres grupos I, II y III ^(4,102,144). Tomando como referencia el patrón de bandas electroforéticas de cada cepa se calculó un coeficiente de homología (S_{AB}) en función del perfil de bandas compartidas y del perfil de bandas únicas. La mayoría de los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* procedentes de diferentes lugares del mundo pertenecen al grupo I, el cual presenta un alto coeficiente de homología (S_{AB}) con un valor de 0,8 ⁽¹⁰²⁾. El grupo II presenta un coeficiente S_{AB} algo menor con un valor de 0,47 ^(102,144) y los miembros del grupo III, que únicamente se han registrado en países de Oriente, como Egipto, Arabia Saudí e Israel, presentan un S_{AB} con un valor de 0,35 ⁽⁴⁾; además, se ha observado que éstos del último grupo mostraban altos niveles de resistencia a 5-fluorocitosina, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) igual o superior a 128 $\mu\text{g/ml}$ ⁽⁴⁾. Se ha comprobado que los tres grupos identificados mediante la sonda Cd25 se relacionan con los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* descritos por Gee y cols. ⁽¹⁰²⁾, el grupo I con el genotipo 1, el grupo II con los genotipos 2, 3 y 4 y el grupo III con los genotipos 3 y 4.

A finales de 1990, se describió la técnica denominada MLST, basada en el análisis de la secuencia de nucleótidos de un conjunto de genes de “mantenimiento”. Esta técnica fue inicialmente desarrollada para el análisis de la población de varias especies bacterianas ⁽¹⁸⁰⁾, sin embargo también se ha aplicado en el análisis de las levaduras como es el caso de *C. albicans* ^(26-29,56,221,338,340) y de otras especies de *Candida* ^(75,139,339). Mediante MLST, se estudian las diferencias en las secuencias de ocho lugares o “loci” (CdAAT1b, CdACC1, CdADP1, CdMPIb, CdRPN2, CdSYA1, exCdVPS13 y exCdZWF1b ⁽¹⁹²⁾), mediante las cuales, ha sido posible estructurar la población de *C. dubliniensis* en tres grupos, C1, C2 y C3, los cuales se corresponden también con los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* descritos por Gee y cols. ⁽¹⁰²⁾, de tal manera que al grupo C1 pertenecen aislamientos del genotipo 1, el grupo C2 se relaciona con el genotipo 2 y C3 se corresponde con los genotipos 3 y 4 ⁽¹⁹²⁾. Los análisis realizados mediante esta técnica revelan que *C. dubliniensis* presenta una divergencia significativamente menor en la estructura de su población que *C. albicans* (Figura 1.9).

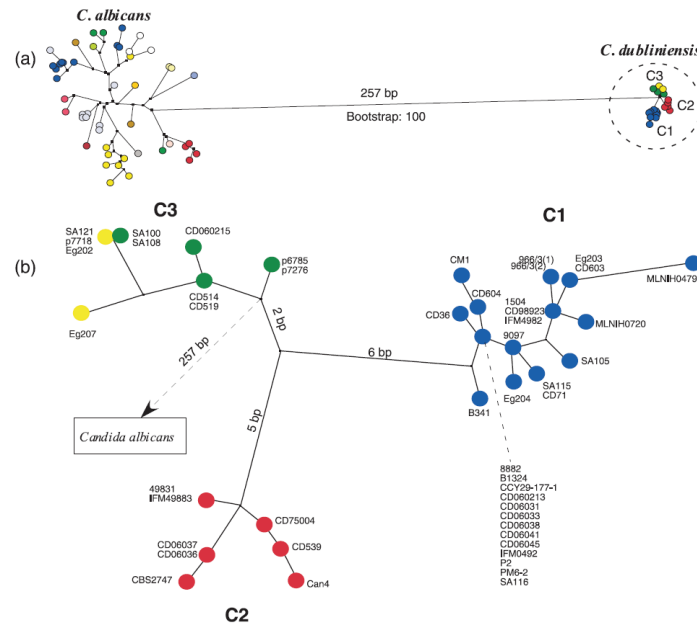


Figura 1.9. Diagrama comparativo de las divergencias entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante MLST. (b) Vista ampliada de los tres subtipos de *C. dubliniensis*: el grupo C1 se corresponde exclusivamente con aislamientos del genotipo 1 (azul), el grupo C2 se compone exclusivamente de cepas del genotipo 2 (rojo), y el grupo C3 formado por aislamientos del genotipo 3 (verde) y del genotipo 4 (amarillo)⁽¹⁹²⁾.

1.2.7. Sensibilidad de *C. dubliniensis* a los antifúngicos

Una amplia variedad de estudios han revelado que la mayoría de los aislamientos de *C. dubliniensis* son sensibles tanto a los antifúngicos comúnmente utilizados en terapéutica como a los nuevos agentes antifúngicos^(154,206,223,246).

1.2.7.1. Bases de la resistencia a fluconazol

La mayoría de los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* son sensibles a los azoles comunes, como fluconazol, ketoconazol, itraconazol y voriconazol^(57,104,175,206,246,284), sin embargo se han descrito casos de resistencia a fluconazol en diferentes hospitales y en pacientes tratados con este fármaco, en particular en pacientes infectados por el VIH^(189,206,239,277). Al igual que *C. albicans*, *C. dubliniensis* puede hacerse resistente a fluconazol durante el tratamiento con antifúngicos, o mediante un proceso de inducción de resistencia *in vitro*^(154,189,202,205,206,239,251,277).

Los mecanismos moleculares de resistencia a los azoles en *C. dubliniensis* son similares a los de *C. albicans*^(202,205,206,239,277). Se han descrito varios genes de transportadores multifármacos en

C. dubliniensis denominados *CdCDR1*, *CdCDR2* y *CdMDR1*, que presentan homología con los de *C. albicans* *CaCDR1*, *CaCDR2* y *CaMDR1* y que están implicados en el desarrollo de resistencia a azoles. Se ha comprobado que los mecanismos de resistencia en las cepas resistentes a fluconazol de *C. dubliniensis* y en las cepas inducidas *in vitro* son debidos, en ambos casos, a una sobreexpresión del gen *CdMDR1* ^(202,284,355). Del mismo modo, Perea y cols. ⁽²³⁹⁾ describieron un aumento de la expresión del gen *CdMDR1* en aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* procedentes de dos pacientes con sida.

A diferencia del transportador *MDR1* que es específico para el fluconazol, el transportador *CDR1* puede transportar varios fármacos azólicos, como ketoconazol e itraconazol. En aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* resistentes a fluconazol generados *in vitro*, también se observó una sobreexpresión del gen *CdCDR1* ⁽²⁰⁵⁾. Se ha comprobado que la sobreexpresión de estos genes (*CdCDR1*, *CdCDR2* y *CdMDR1*) depende, en parte, del tipo de genotipo de *C. dubliniensis*. En efecto, Pinjon y cols. ⁽²⁵¹⁾ ensayaron la sensibilidad a los azoles en aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* de genotipo 3 y pusieron de manifiesto que la reducción de la sensibilidad a los azoles parece estar asociada únicamente con el aumento del nivel de expresión de los genes *CdCDR1* y *CdCDR2*. Estos resultados contrastan con los mecanismos de resistencia a los azoles descritos hasta la fecha para el genotipo 1 de *C. dubliniensis*, y muestran la complejidad y la diversidad de mecanismos por los que los aislamientos de *C. dubliniensis* pueden desarrollar resistencia a los azoles.

Mutaciones puntuales en el gen *ERG11* que codifica para la enzima 14 α lanosterol-desmetilasa y es la diana de los azoles, han demostrado que este gen es importante en el desarrollo de la resistencia a fluconazol en *C. albicans*. Del mismo modo, en *C. dubliniensis* también se han descrito mutaciones del gen *CdERG11* en aislamientos de *C. dubliniensis* resistentes a fluconazol ⁽²³⁹⁾.

1.2.7.2. Bases de la resistencia a 5-fluorocitosina

La 5-fluorocitosina (5-FC) es un análogo fluorado de la base pirimidínica citosina que impide la síntesis del ADN del hongo (Figura 1.10). Su utilización ha sido restringida por su reducido espectro de actividad y por la rápida aparición de cepas resistentes dentro de las especies sensibles cuando se usa como agente antifúngico único ⁽¹⁷³⁾.

En *C. dubliniensis* la proteína citosina deaminasa (Fca1p) codificada por el gen de *CdFCA1*, juega un papel importante en la resistencia a 5-FC, debido a que la sustitución en un aminoácido, Ser29Leu, de la secuencia de la proteína Fca1 es responsable de la resistencia a 5-

FC en aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* ⁽¹⁹¹⁾. En *C. albicans*, la resistencia a 5-FC está mediada por una reducción en la actividad de cualquiera de las proteínas Fca1p, codificada por *FCA1*, o la enzima uracilo fosforribosil transferasa codificada por *FURI* ^(122,259,349).

Hasta el momento todos los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* que presentan resistencia a 5-FC (CMI \geq 128 $\mu\text{g/ml}$) pertenecen a los genotipos 3 y 4, que a su vez pertenecen al grupo III de la sonda de ADN Cd25 y se corresponden con el grupo C3 de MLST; además cabe señalar que todos los aislamientos clínicos resistentes a 5-FC procedían de Egipto o Arabia Saudí ^(3,4,192).

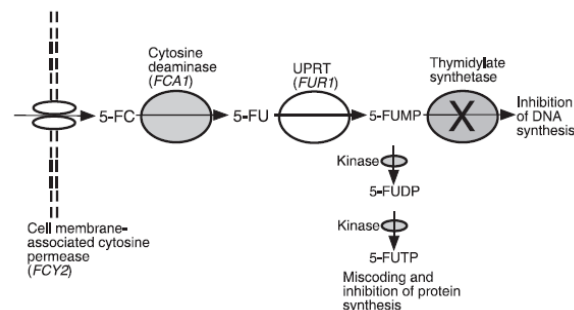


Figura 1.10. Vía metabólica y modo de acción de FC en las levaduras del género *Candida*. A la entrada en la célula 5-FC es desaminada a 5FU (fluorouracilo) por Fca1p, codificada por *FCA1*. 5FU es fosforilado por UPGT (uracilo fosforribosil transferasa), codificada por *FURI* (Fluorouridina insensible 1), dando 5FUMP (monofosfato de fluorouridina). 5FUMP inhibe la timidilato sintetasa que conduce al agotamiento de la timidina en la célula y que en última instancia interrumpe la síntesis de ADN ⁽¹⁹¹⁾.

1.3. La pared celular de *Candida*

Las especies del género *Candida* presentan una estructura celular eucariótica, con una membrana citoplasmática que limita el citosol, con los diferentes orgánulos, el núcleo y rodeando a la membrana por el exterior una pared celular, compuesta fundamentalmente de polisacáridos y proteínas.

La pared celular envuelve a la célula fúngica, siendo más gruesa y resistente que la matriz extracelular de las células de mamífero y en consecuencia le confiere rigidez, protege frente a daños físicos y osmóticos y actúa como una barrera permeable al paso de sustancias. La pared es la estructura encargada de determinar la forma de la célula y también es responsable de los fenómenos de agregación y floculación. Su arquitectura y composición pueden variar en función de la morfología de la célula y las condiciones ambientales, por lo que la pared desempeña una

función importante en la transición dimórfica. Además, la pared interviene en las relaciones con el hospedador por ser la primera estructura que entra en contacto con el mismo en el momento de la invasión.

1.3.1. Estructura y composición

La pared celular de *Candida* está formada fundamentalmente por carbohidratos en un 80-90%, mientras que el porcentaje de proteínas es del 6-25% y el de lípidos del 1-7%.⁽¹⁸⁸⁾ Mediante microscopía electrónica, se ha observado la existencia de varias capas en la pared celular de *C. albicans*. Su aspecto estructural es variable y depende de la morfología, de las condiciones de crecimiento e, incluso, de la cepa examinada y de las condiciones de preparación de la muestra⁽¹⁸⁸⁾.

La estructura básica de la pared está organizada en dos capas. La capa interna está formada principalmente por moléculas de β -1,3 glucano que forman un esqueleto reforzado por puentes de hidrógeno, que se ramifica con cadenas de quitina y β -1,6 glucano. La capa externa, está formada por manoproteínas unidas covalentemente a β -1,3 y β -1,6 glucano^(72,147) (Figura 1.11).

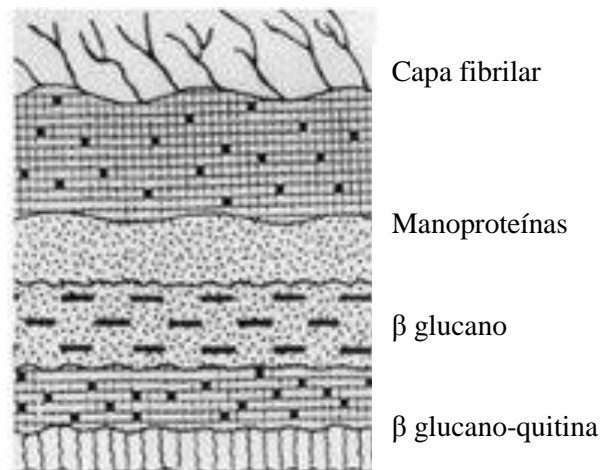


Figura 1.11. Diagrama de la pared celular de *Candida albicans*⁽⁴¹⁾.

Los elementos constituyentes de la pared celular son:

1. componentes estructurales:

- Mananos
- β -1,3 y β -1,6 glucanos (polímeros de D-glucosa)
- Quitina (polímero de N-acetilglucosamina)

2. componentes de la matriz:

- β -glucanos
- Glicoproteínas o manoproteínas (polímeros de manosa enlazados a proteínas)

3. Lípidos y proteínas

1.3.1.1. Mananos

Los mananos son polímeros ramificados de D-manopiranososa unidos por enlaces α -glicosídicos y constituyen el 20-30% del peso seco de la pared celular. Además, varios residuos de manosa ensamblados como oligosacáridos se suelen encontrar asociados con proteínas mediante enlaces covalentes formando las manoproteínas. Estas uniones se realizan mediante enlaces O-glicosídicos a residuos de serina o treonina, o bien mediante enlaces N-glicosídicos a residuos de asparragina.

1.3.1.2. Glucanos

Los glucanos son polímeros de glucosa y constituyen el 50-60% del peso seco de la pared celular de *Candida*. Dependiendo del tipo de unión de los ciclos de azúcar pueden dividirse en α y β glucanos.

Habitualmente se pueden distinguir tres tipos de estructuras en el glucano componente de la pared: el primero lo constituyen largas cadenas de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -1,3, el segundo se diferencia del anterior en que la configuración del enlace es β -1,6 y el tercero está formado por cadenas de β -1,3 glucano unidas por enlaces β -1,4 a polímeros de quitina. Además, los glucanos se pueden encontrar asociados a proteínas y manoproteínas mediante enlaces N-glicosídicos.

1.3.1.3. Quitina

La quitina se sintetiza a partir de N-acetil glucosamina por la enzima quitina sintasa, que deposita los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según el estadio morfológico del hongo. La quitina representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras⁽²⁶³⁾. El contenido de quitina en la pared de las hifas de *C. albicans* es tres veces mayor que el de las levaduras⁽⁵⁴⁾. Dada su importancia en la estructura de la pared, la reacción de síntesis de la quitina es una diana apropiada para la acción de los antifúngicos y ya se han descrito algunos agentes, como las nikomicinas y las polioxinas, que interfieren en el proceso⁽²⁶³⁾.

1.3.1.4. Lípidos

Los fosfolípidos, esteroides, triglicéridos y ácidos grasos libres son los componentes lipídicos mayoritarios de la pared y la proporción entre ellos varía con la morfología y la edad de las células^(54,103). Los lípidos de la pared también han sido relacionados con la adhesión a células animales y con la patogenicidad de *Candida*⁽¹⁰³⁾.

1.3.1.5. Proteínas y glicoproteínas

Las proteínas representan el 30-50% del peso seco de la pared fúngica en los hongos levaduriformes. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces O-glicosídicos y N-glicosídicos, formando glicoproteínas⁽²⁶³⁾.

Las proteínas de la pared tienen diversas funciones: participan en el mantenimiento de la forma celular, intervienen en los procesos de adhesión, protegen a la célula de sustancias extrañas, participan en la absorción de moléculas, transmiten señales al citoplasma y sintetizan y remodelan los componentes de la pared⁽³⁰⁾.

Los componentes de la pared celular establecen diferentes tipos de interacciones covalentes (puentes disulfuro o enlaces mediante glucosilfosfatidilinositol -GPI-) o no covalentes (puentes de hidrógeno o enlaces hidrofóbicos), para dar lugar a una arquitectura compleja^(73,78,99,271). Diversos autores han propuesto un modelo de arquitectura de la pared celular en el que se analizan las interconexiones entre los diferentes componentes que la forman; este modelo propone que las moléculas de β -1,3-glucano ramificadas forman una matriz tridimensional que

se mantiene unida gracias a puentes de hidrógeno y a la que se unen otras moléculas. Las proteínas de la pared (CWP) están unidas a las múltiples terminaciones de la matriz de β -1,3-glucano mediante enlaces dependientes de GPI y enlaces covalentes Pir. En el caso de las Pir-CWP, denominadas de este modo debido a las repeticiones internas que poseen, parece que se da una unión directa al β -1,3-glucano mientras que las GPI-CWP se unen mediante cadenas de β -1,6-glucano presentes también en la pared, aunque en menor medida (Figura 1.12).

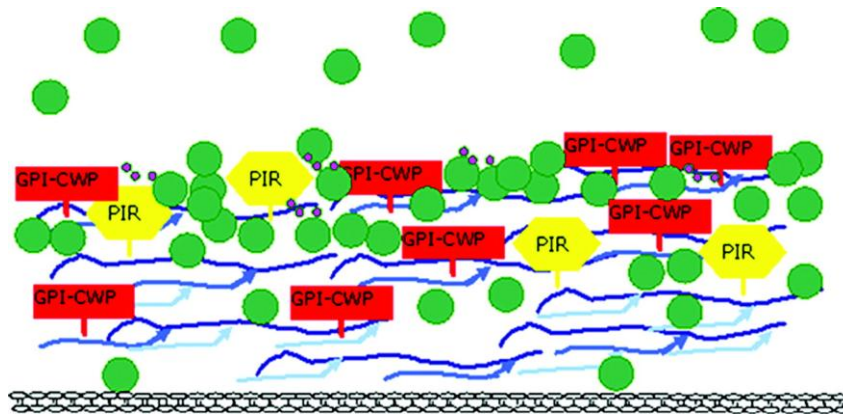


Figura 1.12. Esquema representativo de la pared celular. Las GPI-CWP están marcadas con rectángulos rojos; las proteínas Pir, están marcados con hexágonos amarillos. β -1,3-glucano marcado con líneas azul oscuras y β -1,6-glucano con azul medio. Quitina marcada con líneas azul claras, y las proteínas sueltas de la pared celular marcadas con círculos verdes ⁽⁵²⁾.

1.3.2. Características antigénicas de la pared celular de *Candida*

La pared celular contiene un gran número de elementos antigénicos siendo las proteínas y las glicoproteínas, tanto en su porción glucídica como en la proteica, los componentes más importantes que estimulan la respuesta inmunológica del hospedador. La expresión y distribución de los antígenos en la pared depende de diversos factores, como la fase morfológica, las condiciones de crecimiento, el perfil hidrofóbico de la superficie e incluso la cepa utilizada ^(53,169). Afortunadamente los antígenos de la pared celular de *Candida* no sólo juegan un papel clave en la capacidad antigénica, modulación de la respuesta inmunológica, patogénesis o morfogénesis sino que son potenciales dianas tanto en la terapia antifúngica como en el diagnóstico ^(52,53,256).

Las enzimas glucolíticas son un grupo de antígenos inmunodominantes que actúan como inductores de la respuesta inmunológica del hospedador y como alérgenos durante la candidiasis ^(106,132,133,304,323,334). La enolasa (Eno1), se ubica en la superficie de las células de *C. albicans* ⁽⁸⁴⁾ y además está asociada al glucano en las capas internas de la pared ⁽¹³⁾. Esta enzima participa, cuando está en el citoplasma, tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis. Otra enzima

glucolítica que se localiza tanto en la pared como en la superficie ^(9,52), y que está implicada en la virulencia de *Candida* es la fosfoglicerato quinasa (Pfk1). Esta enzima cataliza la conversión de 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato con la producción de ATP ⁽⁵³⁾.

Las dos enzimas glucolíticas mencionadas junto con la hidrolasa β -1,3-glucanasa 2 (Bgl2) y la metionina sintasa (Met6) sirven además como antígenos útiles para el pronóstico de las candidiasis invasivas ⁽²⁵⁵⁾. La hidrolasa Bgl2 se ubica en la pared celular de *C. albicans* y está implicada en el procesamiento y ensamblaje del β -1,3-glucano ^(108,155,210) y la sintasa Met6 es una proteína esencial que se localiza en el citoplasma y en la superficie de la pared y está implicada en la virulencia, en la capacidad antigénica y en la morfogénesis. Esta última enzima transfiere un grupo metilo de 5-metil-tetrahidrofolato a la homocisteína, formando metionina (Figura 1.13) ⁽³²⁵⁾.

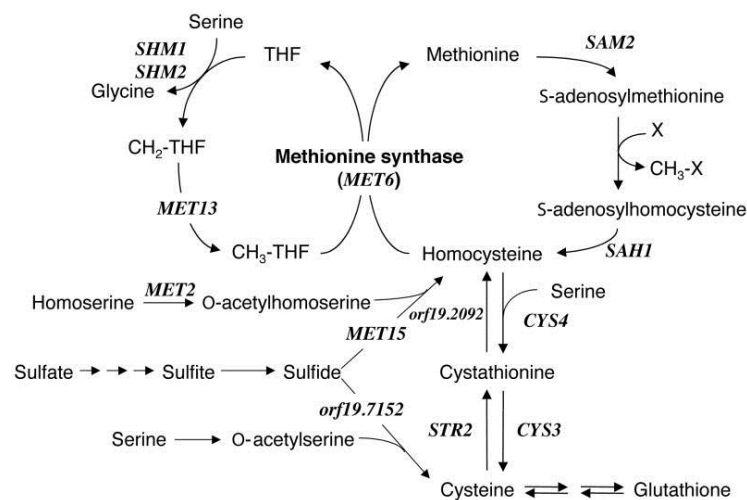


Figura 1.13. Metabolismo de la metionina en *C. albicans* ⁽³²⁵⁾.

Hay dos clases de metionina sintasa que no comparten ninguna homología de secuencia: la enzima metionina sintasa dependiente de cobalamina, que está presente en los seres humanos y otros organismos que son capaces de sintetizar cobalamina y la metionina sintasa independiente de cobalamina, que se encuentra en los hongos, las plantas superiores y algunos procariontes. En *C. albicans*, Met6 es una enzima esencial para su crecimiento y es necesario que se exprese aunque sea en un nivel mínimo para limitar la toxicidad de la homocisteína ⁽³²⁵⁾.

1.4. Candidiasis

En circunstancias normales se mantiene un equilibrio entre el huésped y las especies del género *Candida* debido a la microbiota bacteriana normal, la integridad de la piel y mucosas y el correcto funcionamiento del sistema inmunitario. Factores tanto endógenos como exógenos pueden provocar una alteración de este equilibrio, permitiendo un sobrecrecimiento del hongo y su transformación en un patógeno oportunista ⁽²²⁵⁾ favoreciendo la candidiasis en humanos. La candidiasis es una infección común producida por diferentes especies del género *Candida*. Aunque *C. albicans* ha sido la especie más significativa, en la últimas décadas otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* han ganado importancia como agentes causantes de infecciones ⁽³³⁰⁾. Otra especie emergente como patógeno oportunista es *C. dubliniensis*, que aunque se asocia principalmente con la candidiasis oral en pacientes con VIH, está empezando a ser causa de enfermedades superficiales y sistémicas en las personas sin VIH con una tasa de prevalencia estimada por debajo del 5% ^(6,111,141,326).

1.4.1. Candidiasis superficiales

La candidiasis de la mucosa oral es una de las presentaciones clínicas de mayor prevalencia entre las infecciones causadas por *Candida*, sobre todo en pacientes infectados por el VIH o con otras inmunodeficiencias ⁽¹⁾. Una serie de factores predisponentes como el uso de prótesis dentales, xerostomía, terapias con múltiples antibióticos e inmunosupresores, hace que ciertas especies del género *Candida* puedan comportarse como patógenos capaces de causar infecciones orales en pacientes infectados por el VIH, siendo las principales manifestaciones: la candidiasis eritematosa ^(14,286,287,303), la candidiasis pseudomembranosa ^(303,336) y la queilitis angular ^(14,51,67,249,287,288,336). La manifestación clínica de candidiasis oral más frecuente causada por *C. dubliniensis* es la candidiasis eritematosa ^(67,328), la cual se presenta clínicamente como un área rojiza de bordes mal definidos en la mucosa oral sin la presencia de placas blanquecinas. En general es una lesión asintomática o que produce un ligero picor, por lo que en muchas ocasiones es un hallazgo casual ⁽¹⁾.

Las candidiasis cutáneas engloban el intertrigo de grandes pliegues (axilas, ingle, surco interglúteo, pliegues submamaros, y pliegues suprapúbicos en personas obesas) y la erosión interdigital en dedos de los pies y manos ⁽²⁷⁶⁾. Las candidiasis cutáneo mucosas incluyen a las candidiasis orofaríngeas (muguet, queilitis angular y la lengua negra) y a las candidiasis genitourinarias y anales (vulvovaginitis, balanopostitis y manifestaciones perianales).

1.4.2. Candidiasis sistémica

La candidiasis sistémica es la micosis invasiva más frecuentemente observada en nuestro medio. La candidemia puede ser el resultado de la contaminación de sondas o catéteres, así como de traumatismos gastrointestinales o de la diseminación de una candidiasis ya establecida ⁽²⁷⁶⁾.

Las manifestaciones clínicas de esta infección son similares a las de cualquier sepsis bacteriana, por lo que debe sospecharse en todo paciente de riesgo o inmunodeprimido cuya fiebre no remita a pesar de la terapia antibacteriana. Las infecciones por *Candida* pueden adoptar diversas formas clínicas (sepsis, neumonía, endocarditis, artritis, osteomielitis, osteocondritis, miositis, peritonitis, meningitis, etc.) y localizaciones anatómicas (sistema nervioso central, hígado, bazo, vesícula biliar, globo ocular, etc.).

1.5. Terapia de la candidiasis

Las micosis superficiales se tratan con antifúngicos tópicos. En algunos casos se administran antifúngicos orales o sistémicos en función de la gravedad de la infección. Algunos de los antifúngicos que se emplean para las micosis superficiales son los azoles ketoconazol, fluconazol e itraconazol, la nistatina, la griseofulvina o la alilamina terbinafina. Este último antifúngico, tiene un efecto fungicida debido a la reducción del contenido en ergosterol de la membrana celular y a la acumulación de escualeno en el espacio citoplasmático causando la muerte celular; por su naturaleza lipofílica, se distribuye principalmente en tejidos de la piel, uñas y tejido adiposo ⁽⁸⁰⁾, por lo que su uso terapéutico se dirige principalmente al tratamiento de dermatomicosis.

En cuanto al tratamiento de las candidiasis sistémicas, éste varía en función de la localización anatómica de la infección, la enfermedad de base del paciente o su factor predisponente, su estado inmunológico, la especie de *Candida* responsable de la infección y la sensibilidad de la cepa a los antifúngicos.

Los polienos son sustancias antibióticas sintetizadas por actinomicetos del género *Streptomyces* y fueron los primeros antifúngicos que se desarrollaron como formulaciones galénicas en la década de 1950 ⁽⁵⁸⁾⁽¹⁷⁶⁾. Actúan uniéndose al ergosterol presente en la membrana celular alterando la permeabilidad de la misma y causando la muerte celular. Se conocen más de 100 compuestos distintos de esta familia, de los cuales los más importantes son la nistatina y la

anfotericina B. La anfotericina B, está considerada como el antifúngico de referencia para las micosis invasoras y, por ello éste es el fármaco con el que se comparan todos los antifúngicos sistémicos. Aunque la mayoría de las especies patógenas del género *Candida* son sensibles a la anfotericina B, el principal problema de este fármaco es su elevada toxicidad renal, por lo que se han desarrollado formulaciones lipídicas que tratan de evitar estos problemas de toxicidad ⁽³⁵³⁾.

Los azoles son antifúngicos fungistáticos que actúan inhibiendo la enzima CYP 450 responsable de la síntesis del ergosterol, produciendo daños en la membrana citoplásmica. Estos compuestos incluyen a los imidazoles, como el ketoconazol y miconazol y a los triazoles, tales como el fluconazol e itraconazol. Posteriormente han aparecido nuevos triazoles como el voriconazol, posaconazol, albaconazol y ravuconazol. El fluconazol es eficaz frente a la mayoría de las especies de *Candida*, aunque se han descrito resistencias por parte de ciertas especies de *Candida*. El voriconazol, es un triazol de segunda generación derivado del fluconazol, con una potencia y un espectro de acción superiores a los del fluconazol ⁽⁴⁴⁾.

La 5-fluorocitosina es de los pocos antifúngicos que no actúa sobre la membrana o pared celular del hongo, sino sobre la síntesis del ADN al inhibir la timidilato sintetasa. Debido a la rápida aparición de resistencias secundarias, este producto no se utiliza en monoterapia.

Las equinocandinas, son lipopéptidos derivados de la fermentación de varios hongos que contienen como centro activo un hexapéptido cíclico con una cadena lipídica que es el responsable de su actividad antifúngica. Actúan inhibiendo la síntesis del glucano componente de la pared celular, lo cual da como resultado la lisis del hongo. Estos compuestos son antifúngicos muy activos frente a las especies de *Candida* y no exhiben acción alguna sobre las células de mamíferos. Dentro de esta familia destacan tres antifúngicos: caspofungina, micafungina y anidulafungina. Todos ellos presentan un amplio margen de seguridad, con baja incidencia de efectos adversos y además tienen una eficacia similar a la anfotericina B ⁽⁸⁾.

2. Justificación y Objetivos

Las especies del género *Candida* son hongos oportunistas que viven en equilibrio con el huésped. A veces, factores tanto endógenos como exógenos alteran este equilibrio y permiten su conversión en especies patógenas, favoreciendo de este modo la infección en humanos. La candidiasis es una infección común producida por diferentes especies del género *Candida*, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* siendo *C. albicans* el patógeno predominante entre estas micosis.

C. dubliniensis, es una especie identificada recientemente cuya patogénesis se asocia principalmente con la candidiasis oral en pacientes con VIH, y está empezando a ser causa de enfermedades superficiales y sistémicas en las personas sin VIH, con una tasa de prevalencia estimada del 5%.

El aumento del número de aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* hace necesaria su correcta identificación para facilitar la instauración de pautas terapéuticas apropiadas. Sin embargo, en muchas ocasiones, la identificación de *Candida dubliniensis* en muestras clínicas resulta dificultosa debido a la presencia más frecuente de *C. albicans*, especie con la que está íntimamente relacionada, compartiendo la mayoría de sus características para la identificación. En el laboratorio de microbiología clínica se dispone de distintas pruebas fenotípicas, genotípicas e inmunológicas para diferenciar estas dos especies en base a pequeñas diferencias en los rasgos característicos de cada una de ellas.

En el trabajo que se presenta, se han estudiado 477 aislamientos clínicos del género *Candida*, entre los que se identificaron 434 cepas de *C. albicans* y 34 de *C. dubliniensis*. Un total de 9 aislamientos quedaron sin identificar debido a que presentaban un perfil indefinido en los medios de aislamiento convencionales. A estas nueve cepas se les denominó aislamientos atípicos.

El objetivo principal de esta tesis ha sido la caracterización e identificación de estos aislamientos atípicos con la intención de averiguar si forman un grupo homogéneo que pudiera constituir una subespecie. Para ello se han realizado ensayos cubriendo cuatro objetivos parciales:

1. Caracterización e identificación de los nueve aislamientos atípicos mediante métodos fenotípicos, genotípicos e inmunológicos.
2. Estudio de las características fenotípicas más relevantes de las tres cepas atípicas que forman blastosporas pequeñas (grupo blp). En concreto, el defecto en la formación de

clamidosporas y la incapacidad para aglutinar las partículas de látex en la prueba comercial Bichro-Dubli Fumouze®.

3. Identificación del antígeno diana de la pared celular de *C. dubliniensis* que es reconocido por el AcM 12F7-F2.
4. Caracterización de la expresión y localización del antígeno específico del AcM 12F7-F2 en los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* del grupo blp en comparación con la cepa de referencia de esta especie y de *C. albicans*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Microorganismos

Las cepas utilizadas en esta tesis se describen en las tablas 3.1, 3.2 y 3.3.

Tabla 3.1. Cepas de referencia del género *Candida*

Especie	Cepa
<i>C. albicans</i>	SC 5314
<i>C. dubliniensis</i>	NCPF 3949 (genotipo 1)
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 8501 (genotipo 1)
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 2747 (genotipo 2)

NCPF: National Collection of Pathogenic Fungi, Bristol, R.U.

SC: Stanford DNA Sequencing and Technology Center, Stanford, EE.UU.

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

Tabla 3.2. Selección de aislamientos de *Candida dubliniensis*

Nº de cepa de la colección UPV	Nº en otras colecciones	Genotipo	Origen anatómico	Origen geográfico
05-199	p6265*	3	Espuito	Israel
05-200	p7718*	4	Herida	Israel
98-277		1	Oral	España
95-677		1	Oral	España
94-234		1	Oral	España
08-015	17p♦	2	Oral	Argentina
08-016	18p♦	2	Oral	Argentina
08-017	22bp♦	2	Oral	Argentina
08-018	25p♦	2	Oral	Argentina
08-019	110p♦	2	Oral	Argentina
08-020	140p♦	2	Oral	Argentina

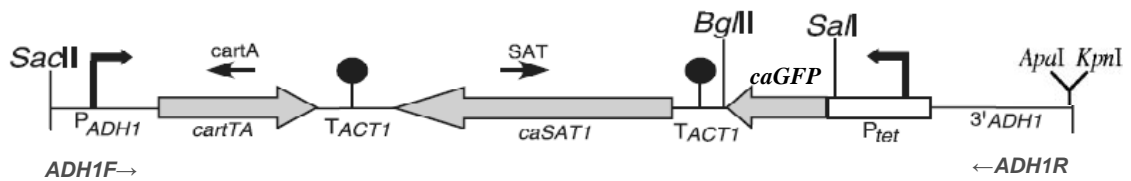
UPV: Universidad del País Vasco-UPV/EHU; *: cepa de la colección del hospital Odontológico de la Universidad de Dublín, Irlanda; ♦: cepa de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Tabla 3.3. Cepas de *Escherichia coli* de la casa comercial Stratagene (EE.UU.)

Cepa	Genotipo
XL10-Gold	Tet ^r $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1 supE44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a
DH5 α	(F ⁻ , <i>endA1, hsdR17</i> [rk ⁻ , mk ⁻], <i>supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1</i> , $\Delta[argF-lac]U169, \lambda^{-}$, $\phi 80dlacZ$ Δ M15

3.2. Plásmido pNIM1

Este vector construido por Park y Morschhauser ⁽²³⁴⁾, contiene el gen *SAT1*, que confiere a *C. albicans* resistencia a la nourseotricina, además de un sistema de expresión génica inducible mediante la adición de tetraciclina (Tet) independiente del medio de crecimiento que se quiera utilizar. El gen que se va a clonar ocupa la posición del gen que codifica para la proteína GFP o proteína verde fluorescente (*caGFP*) que está flanqueado por las enzimas de restricción *Sac*II y *Bgl*II. El vector pNIM1, está diseñado para insertarlo en el locus *ADH1* de *C. albicans* (Figura 3.1).

Figura 3.1. Imagen modificada del plásmido pNIM1 ⁽²³⁴⁾.

3.3. Sueros policlonales y anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos utilizados en este estudio, se describen en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Anticuerpos monoclonales y policlonales

Denominación	Tipo/Clase	Especificidad	Procedencia
17814	Antisuero policlonal de conejo	Frente a blastosporas de <i>C. dubliniensis</i>	Lab. Dr. José Pontón (UPV/EHU)
12F7-F2	Monoclonal IgG	Componente de la pared celular de <i>C. dubliniensis</i>	Lab. Dr. Raymond Robert (Angers, Francia)

Lab.: laboratorio

3.4. Medios y condiciones de cultivo

3.4.1. Medios de cultivo para *Candida*

- Caldo/agar glucosado de Sabouraud (SDA; Difco)

Neopeptona	10 g
Glucosa	40 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para obtener agar SDA se añade agar 15 g/l (Pronadisa, Suiza) previo a la esterilización.

- Medio TC199 (Sigma, EE.UU.)

Glucosa 1000 mg	NaCl 6800 mg
KCl 400 mg	CaCl ₂ ·H ₂ O 265 mg
MgSO ₄ 97,7 mg	Na ₂ HPO ₄ 122 mg
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O 0,72 mg	DL-Ácido glutámico 133,4 mg
DL-Leucina 120 mg	L-Glutamina 100 mg
L-Arginina·HCl 70 mg	L-Lisina·HCl 70 mg

DL-Ácido Aspártico 60 mg	DL-Treonina 60 mg
DL- Alanina 50 mg	DL-Fenilalanina 50 mg
Glicina 50 mg	DL-Serina 40 mg
DL-Valina 50 mg	DL-Isoleucina 40 mg
L-Prolina 40 mg	L-Tirosina 2Na·2H ₂ PO ₄ 57,7 mg
DL-Metionina 30 mg	L-Cisteína·2HCl 26 mg
Cisteína·HCl·H ₂ O 0,11 mg	L-Histidina·HCl·H ₂ O 21,9 mg
DL-Triptófano 20 mg	Trans-4-L-Hidroxi prolina 10 mg
Colina·HCl 0,50 mg	Colesterol 0,20 mg
Ergocalciferol 0,10 mg	Vitamina A 0,10 mg
Mioinositol 0,05 mg	p-Ácido aminobenzóico 0,05 mg
Ácido ascórbico 0,05 mg	Glutación 0,05 mg
Tiamina·HCl 0,01 mg	Riboflavina 0,01 mg
Pantotenato cálcico 0,01 mg	D-Biotina 0,01 mg
Ácido fólico 0,01 mg	Menaftona 0,01 mg
Tocoferol 0,01 mg	Piridoxina·HCl 0,025 mg
Piridoxal·HCl 0,025 mg	Ácido nicotínico 0,025 mg
Nicotinamida 0,025 mg	Adenina (hemisulfato) 10 mg
Adenina (trifosfato) 1 mg	Adenina (monofosfato) 0,34 mg
Guanina·HCl 0,30 mg	Xantina·Na 0,34 mg
Hipoxantina 0,30 mg	Timina 0,30 mg
Uracilo 0,30 mg	Ribosa 0,50 mg
Desoxirribosa 0,50 mg	Acetato sódico 50 mg
Rojo fenol 21,3 mg	Tween 80 20 mg
Agua destilada c.s.p. 1000 ml	

Se esteriliza por filtración a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm.

- Caldo/agar de extracto de levadura peptona dextrosa (YEPD)

Peptona (Pronadisa)	20 g
Extracto levadura (Pronadisa)	10 g
Glucosa (Panreac, España)	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para obtener agar de YEED se añade agar 15 g/l previo a la esterilización.

3.4.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación para la formación de clamidosporas

○ Agar Pal ^(5,231)

Semillas de girasol molidas (<i>Helianthus annuus</i>)	50 g
Creatinina (Sigma)	1 g
Glucosa	1 g
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	1 g
Ajustar a pH 5,5	
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 110 °C durante 20 min. La incubación en este medio se realiza a 30 °C durante 72 h.

○ Agar Staib ⁽³¹⁹⁾

Semillas de negrillo molidas (<i>Guizotia abyssinica</i>)	50 g
Creatinina	1 g
Glucosa	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Ajustar a pH 5,5	
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 110 °C durante 20 min. La incubación se realiza a 30 °C durante 72 h.

- Agar caseína ^(165,209)

-Solución I

Leche desnatada deshidratada (Nestlé, Suiza)	10 g
Agua destilada	90 ml

-Solución II

Agar	3 g
Agua destilada	97 ml

Se esterilizan ambas soluciones por separado en autoclave a 121 °C durante 15 min, una vez finalizada la esterilización se dejan enfriar hasta 45-50 °C y se mezclan. La incubación se realiza a 37 °C durante 24-48 horas.

- Agar YNB suplementado con galactosa y metionina ⁽⁶¹⁾

YNB sin aminoácidos (Difco)	6,7 g
Galactosa (Panreac)	0,25 g
Metionina (Sigma)	25 mg
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza por filtración a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm. La incubación se realiza a 30 °C durante 72 h.

Este medio también se preparó con diferentes cantidades de metionina según la concentración final deseada (5 mg/l, 10 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l y 100 mg/l).

- Agar de harina de maíz ⁽³³²⁾

Harina de maíz	40 g
Tween 80 (Sigma)	10 ml
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. La siembra se realiza según la técnica de Dalmau ⁽¹⁵⁷⁾ haciendo tres cortes paralelos en el agar, separados por 1 cm. Se coloca un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra. Las placas se incuban a 30 °C durante 24-48 h.

- Medio CHROM-Pal ⁽²⁸³⁾

Se prepara medio litro de agar Pal (descrito anteriormente) y se esteriliza en autoclave a 110 °C durante 20 min. Por separado se prepara medio litro de CHROMagar Candida (47,7 g/l) y se hierve tres veces. Cuando ambos medios se enfrían a unos 50-60 °C, se mezcla y distribuye en placas Petri. La incubación de las placas inoculadas se realiza a 30 °C durante 72 h.

3.4.3. Medios de cultivo y reactivos para bacterias

- Caldo/agar de Luria-Bertani (LB)

Triptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
NaCl (Panreac)	5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 7,5 antes de completar el volumen final.	

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para obtener agar LB se añade agar 15 g/l previo a la esterilización.

- Medio SOC

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl (Panreac)	0,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tanto el caldo LB como el agar LB fueron suplementados con ampicilina (100 µg/ml concentración final) cuando se necesitaba seleccionar plásmidos. Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37 °C, habitualmente durante 24 h.

3.5. Obtención de extractos antigénicos de pared con DTT

- Tampón Tris-Manitol

Tris [®] -Base (Sigma)	6,05 g
Manitol (Panreac)	145,75 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

- Solución DTT

DTT (Sigma)	77,1 g
Tampón Tris-Manitol c.s.p.	1000 ml

Se prepara en el momento de usar

- Solución iodoacetamida (IAA)

IAA (Sigma)	92,5 g
Tampón Tris-Manitol c.s.p.	1000 ml

Se prepara en el momento de usar

- Solución de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 40mM

PMSF (Sigma)	6,96 g
Etanol 70%	1000 ml

- **Preparación de las muestras: Obtención de micelio**

Las células procedentes de un cultivo de 24-48 horas a 24 °C en medio agar SDA, fueron lavadas con PBS estéril e inoculadas a una concentración de 5×10^7 blastosporas/ml en medio TC 199. Tras una incubación a 24 °C a 120 rpm durante 18 horas, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con PBS estéril.

Los micelios se obtuvieron a partir de las blastosporas inoculadas en medio TC 199 precalentado a 37 °C y se incubaron a 37 °C a 120 rpm durante 4 horas. Los micelios obtenidos fueron lavados tres veces con PBS estéril.

- **Método**

Se siguió el método descrito por Smail y Jones ⁽³⁰⁹⁾. Los micelios obtenidos, se lavaron tres veces con tampón Tris-Manitol y se resuspendieron en 10 volúmenes del mismo tampón. Se añadió PMSF, un inhibidor de proteasas a una concentración final 1mM y 25 µl de solución de DTT por ml de tampón Tris-Manitol. Tras incubar en baño caliente de 37 °C con agitación oscilante a 80 gpm se adicionaron 50 µl de solución de IAA por cada ml de tampón Tris-Manitol y se incubó a 4 °C durante 18 horas con agitación suave. Una vez finalizada la segunda incubación, se centrifugó varias veces la suspensión a 1700 rpm durante 10 minutos a 4 °C hasta comprobar que el sobrenadante no presentaba turbidez. A continuación, el sobrenadante se dializó frente a agua destilada a 4 °C en sacos de diálisis con un tamaño de poro de 12000-14000 Da (Medicell, R.U.) y tras la diálisis, se determinó la concentración proteica (apartado 3.10.1) antes de ser liofilizado.

3.6. Métodos para la caracterización de aislamientos de *C. dubliniensis*

3.6.1. Métodos fenotípicos

3.6.1.1. Capacidad de crecimiento a 45 °C

A partir de células procedentes de un cultivo de 24-48 horas a 37 °C en agar SDA, se inocularon en estría un par de colonias en agar SDA y se incubaron a 45 °C durante 48 horas, tal como lo describe Pinjon y cols. ⁽²⁵³⁾. Se ha descrito que *C. albicans* tiene la capacidad de crecer tanto a

42 °C como a 45 °C después de 48 horas de incubación; por el contrario, *C. dubliniensis* crece muy poco a 42 °C y no crece a 45 °C ^(65,326,332).

3.6.1.2. Producción de tubo germinal

- YNB-Glucosa

YNB sin aminoácidos	6,7 g
Glucosa	5 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se esteriliza por filtración a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm.

- **Método**

Para la producción de tubo germinal con suero bovino fetal (SBF; Sigma), se inocularon 2×10^6 células/ml, en 0,5 ml del medio YNB-glucosa suplementado con diferentes cantidades de SBF (10%, 50%, 75% o 100%) y se incubó a 37 °C durante tres horas. El desarrollo de los tubos germinales se visualizó en un microscopio óptico (Nikon, Japón), depositando una gota de la suspensión de levaduras en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.

3.6.1.3. Producción de clamidosporas

Las células se sembraron en los medios de producción de clamidosporas descritos en el apartado 3.4.2. La visualización de las clamidosporas se realizó con el microscopio óptico, depositando una colonia en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol (Merck, Alemania), a excepción de las clamidosporas producidas en el medio agar harina de maíz, que se visualizaron con el microscopio óptico directamente en las placas.

3.6.1.4. Crecimiento en medios cromogénicos

Los medios cromogénicos están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies de *Candida*. Se utilizaron los medios cromogénicos CHROMagar Candida (CHROMagar Company, Francia) y ChromID Candida[®] (bioMérieux, Francia). El medio CHROMagar Candida se prepara de acuerdo con las indicaciones del fabricante y tras una

incubación a 37 °C durante 48 horas, las colonias de *C. albicans* son de color verde esmeralda, mientras que las colonias de *C. dubliniensis* son de color verde oscuro. El medio cromogénico ChromID Candida® (bioMérieux, Francia), se incuba en las mismas condiciones que en el caso anterior y las colonias de *C. albicans* crecen de color azul oscuro y las colonias de *C. dubliniensis* crecen de color azul claro.

3.6.1.5. Asimilación de nutrientes: Galería API ID 32C® (bioMérieux)

La identificación de los aislamientos se llevó a cabo con la prueba comercial API ID 32C que valora la utilización de fuentes de carbono de naturaleza glucídica. La galería consta de 32 pocillos, 31 de los cuales contiene en cada uno un carbohidrato deshidratado (D-galactosa, cicloheximida, D-sacarosa, N-acetil-glucosamina, ácido láctico, L-arabinosa, D-celobiosa, D-rafinosa, D-maltosa, D-trehalosa, 2-cetogluconato potásico, metil- α D-glucopiranosido, D-manitol, D-lactosa, inositol, D-sorbitol, D-xilosa, D-ribosa, glicerol, L-rhamnosa, palatinosa, eritritol, D-melibiosa, gluconato sódico, D-melecitosa, gluconato potásico, ácido levunílico, D-glucosa, L-sorbosa, glucosamina y esculina /citrato férrico) (Figura 3.2).

El procedimiento de la inoculación en las galerías se realizó preparando una suspensión, a partir de un cultivo de 24 h de la levadura, en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 McFarland.

Se añadieron 250 μ l de esta suspensión a una ampolla de medio API C®. Tras homogenizar esta nueva suspensión se dispensó 135 μ l en cada cúpula. La incubación se realizó a 30 °C durante 48 horas y para la lectura automática de las galerías se utilizó el equipo ATB mini API (bioMérieux).



Figura 3.2. Galería ID 32C (bioMérieux).

3.6.2. Métodos inmunológicos

3.6.2.1. Test de aglutinación de partículas de látex (Bichro-Dubli® Fumouze)

Es un método para la identificación rápida de aislamientos de *C. dubliniensis*. La emulsión de colonias de *C. dubliniensis* en 20 µl del reactivo Bichro-Dubli Fumouze revela una aglutinación de color azul entre las blastosporas que portan el antígeno y las partículas de látex sensibilizadas con el AcM 12F7-F2 (Figura 3.3).

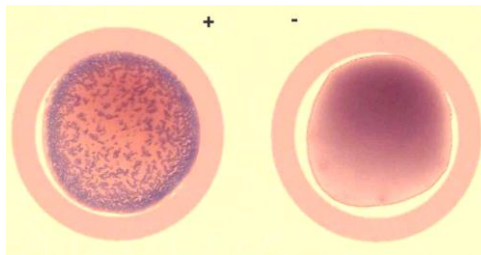


Figura 3.3. Test Bichro-Dubli Fumouze: positivo para *C. dubliniensis* (izquierda) y negativo para *C. albicans* (derecha) ⁽²⁸¹⁾.

3.6.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

- Tampón Fosfato Salino (PBS)

NaH ₂ PO ₄ (Panreac)	0,38 g
Na ₂ HPO ₄ (Panreac)	1,02 g
NaCl	0,107 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 7,2 antes de completar el volumen final	

- PBS- formaldehído 4%

Formaldehído 40%	10 ml
PBS c.s.p.	100 ml

- PBS-Tritón X-100 0,1%

Triton X-100	0,1 ml
PBS c.s.p.	100 ml

- PBS-Azul de Evans-Tween 20 (PBS-TA)

Tween 20 (Sigma)	0,5 ml
Azul de Evans (Merck)	0,5 g
PBS c.s.p.	1000 ml

- Tampón Carbonato-bicarbonato 0,5M

Na ₂ CO ₃ (Sigma)	53 g
NaHCO ₃ (Sigma)	42 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar a pH 9,0 antes de completar el volumen final.

- Glicerina tamponada

Glicerina (Sigma)	90 ml
Tampón Carbonato-bicarbonato 0,5M	10 ml

3.6.2.2.1. IFI con microscopía de fluorescencia

- **Preparación de las muestras**

En cada pocillo de los portaobjetos se depositaron 10 µl de una suspensión de células a una concentración de 10⁶ células/ml en PBS, y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para fijar las células, los portaobjetos se sumergieron en acetona durante 5 segundos y posteriormente se secaron a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron con PBS durante 5 minutos con agitación a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo de lavado, los portaobjetos se dejaron secar.

- **Preparación del suero policlonal 17814 frente a *C. dubliniensis***

El antisuero policlonal 17814 (Tabla 3.4) de conejo contra *C. dubliniensis* desarrollado en nuestro laboratorio se adsorbió a volúmenes iguales con una suspensión blastosporas de *C. albicans* (10^{10} blastosporas/ml) inviables por tratamiento con PBS-formaldehído al 4%, con el objeto de eliminar posibles anticuerpos presentes en el antisuero policlonal 17814 comunes con la superficie de *C. albicans* y dejar únicamente los anticuerpos específicos contra antígenos de *C. dubliniensis*. La adsorción se realizó durante dos horas a temperatura ambiente, en agitación suave ⁽²²⁾. Transcurrido el tiempo de adsorción, los viales se centrifugaron a 2600 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante con cuidado de no agitar las células.

- **Método**

La IFI se realizó siguiendo la técnica descrita por Smail y Jones ⁽³⁰⁹⁾. Se preparó una dilución final 1:5 del antisuero policlonal 17814 previamente adsorbido y 1:50 en el caso del AcM 12F7-F2 (1,49 mg/ml) (Tabla 3.4.) y se depositaron 10 μ l en cada uno de los pocillos conteniendo las células fijadas. Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos. Tras la incubación fueron lavados tres veces en agitación con PBS durante 5 minutos y se dejaron secar al aire.

En la segunda incubación, se preparó una dilución 1:250 del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma) en PBS-TA en el caso del suero policlonal y para el AcM 12F7-F2 se preparó una dilución 1:250 del anti-IgG de ratón marcado con FITC (Sigma). Se añadió 10 μ l en cada uno de los pocillos correspondientes. Se repitieron los procesos de incubación, lavado y secado al aire.

- **Visualización**

Se depositaron unas gotas de glicerina tamponada en los portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i), con filtros adecuados para el colorante FITC.

3.6.2.2. IFI con microscopía de láser confocal

- **Preparación de las muestras**

En cada pocillo de los portaobjetos se depositaron 10 µl de una suspensión de células a una concentración de 10^6 células/ml en PBS-formaldehído 4% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 0,1% durante 10 minutos y posteriormente, se lavaron con PBS 3 veces en agitación durante 5 minutos y tras los lavados, los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente.

- **Método y visualización**

El proceso de IFI, se realizó con el AcM 12F7-F2 de *C. dubliniensis*, según lo descrito en el apartado anterior y para la observación de las muestras se empleó el microscopio de láser confocal Olympus Fluoview FV500 del Servicio de Microscopía (SGIKer) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

3.6.2.3. IFI en blastosporas tratadas con DTT

- **Preparación de las muestras**

Las células procedentes de un cultivo en caldo SDA a 37 °C en agitación (120 rpm) durante 24 h, se lavaron con PBS estéril. Tras finalizar los lavados, las paredes celulares de las blastosporas fueron tratadas en presencia de DTT como se describe por Smail y Jones ⁽³⁰⁹⁾ a 37 °C durante 3 h a 120 rpm y se fueron recogiendo muestras a distintos tiempos: tiempo 0, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h y 3 h. Cada muestra se lavó tres veces con PBS y se ajustó a una concentración de 5×10^8 células/ml.

- **Método**

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de vinilo de 96 pocillos de fondo en V añadiendo a cada pocillo 100 µl de la suspensión 5×10^8 células/ml. Se centrifugaron las placas a 2000 rpm durante 5 minutos a 20 °C para eliminar el sobrenadante.

A continuación, se preparó una dilución 1:300 del AcM 12F7-F2 (1,49 mg/ml) en PBS y se añadieron 100 µl en cada pocillo. La incubación se realizó a 37 °C durante una hora y tras finalizar el tiempo de la incubación, las placas se centrifugaron se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron con 200 µl/pocillo de PBS tres veces. Posteriormente se realizó la segunda incubación añadiendo 100 µl del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con FITC diluido 1:150 en PBS y se incubó a 37 °C durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró la mezcla de incubación y se repitió el proceso de lavado.

- **Fluorescencia relativa de una suspensión celular**

Para la lectura de la fluorescencia se utilizaron placas de vinilo de 96 pocillos de fondo plano. La intensidad de la fluorescencia emitida por las células de la suspensión celular se midió con el fluorómetro Fluoroskan a 485 nm (Thermo Scientific, EE.UU.) y se midió también la absorbancia de la suspensión celular a 630 nm. Los resultados se expresaron como fluorescencia relativa calculada tras dividir la fluorescencia emitida entre el valor de la absorbancia de la suspensión celular de cada pocillo.

3.6.3. Métodos moleculares

3.6.3.1. Extracción del ADN

- Tris-HCl 1M pH 8

Tris-Base	121,1 g
Agua MilliQ	800 ml
Ajustar a pH 8 con HCl	
Agua MilliQ c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

- EDTA 0,5M pH 8

EDTA (Sigma)	208 g
Agua MilliQ	800 ml
Ajustar a pH 8 con HCl	
Agua MilliQ c.s.p.	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

- Tampón de extracción

Tritón X-100	2 g
SDS (Panreac)	1 g
NaCl	0,58 g
EDTA 0,5M pH 8	0,2 ml
Tris-HCl 1M pH 8	1 ml
Ajustar a pH 8	
Agua MilliQ c.s.p.	100 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

- Tampón TE

Tris-HCl 1 M pH 8	10 ml
EDTA 0,5M pH 8	2 ml
Agua MilliQ c.s.p.	100 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

- Solución de acetato de sodio 3M

Acetato de sodio (Panreac)	24,6 g
Agua MilliQ c.s.p.	100 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

- **Método**

Las células procedentes de un cultivo en 5 ml de caldo SDA a 37 °C durante 24 horas a 120 rpm, se recogieron en un vial y fueron lavadas dos veces con agua MilliQ estéril. Las células se resuspendieron en 200 µl del tampón de extracción, se añadieron 0,3 g de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (Sigma) y se agitaron vigorosamente con un agitador cinco veces durante 1 minuto, con intervalos idénticos de reposo en hielo para romper la pared de las levaduras. A la suspensión se añadieron 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma) y se homogeneizó vigorosamente con un agitador durante medio minuto. A continuación, los viales se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos y se observaron tres fases, la capa superior se transfirió a un nuevo vial al que se le añadió 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. La mezcla se homogeneizó manualmente y se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 3 minutos. Se recogió nuevamente la fase superior y se adicionaron 20 µl de acetato de sodio 3 M y 400 µl de etanol a -20 °C y los viales se invirtieron varias veces hasta que se visualizó la precipitación del ADN. Posteriormente, los viales se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 rpm y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm. Se decantó nuevamente el sobrenadante y la pastilla de ADN se resuspendió en 50µl de tampón TE.

3.6.3.2. Medida de la concentración de ADN

Para cuantificar la concentración de ADN se midió la absorbancia a 260/280 nm y el grado de pureza midiendo la absorbancia a 260/230 nm (un cociente entre 1,8 y 2 indica un alto grado de pureza) en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3.6.3.3. Técnica de PCR para diferenciar entre especies de *Candida*

- Tampón TBE 10 X

Tris-Base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

3.6.3.3.1. Identificación en base a las diferencias en la región ITS y el gen de la topoisomerasa II

Para identificar *C. albicans* y *C. dubliniensis* simultáneamente se empleó la técnica de la PCR múltiple. Los cebadores CALB1 F y CALB2 R ⁽¹⁷⁴⁾ (Tabla 3.5), amplifican un fragmento de la región ITS1 e ITS2 del gen ARNr de *C. albicans* y los cebadores CDBF28 F y CDBR110 R ⁽¹⁴⁵⁾ (Tabla 3.5), amplifican un fragmento del gen de la topoisomerasa II de *C. dubliniensis*.

Tabla 3.5. Cebadores utilizados en la PCR.

Denominación	Secuencia 5'→3'	Gen	Tamaño del producto PCR
CALB1 F	TTTATCAACTTGTACACCAGA	ITS1 e ITS2 del ARNr	273 pb ⁽¹⁷⁴⁾
CALB2 R	ATCCCGCCTTACCACTACCG		
CDBF28 F	AAATGGGTTTGGTGCCAAATTA	Topoisomerasa II	809 pb ⁽¹⁴⁵⁾
CDBR110 R	GTTGGCATTGGCAATAGCTCTA		
CRR-f	GTTTTTGCAACTTCTCTTTGTA	<i>HWPI</i>	700 pb; 941 pb; 569 pb ⁽²⁷³⁾
CRR-r	ACAGTTGTATCATGTTTCAGT		

Se preparó la mezcla de PCR para un volumen final de 20 µl (Tabla 3.6) y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied-Biosystems.

Tabla 3.6. Mezcla de reacción para la PCR múltiple

Reactivos	Volumen
Biomix (mezcla de reactivos con <i>Taq</i> DNA polimerasa, dNTPs y MgCl ₂ ; Bioline, R.U.) 2X	10 µl
Cebador directo CALB1 F 100µM	0,2 µl
Cebador inverso CALB2 R 100µM	0,2 µl
Cebador directo CDBF28 F 100µM	0,2 µl
Cebador inverso CDBR110 R 100µM	0,2 µl
ADN 100ng/µl	1 µl
Agua MilliQ	8,2 µl

Las condiciones para la PCR múltiple fueron:

Desnaturalización inicial	96 °C, 2 minutos	
Desnaturalización	96 °C ,30 segundos	} 30 ciclos
Hibridación	57 °C, 30 segundos	
Extensión	74 °C, 60 segundos	
Extension final	72 °C, 13 minutos	

3.6.3.3.2. Identificación en base a las diferencias en el gen *HWPI*

Romeo y cols. diseñaron un par de cebadores, CRR-f y CRR-r (Tabla 3.5), que amplifican el gen *HWPI* ⁽²⁷³⁾. Permite identificar 3 especies de *Candida* según el tamaño de los amplicones del gen *HWPI*: 700 pb para *C. africana*, 941 pb para *C. albicans* y 569 pb para *C. dubliniensis*.

Se preparó la mezcla de la PCR para un volumen final de 20 µl (Tabla 3.7) y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700.

Tabla 3.7. Mezcla de reacción para la PCR

Reactivos	Volumen
Biomix 2X	10 µl
Cebador directo CRR-f 100µM	0,2 µl
Cebador inverso CRR-r 100µM	0,2 µl
ADN 100ng/µl	1 µl
Agua MilliQ	8,6 µl

Las condiciones para la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	95 °C, 5 minutos	
Desnaturalización	94 °C ,45 segundos	} 30 ciclos
Hibridación	50 °C, 60 segundos	
Extensión	72 °C, 90 segundos	
Extension final	72 °C, 10 minutos	

3.6.3.4. Técnica de PCR para identificar los genotipos de *C. dubliniensis*

Gee y cols. ⁽¹⁰²⁾ describieron 4 pares de cebadores (G1F/G1R, G2F/G2R, G3F/G3R y G4F/G4R; Tabla 3.8), que amplifican las regiones ITS1 e ITS2 que flanquean la secuencia del gen que codifica para la subunidad 5,8S del ADNr. Mediante estos cebadores, ha sido posible identificar cuatro genotipos distintos para *C. dubliniensis*.

Tabla 3.8. Cebadores para el genotipo de *C. dubliniensis*

Denominación	Secuencia 5'→3'	Genotipo	Tamaño producto PCR
G1F	TTGGCGGTGGGCCCC	1	330 pb
G1R	AGCATCTCCGCCTTATA		
G2F	CGGTGGGCCTCTACC	2	330 pb
G2R	CATCTCCGCCTTACC		
G3F	TTGGTGGTGGGCTTCTG	3	330 pb
G3R	GCAATCTCCGCCTTACC		
G4F	GGCCTCTGCCTGCCGCCAGAGGAT	4	330 pb
G4R	AGCAATCTCCGCCTTACT		

La mezcla de la PCR se preparó como en la Tabla 3.7, sustituyendo los cebadores por cada una de las parejas aquí indicadas y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones para la PCR fueron:

		Cebadores	
		G1F/G1R, G2F/G2R, G3F/G3R	G4F/4R
	Desnaturalización inicial	95 °C 3 min	95 °C 3 min
30 ciclos	Desnaturalización	95 °C 60 seg	95 °C 60 seg
	Hibridación	50 °C 60 seg	55 °C 60 seg
	Extensión	72 °C 20 seg	72 °C 20 seg
	Extensión final	72 °C 10 min	72 °C 10 min

3.6.3.5. Técnica de PCR para determinar el tipo de *MTL* de *C. dubliniensis*

El tipo de apareamiento en los aislamientos de *C. dubliniensis* se determinó mediante PCR múltiple con dos pares de cebadores específicos para el locus *MTL*: los cebadores *MTLa1-F* y *MTLa1-R*, amplifican un fragmento del gen que codifica para *MTLa1* y los cebadores *MTLa2-F* y *MTLa2-R* amplifican un fragmento del gen que codifica para *MTLa2* (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Cebadores para el tipo de apareamiento de *C. dubliniensis*

Denominación	Secuencia 5'→3'	Gen	Tamaño producto PCR
<i>MTLa1-F</i>	TAAGAATGAAGACAACGAGG	<i>MTLa1</i>	535 pb ⁽²⁷⁸⁾
<i>MTLa1-R</i>	CGTGTTTTTCTGCTATGAATTCC		
<i>MTLa2-F</i>	ATGAATTCACATCTGGAGGC	<i>MTLa2</i>	615 pb ⁽²⁷⁸⁾
<i>MTLa2-R</i>	CTGTTAATAGCAAAGCAGCC		

Se preparó la mezcla de la PCR para un volumen final de 20 µl (Tabla 3.10) y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700.

Tabla 3.10. Mezcla de reacción para la PCR

Reactivos	Volumen
Biomix 2X	10 µl
Cebador directo MTLa1-F 100µM	1 µl
Cebador inverso MTLa1-R 100µM	1 µl
Cebador directo MTL α2-F 100µM	1 µl
Cebador inverso MTL α2-R 100µM	1 µl
ADN 100ng/µl	1 µl
Agua MilliQ	5 µl

Las condiciones para la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	94 °C, 2 minutos	
Desnaturalización	94 °C ,30 segundos	} 30 ciclos
Hibridación	55 °C, 30 segundos	
Extensión	72 °C, 30 segundos	
Extension final	72 °C, 4 minutos	

3.6.3.6. Secuenciación de la región D1/D2 de los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*

Se utilizaron los cebadores universales NL1 y NL4 (Tabla 3.11) descritos por Kurtzman y Robnett ⁽¹⁶⁰⁾, que permiten amplificar las regiones D1-D2 de la subunidad mayor del ADN_r, siendo ésta una región altamente conservada, por lo que su secuenciación se puede utilizar para identificar una amplia variedad de especies.

Tabla 3.11. Cebadores empleados para la secuenciación

Denominación	Secuencia 5'→3'
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Se preparó la mezcla de la PCR como en la Tabla 3.7, sustituyendo los cebadores por la pareja NL1-NL4 aquí indicada y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones para la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	95 °C, 6 minutos	
Desnaturalización	95 °C ,30 segundos	} 30 ciclos
Hibridación	54 °C, 30 segundos	
Extensión	72 °C, 40 segundos	
Extension final	72 °C, 10 minutos	

Los productos de PCR fueron secuenciados en el Servicio General de Genómica (SGIKer; UPV/EHU). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa informático Bioedit ([http:// www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)) y posteriormente fueron comparadas en la base de datos NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) .

3.6.3.7. Electroforesis y visualización

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño, se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TBE con Gelred 10000x (Biotium, EE.UU.) 5 µl/100ml. Para las electroforesis se utilizaron cubetas horizontales a voltaje constante (90V) y tampón TBE. Las bandas de ADN, en los geles de agarosa, se visualizaron con el transiluminador Chemidoc-Quantity One (Bio-Rad).

3.7. Secuenciación nucleotídica del gen que codifica para la metionina sintasa de *C. dubliniensis* (*CdMET6*)

3.7.1. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta los siguientes criterios, descritos por Sambrook ⁽²⁸⁸⁾.

- 1.- Cada par de cebadores diseñados para amplificar una secuencia de ADN, deben tener entre 18-25 nucleótidos, y no diferir en su longitud más de 3 nucleótidos.
- 2.- Se recomienda que su contenido de guaninas y citosinas sea entre un 40% y 60%.
- 3.- Las secuencias de cada par de cebadores no deben ser complementarias entre si. Se recomienda que no haya más de tres nucleótidos consecutivos en un cebador complementario al otro cebador.
- 4.- Preferiblemente, diseñar unos cebadores con una temperatura de fusión (T_m) entre 52-58 °C.
- 5.- Evitar en las ultimas 5 bases del extremo 3' más de 3 guaninas o 3 citosinas, pero procurar la presencia de una base guanina o citosina en el extremo 3' puesto que favorece una unión específica.

Dado al tamaño del gen, se diseñaron cuatro parejas de cebadores (MET6 1f/1r; MET6 2f/2r; MET6 3f/3r y MET6 4f/4r, descritos en la Tabla 3.12), con el fin de cubrir la secuencia completa con cuatro fragmentos superponibles en sus extremos.

Tabla 3.12. Cebadores para la secuenciación de *CdMET6*.

Denominación	Secuencia 5'→3'	Producto PCR
MET6 1f	GATTGCTGATGGCTGATTG	600 pb
MET6 1r	ATTTGCCATGGGTAGAGG	
MET6 2f	CTTCTGTATTAGGTTTCCCAC	900 pb
MET6 2r	GGCTTCCTCAGTGGTTC	
MET6 3f	GAAGCTGGTGCTGAACAAG	900 pb
MET6 3r	CACCACTAATGGTTGGG	
MET6 4f	CCACCATTGGTTCTTTCC	1000 pb
MET6 4r	TTGAGTCATGGTTAGTATTCA	

Se preparó la mezcla de la PCR como en la Tabla 3.7, sustituyendo en cada caso los cebadores por cada una de las parejas indicadas en la Tabla 3.12 y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones para la PCR fueron:

		Cebadores	
		MET6 1f/1r y 2f/2r	MET6 3f/3r y 4f/4r
	Desnaturalización inicial	94 °C 5 min	94 °C 5 min
30 ciclos	Desnaturalización	94 °C 30 seg	94 °C 30 seg
	Hibridación	50 °C 30 seg	49 °C 30 seg
	Extensión	72 °C 1 min	72 °C 1 min
	Extensión final	72 °C 10 min	72 °C 10 min

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en el Servicio General de Genómica (SGIKer; UPV/EHU).

3.8. Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR

Mediante RT-PCR cuantitativa se analizaron los cambios de expresión de los genes a estudiar. Inicialmente, se diseñaron los cebadores para cada gen y se determinó para cada pareja de cebadores la especificidad para *C. dubliniensis* y la eficiencia de la reacción de amplificación. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación del ADNc, sintetizado por transcripción inversa a partir del ARN extraído de las levaduras, mediante qRT-PCR.

Tras la amplificación se realizó el análisis de los datos, normalizando los niveles de expresión de los genes en estudio con referencia al control interno de expresión (gen de la actina).

3.8.1. Selección de genes a ensayar

Para la cuantificación relativa, se seleccionaron los siguientes genes de *C. dubliniensis*:

- *MET6* (Metionina sintasa)
- *NRG1* (Factor de transcripción inhibidor del crecimiento filamentoso)
- *HOG1* (MAP quinasa de respuesta al estrés osmótico)
- *EFG1* (Factor de transcripción potenciador del crecimiento filamentoso)
- *OLE1* (Ácidos grasos desaturasa)
- *RIM13* (Cisteín-proteasa de tipo calpaína)
- *ISW2* (Componente ATPasa del complejo remodelador de la cromatina)
- *SCH9* (Serina/ treonina proteína quinasa)
- *SUV3* (ARN helicasa ATP-dependiente).

Se seleccionó el gen actina de *C. dubliniensis* (*CdACT1*) como control interno de expresión.

3.8.2. Diseño de los cebadores

Se diseñaron un par de cebadores para cada gen (tabla 3.13) de acuerdo con los siguientes criterios descritos por Marone ⁽¹⁸⁴⁾:

1. El tamaño de cebadores diseñados para amplificar una secuencia de ADN debe estar entre 8-25 nucleótidos, siendo el tamaño óptimo entre 20 y 22 nucleótidos. Además, se recomienda que su contenido en CG sea mayor de un 60%.
2. La Temperatura de fusión (T_m) debe estar comprendida entre 57 y 65°C, siendo la óptima entre 60- 62°C.
3. El tamaño del producto amplificado debe tener entre 200 y 500 pb.
4. Las secuencias de cada par de cebadores no deben ser complementarias entre si. Se recomienda que no debe haber más de tres nucleótidos consecutivos en un cebador complementario al otro cebador.
5. Los cebadores no deben ser homólogos con otros genes en otros organismos.

Tabla 3.13. Cebadores utilizados en la qRT-PCR.

Denominación	Secuencia 5'→3'	Gen	Tamaño producto de PCR
RT-MET6F	TTTTATTTGCCATGGGTTAGAGG	<i>MET6</i>	180pb
RT-MET6R	ACTGATGCTGGTATTAAACCCG		
RT-NRG1F	GAATGGCGGAGTACCGATTA	<i>NRG1</i>	200pb
RT-NRG1R	GCCAAATGTCCTGAAGTGGT		
RT-HOG1F	CCAGGTATTACCGTGCACCT	<i>HOG1</i>	240pb
RT-HOG1R	TCTATGTGGCAACGATTGGA		
RT-EFG1F	GCCACGAGTGACAACACTACGA	<i>EFG1</i>	240pb
RT-EFG1R	ACCAACGCTCTTTCAAATGG		
RT-OLE1F	GGGTGACTATTGGGGAGGAT	<i>OLE1</i>	160pb
RT-OLE1R	GTCACAAATGCCGTCAACAC		
RT-RIM13F	AGGCATGTACGGTCAAGGTC	<i>RIM13</i>	240pb
RT-RIM13R	ATTGGTTCGCTGGAATTGAG		
RT-ISW2F	CCTCAAGCGGACTTACAAGC	<i>ISW2</i>	170pb
RT-ISW2R	GTTCATTTGTCCGGCCTTGTT		
RT-SCH9F	CCGCACATGTCTGAACAATC	<i>SCH9</i>	225pb
RT-SCH9R	GTTGTGATTGCTGTGGGTTG		
RT-SUV3F	TGGAGCATTACCACCAGAAA	<i>SUV3</i>	200pb
RT-SUV3R	GCTCGACCAGCAATTTGTTT		
RT-ACT1F ⁽¹⁹¹⁾	AGCTCCAGAAGCTTTGTTTCAGACC	<i>ACT1</i>	130pb
RT-ACT1R ⁽¹⁹¹⁾	TGCATACGTTTCAGCAATACCTGGG		

Se utilizó el programa Primer3 desarrollado por Rozen y Skaletsky (www-genome.wi.mit.edu), para comprobar que los cebadores cumplían con los criterios mencionados.

Para determinar la especificidad de los cebadores para *C. dubliniensis*, todas las secuencias nucleotídicas fueron comparadas en Genbank usando el programa BLASTN, disponible en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.8.3. Determinación de la eficiencia de la reacción de amplificación

Se realizaron diluciones decimales seriadas del ADN genómico (ADNg) y se amplificó utilizando los cebadores para cada gen a estudiar y del gen control. Mediante una gráfica del ciclo umbral (CT) frente al logaritmo de las diluciones del ADNg se determinó la pendiente (m) de la línea. La eficiencia (E) de la PCR ⁽²¹¹⁾ se determinó calculando la ecuación siguiente:

$$E = [10^{(-1/m)}] - 1$$

El valor óptimo de la eficiencia es 1 y se consideraron como válidos los valores de eficiencia comprendidos entre 0,75 y 1 (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Valores de eficiencia de la reacción de amplificación para los distintos genes

Gen	Nombre de gen	Eficiencia
<i>ACT1</i>	Actina	0,90
<i>NRG1</i>	Factor de transcripción inhibidor del crecimiento filamentoso	1,1
<i>OLE1</i>	Ácidos grasos desaturasa	0,98
<i>EFG1</i>	Factor de transcripción potenciador del crecimiento filamentoso	0,75
<i>HOG1</i>	MAP quinasa de respuesta al estrés osmótico	1
<i>RIM13</i>	Cisteín-proteasa de tipo calpaína	0,83
<i>ISW2</i>	Componente ATPasa del complejo remodelador de la cromatina	0,93
<i>SUV3</i>	ARN helicasa ATP-dependiente	0,80
<i>SCH9</i>	Serina/ treonina proteína quinasa	0,81

3.8.4. Extracción de ARN de levaduras

○ Preparación de las muestras

Se emplearon dos medios de cultivo diferentes, el caldo YNB sin aminoácidos suplementado con galactosa y metionina (25 mg/l), por ser el medio donde se observó una mayor producción de clamidosporas y el caldo SDA para el crecimiento en forma levaduriforme.

Las células cultivadas se recogieron mediante centrifugación a 2500rpm durante 2 minutos y se colocaron sobre un mortero de ágata estéril, al que se añadió nitrógeno líquido, al tiempo que se pulverizaban con la maza.

○ Extracción de ARN mediante el Kit High Pure RNA Isolation (Roche, Suiza) y cuantificación.

Se procedió a la extracción del ARN mediante el Kit High Pure RNA Isolation[®] (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente se cuantificó la cantidad de ARN midiendo la absorbancia a 260/280 nm empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3.8.5. Transcripción inversa del ARN

Para la transcripción inversa del ARN, se utilizó el kit Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche). Se preparó una mezcla en un vial de 500 µl, con 1µg del ARN total, 2 µl del cebador Random p (Roche) y se llevó a un volumen final de 13 µl con agua dietilpirocarbonato (DEPC; Roche) y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Tras finalizar el tiempo de incubación se colocó el vial en hielo y se le añadió la mezcla de reactivos (Tabla 3.15). Se homogeneizó suavemente y se incubó 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 55 °C y finalmente 5 minutos a 85 °C.

Tabla 3.15. Mezcla de reactivos para la transcripción inversa del ARN

Reactivo	Volumen
Tampón reacción Transcriptor RT 5× (Roche)	4 µl
Protector Inhibidor RNasa (40 U/µl) (Roche)	0,5 µl
dNTP-Mix 10 mM (Roche)	2 µl
Transcriptor Transcriptasa Reversa (Roche)	0,5 µl

3.8.6. Amplificación mediante qRT-PCR

La qRT-PCR se llevó a cabo en el termociclador ABI 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Se preparó la mezcla de reacción de la qRT-PCR para un volumen final de 20 μ l (Tabla 3.16) con cada una de las parejas de cebadores descritos previamente (Tabla 3.13).

Tabla 3.16. Mezcla de reactivos para qRT-PCR

Reactivo	Volumen
SYBR Premix Ex Taq (mezcla de reactivos con <i>Taq</i> DNA polimerasa, dNTPs y MgCl ₂ ; Takara, Japón) 2X	10 μ l
Cebador directo 10 μ M	0,4 μ l
Cebador inverso 10 μ M	0,4 μ l
ROX Reference Dye (50X)	0,4 μ l
ADNc	2 μ l
Agua MilliQ	6,8 μ l

Las condiciones para la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	95 °C, 10 segundos	
Desnaturalización	95 °C ,5 segundos	} 40 ciclos
Hibridación	60 °C, 35 segundos	
Desnaturalización	95 °C, 15 segundos	
Hibridación final	60 °C, 1 minuto	
Desnaturalización final	95 °C, 15 segundos	

3.8.7. Análisis de los resultados

Los datos de fluorescencia obtenidos se analizaron mediante el software de análisis SDS 1.22. de Applied Biosystems. El software calculó la línea base para cada muestra, que indica la ausencia de amplificación detectable. El nivel umbral en el que la fluorescencia supera significativamente la línea base se fijó de forma manual en 0,2. El software calculó el CT para cada pocillo, que es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera el nivel umbral, en la escala logarítmica de la amplificación (Figura 3.4).

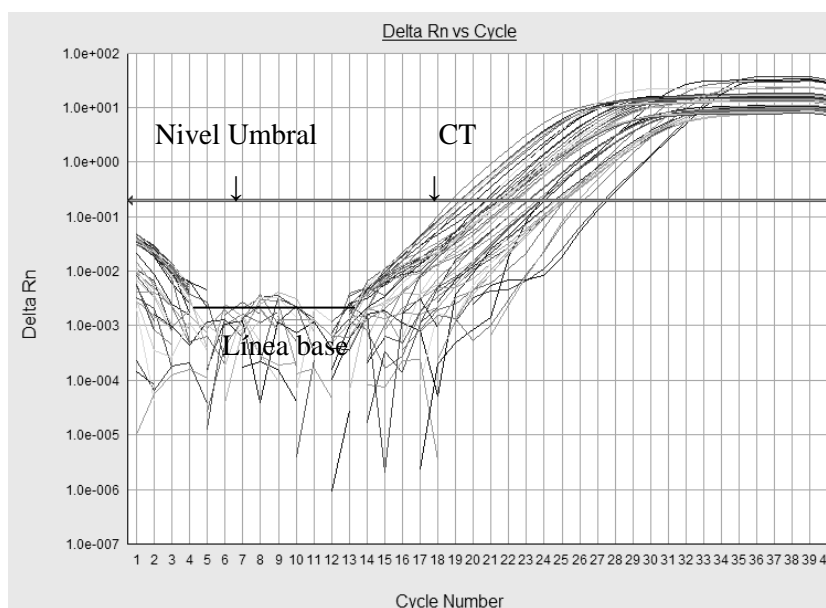


Figura 3.4. Representación gráfica de la intensidad relativa de la fluorescencia emitida frente al número de ciclos de la PCR.

El análisis de los datos se realizó siguiendo las pautas establecidas por Schmittgen y Livak ⁽²⁹⁹⁾. Se calcularon los valores de $2^{-\Delta C_T}$, siendo la variación de C_T el resultado de la resta del C_T promedio de cada muestra con el C_T promedio del gen control interno. Los ensayos con cada gen se realizaron por duplicado para cada cepa y los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba t de Student con el programa Microsoft Excel. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.9. Sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos

Se estudió la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de las cepas de *Candida* con el método comercial Sensititre YeastOne YO8® (Trek Diagnostic Systems). Es un método de microdilución colorimétrico que contiene un indicador de crecimiento basado en la óxido-reducción del colorante azul de Alamar, el cual facilita la lectura de los puntos finales por un cambio de color.

Cada placa contiene diluciones seriadas de ocho antifúngicos deshidratados: 5-fluorocitosina (5-FC; 0,03-64µg/ml), anfotericina B (AMB; 0,008-16µg/ml), fluconazol (FCZ; 0,125-256µg/ml), voriconazol (VCZ; 0,008-16µg/ml), ketoconazol (KTZ; 0,008-16µg/ml), itraconazol (ITZ; 0,008-16µg/ml), posaconazol (PCZ; 0,008-8µg/ml) y caspofungina (CAS; 0,008-16µg/ml).

El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante: se preparó una suspensión 0,5 de McFarland (5×10^6 células/ml) en agua destilada estéril a partir de un cultivo de levaduras incubadas en agar SDA a 37 °C durante 24 horas y se inocularon 20 µl de esta suspensión en 11 ml del medio de cultivo para obtener una concentración final de $1,5-8 \times 10^3$ células/ml. Se añadieron 100 µl de la segunda suspensión a cada pocillo y las placas selladas con una película transparente se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas registrándose la concentración mínima de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento de las levaduras (CMI).

3.10. Técnicas de análisis de proteínas

3.10.1. Determinación de la concentración de proteínas

La cantidad de proteína se determinó con el reactivo Plus Protein Assay Reagent kit (Pierce) basado en la técnica descrita por Bradford⁽³¹⁾ usando un patrón de seroalbúmina bovina (BSA; fracción IV). La absorbancia se midió a 595nm y la concentración de proteína de cada solución problema fue calculada a partir de la recta de regresión lineal obtenida con el patrón de BSA siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.10.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

- Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio (Bio-Rad)	10 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se prepara en el momento de usar

- SDS al 10%

SDS	10 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

- Tampón del gel de resolución 1,5M

Tris-Base	181,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar a pH 8,8 con HCl antes de completar el volumen final

- Gel de resolución al 10%

Tampón gel de resolución 1,5M	2,5 ml
Solución de acrilamida-bisacrilamida 29:1 (Pronadisa) 40%	2,475 ml
SDS 10%	100 µl
Agua destilada	4,875 ml

Desgasificar durante 5 minutos mediante una bomba de vacío y suplementar con:

Persulfato de amonio 10%	50 µl
TEMED	5 µl

- Tampón del gel de apilamiento 0,5M

Tris-Base	60 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 6,8 con HCl antes de completar el volumen final	

- Gel de apilamiento

Tampón gel de apilamiento 0,5M	1,25 ml
Solución de acrilamida-bisacrilamida 29:1 (Pronadisa) 40%	0,488 ml
SDS 10%	75 μ l
Agua destilada	3,213 ml
Desgasificar durante 5 minutos mediante una bomba de vacío y suplementar con:	
Persulfato de amonio 10%	25 μ l
TEMED	5 μ l

- Tampón de electrodos

SDS	1 g
Tris-Base	3 g
Glicina (Panreac)	14,4 g
Agua c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 8,3 antes de completar el volumen final	

- Tampón de muestra 5X

Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	2,5 ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol (Probus, España)	2 ml
Azul de bromofenol (BDH, R.U.)	1 mg
Agua destilada	0,5 ml

Completar en el momento de usar con β -mercaptoetanol (Bio-Rad) 5% (v/v) concentración final en la muestra preparada.

- **Método**

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes se realizó siguiendo el método de Laemmli ⁽¹⁶³⁾. La electroforesis se llevó a cabo en geles que constaban de dos partes, un gel de resolución y un gel de apilamiento. Las muestras se trataron en un baño a 100 °C durante 5 minutos y en presencia de agentes desnaturizantes (β -mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro y SDS, que se une a las proteínas desnaturizándolas y confiriéndoles una carga neta negativa). La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara de electroforesis MiniProtean III (Bio-Rad), a un voltaje constante de 200 V durante 45 minutos.

3.10.3. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

- Tampón de rehidratación

Urea (Bio-Rad)	4,2 g
Tiourea (Bio-Rad)	1,52 g
Chaps (GEHealthcare, R.U.)	4% (p/v)
Agua destilada c.s.p.	10 ml

Almacenar a -20 °C

Añadir antes de usar, para cada 500 μ l de tampón de rehidratación:

Pharmalites (GEHealthcare)	2% (v/v)
DTT	0,0015 g
Azul de bromofenol	0,002% (p/v)

- Tampón de equilibrado

Tris-HCl 1,5M pH 8,8	10 ml
Urea	72,02 g
Glicerol (87% v/v)	30% (v/v)
SDS	2% (p/v)
Azul de bromofenol	1% (p/v)
Agua destilada c.s.p.	200 ml

○ **Método**

La primera separación se realizó en geles de isoelectroenfoque Immobiline DryStrips (GEHealthcare, R.U.) con un gradiente de pH de 3-10, utilizando el sistema electroforético Ettan IPGphor (Amersham). Las muestras (aproximadamente 400 µg de extracto de proteína) se diluyeron en 125 µl del tampón de rehidratación que contiene agentes caotrópicos, surfactantes y agentes reductores. Los agentes caotrópicos como la urea y tiourea, provocan la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que son solubilizados por los agentes surfactantes. Los agentes reductores como el DTT completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro. Las condiciones en las que se realizó la electroforesis se describen a continuación (Tabla 3.17):

Tabla 3.17. Condiciones electroforesis con sistema electroforético Ettan IPGphor

Etapa	Voltaje	Duración (horas)
1 (Hidratación)	0V	12
2	500V	1
3	1000V	1
4	5000V	3

Una vez que las proteínas habían sido separadas por su punto isoeléctrico, los geles de isoelectroenfoque se trataron primero con el tampón de equilibrado suplementado en el momento de usar con DTT al 1% (p/v) durante 15 minutos y seguidamente con el tampón de equilibrado suplementado en el momento de usar con IAA al 2,5% (p/v) durante 15 minutos. La segunda separación se realizó en función de su tamaño molecular utilizando para la electroforesis los geles Criterion XT Bis-Tris 4-12%® (Bio-Rad) y la cámara de electroforesis MiniProtean III® (Bio-Rad) a un voltaje constante de 200 V durante 45 minutos.

3.10.4. Tinción de geles con Azul de Coomassie

- Solución de Azul de Coomassie

Coomassie Brilliant Blue R (Sigma)	1,2 g
Metanol (Panreac)	500 ml
Ácido acético (Panreac)	100 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

- Solución desteñidora I

Metanol	500 ml
Ácido acético	100 ml
Agua destilada c.s.p.	400 ml

- Solución desteñidora II

Metanol	50 ml
Ácido acético	70 ml
Agua destilada c.s.p.	880 ml

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos durante una hora o bien toda la noche con la solución de Azul de Coomassie. A continuación, los geles fueron desteñidos con la solución desteñidora I durante una hora y se rehidrataron y conservaron en la solución desteñidora II.

Se empleó el kit de coloración Colloidal Coomassie® (Invitrogen, EE.UU.) en los casos donde se quiso obtener una mayor sensibilidad.

3.10.5. Electrotransferencia

- Tampón de transferencia

Tris-Base	3,03 g
Glicina	11,26 g
Metanol	100 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

- Solución rojo Ponceau

Rojo Ponceau S (Sigma)	0,01 g
Ácido acético	50 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

- Solución desteñidora

Ácido acético	50 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

- **Método**

Las proteínas separadas en los geles de SDS-PAGE o 2D-PAGE, fueron transferidas a membranas de polivinilideno fluoruro (PVDF; Immobilon-P, Millipore, EE.UU.) previamente hidratadas en metanol y en el tampón de transferencia. La electrotransferencia se realizó en el sistema semiseco Fast Blot System (Biometra, Alemania) durante una hora a 5 mA/cm^2 y una vez terminada la transferencia, las proteínas se tiñeron con Rojo Ponceau (Sigma) en agitación durante dos minutos, seguido de un lavado con la solución desteñidora.

3.10.6. Inmunodetección de antígenos

- Tampón Tris-Salino (TBS)

Tris-Base	1,2 g
NaCl	9 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar a pH 7,3 antes de completar el volumen final.

- TBS-leche (TBSL)

Leche en polvo descremada	8 g
TBS	100 ml

- **Método**

Las membranas de PVDF con las proteínas inmovilizadas, se incubaron con el AcM 12F7-F2 (1,49 mg/ml) de *C. dubliniensis* a una dilución 1:25 en TBSL durante una hora a 37 °C en agitación suave. Posteriormente, se realizaron tres lavados de cinco minutos con TBS y se realizó una segunda incubación de 45 minutos a 37 °C en agitación suave con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido 1:600 en TBSL. Tras la segunda incubación, se volvió a lavar tres veces con TBS y se añadió a las membranas el reactivo de quimioluminiscencia HRP (Bio-Rad). La luminiscencia se registró con el transiluminador Chemidoc-Quantity One (Bio-Rad).

3.10.7. Detección de glicoproteínas mediante Concanavalina A

- Tampón PBS Tween 20

Tween 20 [®]	0,5 ml
PBS c.s.p.	1000 ml

- Tampón PBS-Ca-Mg

Cl ₂ Ca	110 mg
Cl ₂ Mg 6H ₂ O	203 mg
PBS c.s.p.	1000 ml

- **Método**

Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y transferidas a membranas de nitrocelulosa Protran® (Schleicher & Schuell, Alemania). Las membranas se trataron con la solución de PBS Tween 20 durante 2 minutos a 20 °C y lavadas 2 veces con PBS. Después de una incubación de 16 h a 20 °C con concanavalina A marcada con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:1000 en PBS-Ca-Mg, se lavaron 3 veces con PBS y la actividad peroxidasa se detectó con el reactivo de quimioluminiscencia de la enzima Peroxidasa de rábano (HRP; Bio-Rad) utilizando el transiluminador Chemidoc-Quantity One.

3.10.8. Aislamiento de componentes proteicos mediante electroelución

- Tampón Tris-Bórico

Tris-Base	6,05 g
Ácido bórico (Sigma)	1,55 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar a pH 8,7 antes de completar el volumen final.

El aislamiento de componentes proteicos con un peso molecular determinado, se llevó a cabo en el equipo electroeluidor Mini Whole Gel Eluter (Bio-Rad), a partir de extractos antigénicos separados en geles SDS-PAGE, aplicando durante 20 minutos una corriente de 100 mA en el tampón Tris-Bórico. Las fracciones electroeluidas, se analizaron mediante inmunodetección de las mismas.

3.10.9. Desglicosilación de proteínas

Para la eliminación de las cadenas glucídicas unidas por enlaces N- y O-glicosídicos se utilizó la enzima N-Glicosidasa F (Sigma), que elimina de forma efectiva los N-oligosacáridos y los azúcares unidos mediante enlaces de tipo O-glicosídico.

Para eliminar sales que pudiesen interferir en la reacción de desglicosilación, la fracción proteica obtenida mediante electroelución, se dializó frente a agua MilliQ a 4 °C en membranas de diálisis de 12000-14000 Da de exclusión molecular (Medicell). Tras la diálisis, se determinó la concentración proteica y las muestras se liofilizaron. Se tomaron 200 µg del extracto seco liofilizado y se reconstituyó en 35µl con agua MilliQ, se le añadieron 10µl del tampón de reacción 5X (250mM PBS, pH 7,5) y 2,5µl de la solución desnaturizante (SDS 2 % y β-mercaptoetanol 1M). Se homogenizó con suavidad y se incubó en baño a 100 °C durante 5 minutos. Una vez enfriada la mezcla, se añadieron 2,5µl de Tritón X-100 15% (v/v) y 2µl de N-Glicosidasa F (5 U/ml; QA Bio EE.UU) y se incubó a 37°C durante 3 horas.

3.10.10. Secuenciación de proteínas

- **Preparación de la muestra para geles SDS-PAGE**

Las muestras peptídicas separadas por electroforesis para su posterior secuenciación, requirieron un tratamiento diferente a la electroforesis desnaturizante convencional. Para evitar que quedasen restos de cisteínas libres que pudiesen reaccionar con diferentes componentes durante la electroforesis se eliminó el β-mercaptoetanol del tampón de muestra. En su lugar, se añadieron 5µl de DTT 10mM por cada 25µl de muestra y se incubó durante 30 minutos a 56 °C, tras los cuáles se dejó enfriar y se centrifugó durante unos segundos. La mezcla se completó con 5µl de IAA 25mM y se dejó 15 minutos en oscuridad.

- **Método**

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS o en geles bidimensionales de poliacrilamida a un voltaje de 200 V durante 45 minutos. Transcurrida la electroforesis, los geles fueron teñidos con Colloidal Coomassie Stain para la visualización de la banda de interés que fue secuenciada en servicio de Proteómica y Genómica del Centro de

Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Madrid y al Servicio de Proteómica (SGIKer; UPV/EHU).

3.10.11. Análisis de las secuencias

Las secuencias aminoacídicas obtenidas se compararon en el programa informático T-Coffee de alineamiento múltiple (www.tcoffee.org) que permite localizar regiones de alta homología entre las secuencias analizadas. Mediante el programa informático Epitopia Server, se comprobó la capacidad antigénica de las regiones que presentaron una alta homología (<http://epitopia.tau.ac.il/>).

3.11. Expresión de *CdMET6* en *C. albicans*

Para incorporar el gen *CdMET6* en *C. albicans*, se siguió el esquema de la figura 3.5. En primer lugar se amplificó, a partir de ADN genómico de *C. dubliniensis*, la secuencia codificante de *CdMET6*. El producto obtenido en la reacción de amplificación, así como el vector elegido fueron digeridos con enzimas de restricción correspondientes para posteriormente ligarlos. A continuación, se insertó el vector recombinante en células competentes de *E. coli* en las cuales se obtuvieron múltiples copias de cada plásmido recombinante. Tras la selección y comprobación de los clones positivos, el vector recombinante se insertó mediante electroporación en *C. albicans*.

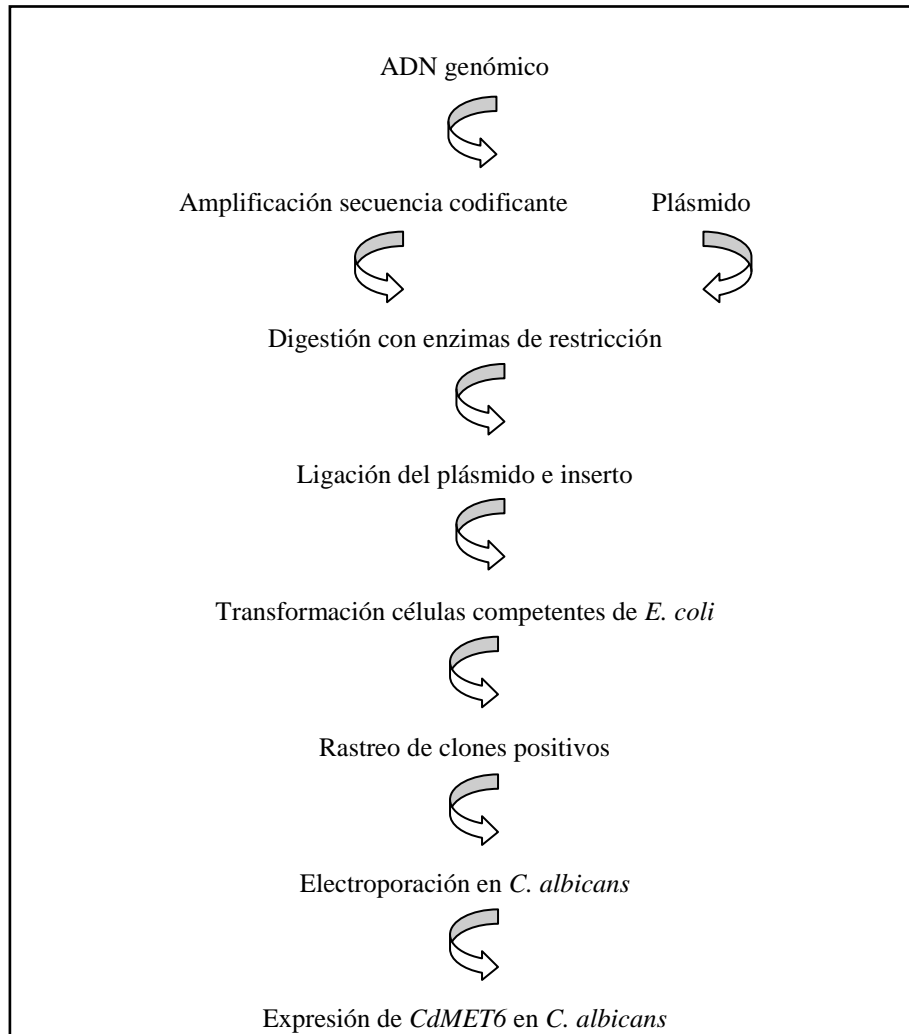


Figura 3.5. Esquema del proceso para la expresión de *CdMET6* en *C. albicans*

3.11.1. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta los siguientes criterios descritos por Sambrook ⁽²⁸⁸⁾:

1- Cada par de cebadores diseñados para amplificar una secuencia de ADN, deben tener un tamaño de entre 20-30 nucleótidos, y no diferir en su longitud en más de tres nucleótidos. Además, se recomienda que su contenido en CG no exceda de un 40-60%.

2- Las secuencias de cada cebador no deben ser complementarias entre sí. Se recomienda que no haya más de tres nucleótidos consecutivos en un cebador complementario al otro cebador.

3- Deben diseñarse con secuencias diana de enzimas de restricción presentes en el plásmido pero no en el interior de la secuencia del ADN que se quiere clonar. Para ello, la secuencia a clonar se analizó con el programa NEBcutter de BioLabs que busca en ella lugares de restricción de las enzimas más comúnmente empleadas.

3.11.2. Amplificación de la secuencia codificante

Mediante la técnica de PCR, se amplificó la secuencia codificante de *CdMET6* con los cebadores MET6 F SalI y MET6 R BamHI (Tabla 3.18).

Tabla 3.18. Características de los cebadores. En negrita y subrayado se señala la secuencia diana de las enzimas de restricción.

Denominación	Secuencia 5'→3'	Tamaño producto PCR
MET6 F SalI	GACCT <u>GTCGACC</u> CACAATGGTTCAATCTTCTG	2300pb
MET6 R BamHI	CGC <u>GGATCC</u> TTAGTATTTAGCTCTGAATTC	

Se preparó la mezcla de la PCR para un volumen final de 50 µl (Tabla 3.19) y la amplificación del ADN se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 9700.

Tabla 3.19. Mezcla de reacción para la PCR:

Reactivos	Volumen
Biomix (Bioline) 2X	25 µl
Cebador MET6 F SalI 100µM	0,5 µl
Cebador MET6 R BamHI 100µM	0,5 µl
ADN 100ng/µl	2 µl
Agua MilliQ	22 µl

Las condiciones para la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	94°C 2 minutos	} 30 ciclos
Desnaturalización	94°C 15 segundos	
Hibridación	52°C 30 segundos	
Extensión	72°C 2 minutos	
Extensión final	72°C 5 minutos	

3.11.3. Plásmido pNIM1

3.11.3.1. Purificación del plásmido

Para la extracción del plásmido pNIM1 de la cepa de *E. coli DH5α* (Tabla 3.3) se utilizó el kit Genelute Plasmid Miniprep (Sigma) a partir de un cultivo en caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 37 °C durante 18 h en agitación (200 rpm).

3.11.3.2. Digestión con endonucleasas de restricción

Se preparó una mezcla con las enzimas SalI (Promega) y BamHI (Promega) para la digestión del inserto a un volumen final de 100 µl (Tabla 3.20) y se incubó durante 2 horas a 37 °C por separado con cada una de las enzimas.

Tabla 3.20. Mezcla de enzimas para la digestión del inserto

SalI		BamHI	
H ₂ O	28 µl	H ₂ O	28 µl
Buffer D 10x (Promega)	10 µl	Buffer E 10x (Promega)	10 µl
BSA 10x (Promega)	10 µl	BSA 10x (Promega)	10 µl
ADN 50 ng/µl	50 µl	ADN 50 ng/µl	50 µl
SalI 10 u/µl	2 µl	BamHI 10 u/µl	2 µl

La digestión del plásmido pNIM1 se realizó con las enzimas de digestión SalI (Promega) y BglII (Promega) para un volumen final de 100 µl (Tabla 3.21) y se incubó durante 2 horas a 37 °C.

Tabla 3.21. Mezcla de enzimas para la digestión del plásmido

SaII y BglII	
H ₂ O	26 µl
Buffer E 10x (Promega)	10 µl
BSA 10x (Promega)	10 µl
ADN 50 ng/µl	50 µl
SaII 10 u/µl	2 µl
BglII 10 u/µl	2 µl

Tras la digestión del plásmido se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% donde se visualizaron 2 fragmentos: uno de aproximadamente 6,5Kb y otro en torno a 1Kb. El fragmento de 6,5Kb (plásmido pNIM1) se aisló y purificó con el kit Clean up.

3.11.4. Ligación

Los fragmentos digeridos del inserto y del vector pNIM1, fueron mezclados en una proporción molar 1:1, junto con 3 µl del tampón de ligación 10X (Promega), 1 µl de T4 DNA ligasa (Promega) y agua MilliQ hasta completar un volumen de 30 µl. Esta mezcla se incubó a 25 °C durante 2 horas.

3.11.5. Transformación de células competentes

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, se procedió a transformar con ellos las células competentes de *E. coli* XL 10 Gold (Stratagene; Tabla 3.3). Con este paso se consigue estabilizar el plásmido recombinante y obtener múltiples copias del mismo. Para realizar la transformación, se añadieron 200 µl de las células competentes a 30 µl de la mezcla de ligación y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, la mezcla fue sometida a un choque térmico durante 2 minutos a 42 °C; seguido de otros 2 minutos de incubación a 4 °C. Se les añadió 1 ml de medio SOC precalentado a 37 °C y se incubó durante una hora a 37 °C a 200 rpm.

Para seleccionar las células transformadas, se inocularon 100µl de la mezcla de transformación sobre placas de agar LB suplementados con ampicilina 100 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

3.11.6. Rastreo de clones positivos

Cada colonia se resembró en caldo LB con ampicilina incubándose a 37 °C a 120 rpm durante toda la noche. El ADN plasmídico se purificó con el kit Genelute Plasmid Miniprep. Para verificar la presencia del inserto en los plásmidos recombinantes se amplificó mediante PCR esta secuencia utilizando los cebadores específicos MET6 F SalI y MET6 R BamHI.

3.11.7. Transformación de células de *C. albicans* por electroporación

○ Preparación de las muestras

Se preparó un cultivo en caldo LB suplementado con ampicilina a 37 °C a 120 rpm durante toda la noche a partir de las colonias transformadas con el plásmido recombinante y confirmadas. Transcurrido el tiempo de incubación se aisló el ADN plasmídico y se realizó una digestión con las enzimas KpnI y SacII durante 2h a 37 °C, para obtener una conformación lineal del plásmido recombinante (Tabla 3.22). Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, donde se visualizó y recortó el fragmento de aproximadamente 9 kb. La purificación de ADN se realizó con el kit Clean up.

Tabla 3.22. Mezcla de enzimas para la digestión del plásmido

KpnI y SacII	
H ₂ O	52 µl
Buffer A 10x (Promega)	20 µl
BSA 10x (Promega)	20 µl
ADN 50 ng/µl	100 µl
KpnI 10 u/µl	4 µl
SacII 10 u/µl	4 µl

- **Método**

La transformación de células de *C. albicans* mediante electroporación se realizó siguiendo el método descrito por Köhler ⁽¹⁵⁶⁾. Se preparó un cultivo de la cepa SC 5314 de *C. albicans* en caldo YEPD a 30 °C durante toda la noche en agitación (200 rpm). Se inocularon 2 µl del cultivo de *C. albicans* en 50 ml de caldo fresco YEPD y se incubó a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 1,6-2,2 a 600nm.

Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm a 4 °C durante 5 minutos y se resuspendieron en 8 ml de agua destilada estéril, se añadió 1 ml de tampón TE y 1 ml de acetato de litio 1M (pH 7,5). La suspensión se incubó a 30 °C durante 1 h en agitación (200 rpm). Tras la incubación, se añadieron 250 µl de DTT 1M y se incubó nuevamente a 30°C durante 30 minutos en agitación (200 rpm). Finalmente se añadieron 40 ml de agua destilada a la suspensión.

Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm a 4 °C durante 5 minutos y el sedimento celular se lavó por centrifugación con 50 ml de agua destilada a 4 °C y con 10 ml de sorbitol 1M a 4 °C. Las células se resuspendieron en 50 µl de sorbitol 1M, manteniéndose en hielo hasta su uso.

Para realizar la electroporación, se mezclaron 5 µl del plásmido recombinante (aproximadamente 1µg) digerido con las enzimas de restricción KpnI y SacII, con 40 µl de las células electrocompetentes de *C. albicans* mantenidas en hielo. La electroporación se llevó a cabo en una cubeta de 0,2 cm a 200 Ω, 1,6 kV durante 5 milisegundos, con el sistema Gene Pulser (Bio-Rad).

Tras finalizar la electroporación, las células transformadas fueron seleccionadas en agar YEPD suplementadas con nourseotricina (200 µg/ml) y se incubaron a 30 °C.

3.11.8. Rastreo de colonias transformadas

La transformación en las células de *C. albicans* se realizó con el plásmido pNIM1-*CdMET6* y con plásmido pNIM1, como control de la transformación. El plásmido pNIM1 a diferencia del plásmido pNIM1-*CdMET6* contiene el gen *GFPI*, por lo que se comprobó mediante la técnica de PCR, la ausencia del gen *CaGFP* en las células transformadas con el plásmido pNIM1-*CdMET6*, para lo que se utilizaron los cebadores GFP F/R, que amplifican un fragmento de 700 pb del gen *caGFP* (Tabla 3.23)

Se preparó la mezcla de la PCR (Tabla 3.19) y se amplificó el ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones para la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	95°C 6 minutos	
Desnaturalización	95°C 30 segundos	} 35 ciclos
Hibridación	58°C 30 segundos	
Extensión	72°C 40 segundos	
Extensión final	72°C 10 minutos	

Se utilizaron los cebadores ADH1 F y cartTA R, SAT F y MET6 R BamHI, y MET6 F SalI y ADH1R⁽¹⁹¹⁾ (Tabla 3.23 y figura 3.6) para comprobar la transformación de las células de *C. albicans*.

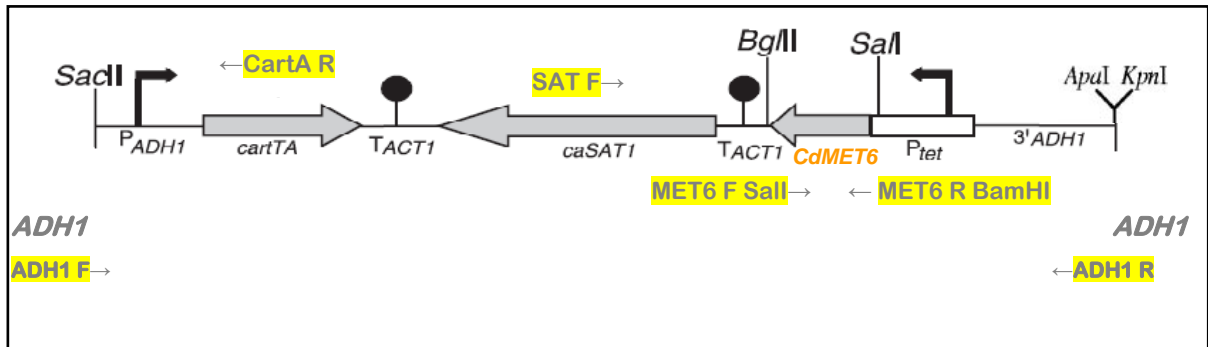


Figura 3.6. Estructura y lugar de inserción del pNIM1-CdMET6 en el locus ADH1. Los cebadores empleados para el rastreo de células transformadas están sombreados.

Tabla 3.23. Características de los cebadores utilizados en la PCR para el rastreo de colonias transformadas.

Denominación	Secuencia 5'→3'	Gen o función
GFP F	GTATAGTTCATCCATGCCATGT	GFP
GFP R	GTAAGGGAGAAGAAGCTTTTCAC	
ADH1 F	ATGCAAGCAAGCTTATTCA	Rastreo de colonias transformadas
ADH1 R	CCCAAGATCTTACCTTCTTCCATT	
SAT F	CAATGCCGCCGAGAGTAAAG	
cartTA R	CGGCATACTATCAGTAGTAG	

Se preparó la mezcla de reacción para realizar la PCR (Tabla 3.19) con cada pareja de cebadores y se realizó la amplificación del ADN en el termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones para la PCR fueron:

		Cebadores			
		ADH1F- cartTAR	SATF- MET6RBamHI	MET6FSali- ADH1R	
30 ciclos	Desnaturalización inicial	95 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 2 min	
	Desnaturalización	94 °C 15 seg	94 °C 15 seg	94 °C 15 seg	
		Hibridación	55 °C 20 seg	52 °C 30 seg	52 °C 30 seg
		Extensión	72 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 2 min
	Extensión final	72 °C 4 min	72 °C 15 min	72 °C 15 min	

3.12. Microscopía electrónica de transmisión

- Tampón cacodilato 0,1M a pH 7,4

Na(CH ₃) ₂ AsO ₃	2,149 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml
Ajustar a pH 7,4 antes de completar el volumen final.	

- Solución de fijación

Glutaraldehido 2% (Merck)	2 g
Ácido tánico 0,2% (Merck)	0,2 g
Tampón cacodilato 0,1M pH 7,4 c.s.p.	100 ml

- Tampón cacodilato 0,1M pH 7,4- Sacarosa

Sacarosa	3 g
Tampón cacodilato 0,1M pH 7,4 c.s.p.	100 ml

- Tampón cacodilato 0,1M pH 7,4-Sacarosa- Tetróxido osmio

Sacarosa	3 g
Tetróxido de osmio	0,1 g
Tampón cacodilato 0,1M pH 7,4 c.s.p.	100 ml

- **Preparación de las muestras**

Las células procedentes de un cultivo de 24h a 37 °C en caldo SDA, fueron lavadas con PBS y se fijaron en la solución de fijación durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras finalizar la fijación, la pastilla de células se lavó tres veces con el tampón cacodilato 0,1M pH 7,4-Sacarosa a 4 °C y posteriormente, se incubó con el tampón cacodilato 0,1M pH 7,4- Sacarosa-Tetróxido de osmio durante 45 minutos a 4 °C. La pastilla de células se lavó tres veces con PBS y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol (Tabla 3.24):

Tabla 3.24. Tratamiento de las muestras con etanol

Deshidratante	Concentración (%)	Tiempo (minutos)
Etanol	30	15
Etanol	50	15
Etanol	70	15
Etanol	90	15
Etanol	100	15

La muestra deshidratada, fue lavada 2 veces durante 15 minutos con óxido de propileno (Sigma) y se incubó a temperatura ambiente en soluciones de concentración creciente de resina Epon en óxido de propileno (Tabla 3.25).

Tabla 3.25. Tratamiento muestras con resina Epon

Óxido propileno: Epon	Tiempo (horas)
2:1	1
1:1	1
1:2	1

Los viales con los bloques de resina se dejaron abiertos durante 12 horas para que se evaporasen los restos de propileno.

Las muestras incluidas, se colocaron en cápsulas de polietileno y se rellenaron con resina Epon, dejándolos polimerizar a 55 °C durante 48h.

Posteriormente, se tallaron los bloques y se realizaron cortes ultrafinos (50-100 nm), los cuales fueron depositados sobre rejillas de cobre de 200mesh y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su posterior observación con el microscopio electrónico de transmisión (Philips EM 208S) a 60 kV.

○ **Método**

Para los ensayos de inmunomarcaje se utilizaron las muestras en las rejillas sin contrastar. Con esta técnica se obtiene una peor preservación estructural y un menor contraste de las imágenes pero, en cambio, se consigue preservar la capacidad antigénica de la muestra.

Para el ensayo de inmunocitoquímica, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas, colocando las rejillas con las muestras sobre gotas de 50 µl de solución de bloqueo (suero de cabra inactivado 10%, azida sódica 0,02% en tampón PBS-Tween 0,1% pH=8,2) con la cara portadora de la muestra en contacto con dicha solución. Este proceso, al igual que todos los posteriores, fue realizado en cámara húmeda a temperatura ambiente con ligera agitación orbital. Tras el bloqueo, las muestras se incubaron de la misma manera con el anticuerpo primario, AcM 12F7-F2, a una dilución 1:25 en la solución de incubación (suero de cabra inactivado 1%, BSA 1%, azida sódica 0,02% en PBS-Tween 0,1% pH=8,2) durante 2 h. Posteriormente, tras varios lavados en la solución de incubación durante 5 minutos en cada gota a través de una serie de 5 gotas, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón marcado con oro coloidal de 10 nm (Sigma) en la solución de incubación en las mismas condiciones ya citadas. A continuación para eliminar el exceso de anticuerpo

secundario, las muestras se lavaron pasando las rejillas por una nueva serie de 5 gotas de solución de bloqueo y 5 gotas de agua destilada. Por último, las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo para así ser observadas en el microscopio electrónico PHILIPS EM208S (con cámara digital Morada y PHILIPS CM120 Biofilter con módulo STEM y mapeo elemental y filtrado de imágenes mediante EELS) y electrografiadas en el Servicio de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina (SGIKer; UPV/EHU).

4. Resultados

4.1. Caracterización de aislamientos atípicos de *C. dubliniensis*

En un estudio con 477 aislamientos clínicos que crecieron como colonias verdes en CHROMagar Candida, se identificaron 434 aislamientos como *C. albicans*, 34 como *C. dubliniensis* y 9 aislamientos no identificables inicialmente porque presentaban un perfil dudoso. Estos aislamientos clínicos fueron remitidos desde distintos hospitales españoles como el Carlos Haya, Málaga (56,7%), el 12 de Octubre, Madrid (1,2%) y el Xeral, Vigo (0,4%) y de varias universidades: de Buenos Aires, Argentina (34,1%), del País Vasco (6,3%) y de Parma, Italia (0,4%). A su llegada todos los aislamientos fueron sembrados en un medio convencional y en un medio cromogénico. De esta manera, se identificaron estos nueve aislamientos clínicos que presentaban características diferentes al resto: seis cepas mostraban colonias de color rosa (grupo rosa) en el medio CH-P y los otros tres aislamientos mostraron blastosporas de pequeño tamaño (grupo blp).

En este primer apartado de resultados 4.1.1, se ha llevado a cabo la caracterización e identificación de los 3 aislamientos atípicos del grupo blp (formado por las cepas 98-277, 95-677 y 94-234), mediante diversos métodos fenotípicos, genotípicos e inmunológicos y los resultados con cada método fueron contrastados con las cepas de referencia de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y de *C. albicans* SC 5314.

La caracterización del grupo rosa de aislamientos atípicos (formado por las cepas 08-15, 08-16, 08-17, 08-18, 08-19 y 08-20) se describirá en el apartado 4.1.2, debido a que estos seis presentaban unas características fenotípicas distintas a los tres primeros.

4.1.1 Caracterización de los aislamientos atípicos del grupo blp (98-277, 95-677 y 94-234)

4.1.1.1. Métodos fenotípicos

4.1.1.1.1. Características morfológicas

Se estudiaron las características morfológicas macroscópicas de las colonias desarrolladas en el medio selectivo agar SDA. Las colonias de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y *C. albicans* SC 5314 además de los tres aislamientos atípicos crecieron a 37 °C desarrollando colonias de color blanco-crema con aspecto cremoso y liso. Las blastosporas de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y *C. albicans* SC 5314, observadas al microscopio óptico, presentaron formas ovaladas o redondas con un tamaño medio en torno a las cinco micras, mientras que los aislamientos del grupo blp mostraron un tamaño menor con un tamaño medio 2 x 5 micras y una morfología más ovalada, alargada y estrecha (Figura 4.1).

Estas mismas características morfológicas microscópicas fueron observadas con otros medios de cultivo como el medio agar YEPD o el medio mínimo agar YNB suplementado con glucosa.

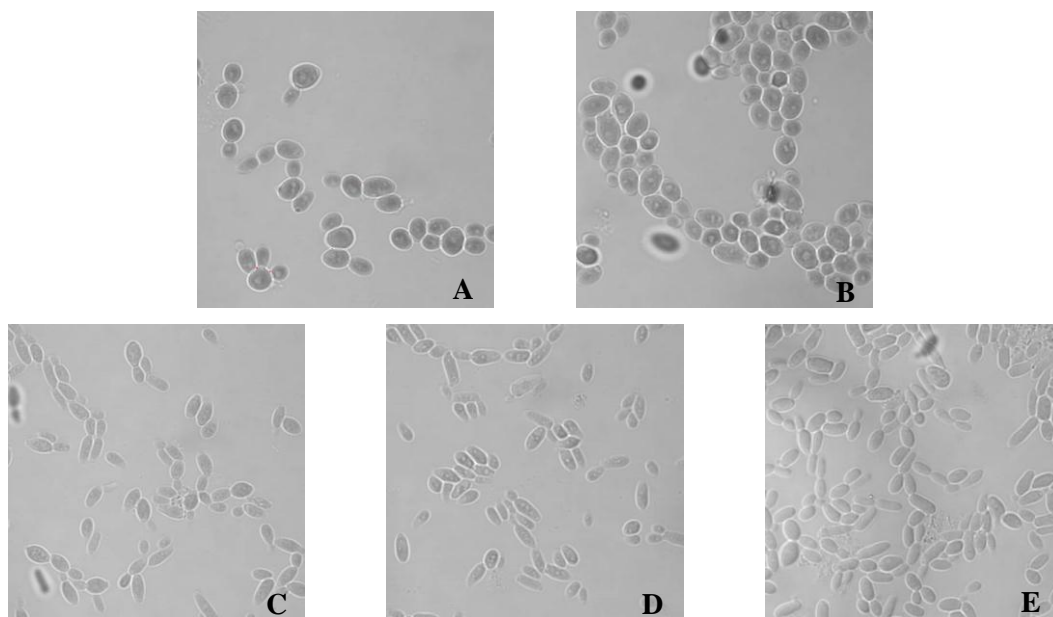


Figura 4.1. Observación microscópica a 600X de las blastosporas desarrolladas en el medio SDA a 37 °C durante 24 h: (A) *C. dubliniensis* (Cd) NCPF 3949, (B) *C. albicans* SC 5314, (C) aislamiento 98-277, (D) aislamiento 95-677 y (E) aislamiento 94-234.

4.1.1.1.2. Producción de tubo germinal

El test de filamentación en suero, para comprobar la producción de tubos germinales, se puede realizar en sueros de diferentes animales como el de caballo, vaca, conejo o cerdo. En nuestro caso se utilizó el suero bovino fetal (SBF) al 10%. El resultado fue positivo para las cepas control de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y *C. albicans* SC 5314, mientras que los tres aislamientos atípicos no mostraron la capacidad de formación de tubo germinal en SBF al 10%.

Puesto que *C. dubliniensis* y *C. albicans* comparten la capacidad de producir tubos germinales, se ensayaron concentraciones crecientes de SBF (50%, 75% y 100%) con el objeto de poder apreciar la formación de tubos germinales en los aislamientos atípicos. El resultado de la prueba fue negativo en los tres aislamientos del grupo blp con todas las concentraciones ensayadas (Tabla 4.1 y Figura 4.2).

Tabla 4.1. Producción de tubo germinal en suero bovino fetal (SBF)

	SC 5314	NCPF 3949	98-277	95-677	94-234
	Ca	Cd			
SBF al 100%	+	+	-	-	-
SBF al 75%	+	+	-	-	-
SBF al 50%	+	+	-	-	-
SBF al 10%	+	+	-	-	-

(+) Positivo; (-) negativo; Ca: *C. albicans*; Cd: *C. dubliniensis*

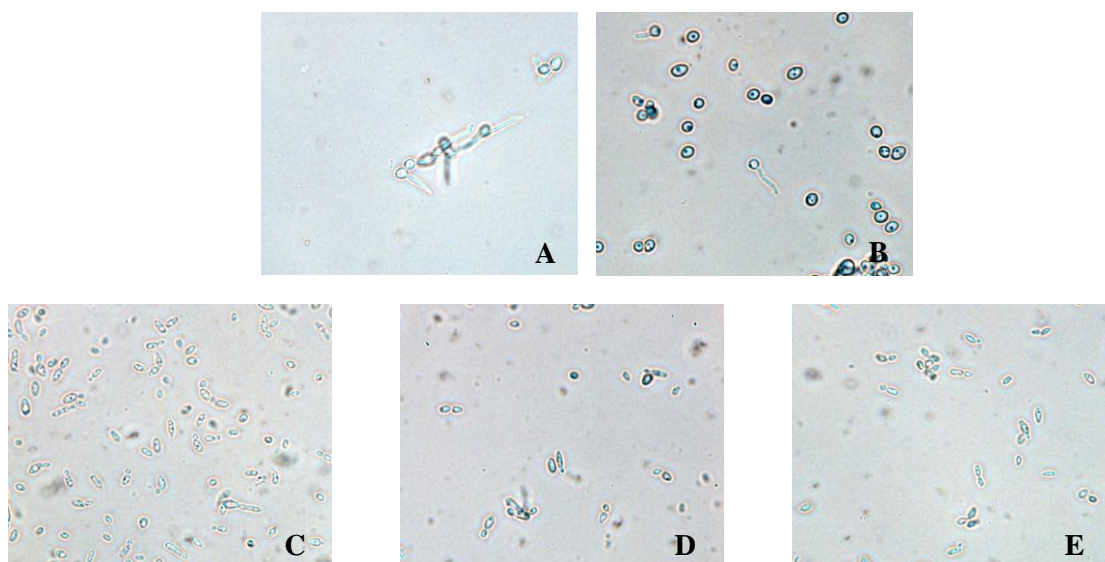


Figura 4.2. Observación microscópica a 400X de la prueba de filamentación en SBF al 100% a 37 °C durante 3 h: (A) *C. dubliniensis* NCPF 3949 y (B) *C. albicans* SC 5314, (C) aislamiento 98-277, (D) aislamiento 95-677 y (E) aislamiento 94-234.

4.1.1.1.3. Capacidad de crecimiento a 45 °C

Tras 48 h de incubación en el medio agar SDA a 45 °C, las colonias de *C. albicans* fueron capaces de crecer a esta temperatura de un modo visible a simple vista, sin embargo tanto *C. dubliniensis* NCPF 3949 como los tres aislamientos atípicos no fueron capaces de crecer a la citada temperatura.

4.1.1.1.4. Producción de clamidosporas

La prueba de producción de clamidosporas se realizó con varios medios que estimulan la formación de clamidosporas en *C. dubliniensis* como el agar Pal, agar Staib, agar caseína y agar de harina de maíz. Las colonias de *C. dubliniensis* NCPF 3949 presentaron un aspecto rugoso y al microscopio se observó la presencia de clamidosporas; por el contrario las colonias de *C. albicans* fueron lisas y no fueron capaces de formar clamidosporas. En el caso de los aislamientos atípicos, presentaron un aspecto liso de las colonias y no formaron clamidosporas (Tabla 4.2 y Figura 4.3).

Otro medio utilizado en la literatura para el estudio de la producción de clamidosporas fue el agar YNB suplementado con galactosa (0,25 g/l) y metionina a una concentración de 25 mg/l⁽⁶⁸⁾. En ausencia de metionina ninguna de las cepas, incluida *C. dubliniensis* NCPF 3949 fueron capaces de producir clamidosporas. A una concentración de metionina de 5 y 10 mg/l, *C. dubliniensis* NCPF 3949 fue capaz de formar clamidosporas, pero en cantidad escasa, mientras que a concentraciones iguales o superiores a 25 mg/l, *C. dubliniensis* NCPF 3949 presentó la capacidad de producir abundantes clamidosporas. Sin embargo, *C. albicans* SC 5314 y los tres aislamientos atípicos no mostraron dicha capacidad de formar clamidosporas con ninguna de las concentraciones de metionina ensayadas (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Capacidad de producción de clamidosporas en diferentes medios.

Medios de cultivo	SC 5314	NCPF 3949	98-277	95-677	94-234
Agar Pal	-	(+)	-	-	-
Agar Staib	-	+	-	-	-
Agar caseína	-	+	-	-	-
Agar de harina de maíz	-	+	-	-	-
Agar YNB-Gal	-	-	-	-	-
Agar YNB-Gal + Met 5 mg/l	-	(+)	-	-	-
Agar YNB-Gal + Met 10 mg/l	-	(+)	-	-	-
Agar YNB-Gal + Met 25 mg/l	-	+	-	-	-
Agar YNB-Gal + Met 50 mg/l	-	+	-	-	-
Agar YNB-Gal + Met 75 mg/l	-	+	-	-	-
Agar YNB-Gal + Met 100 mg/l	-	+	-	-	-

+: Positivo; (+): Producción escasa; -: Negativo

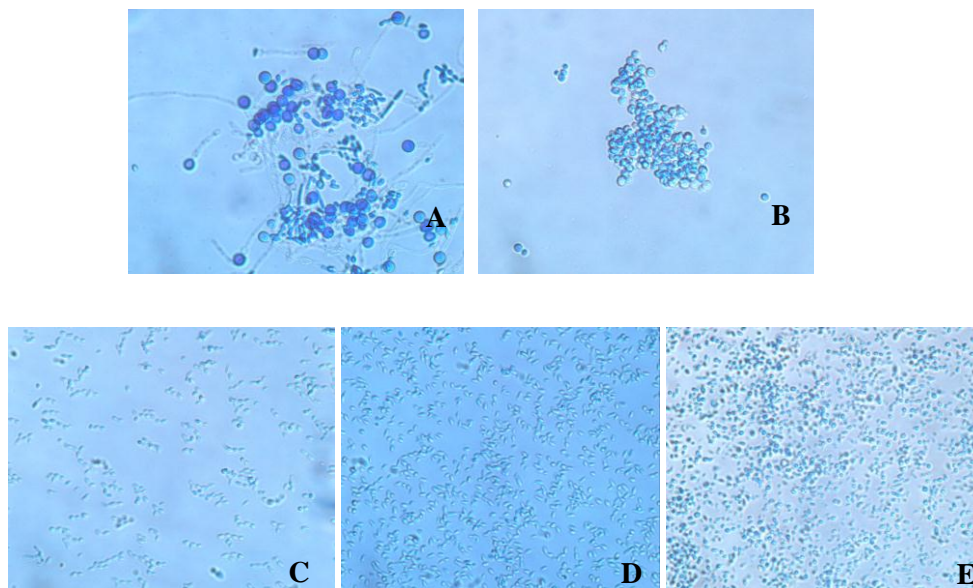


Figura 4.3. Observación microscópica a 400X de las clamidosporas formadas en agar Staib tras 72 h a 30 °C: (A) *C. dubliniensis* NCPF 3949; (B) *C. albicans* SC 5314; (C) aislamiento 98-277; (D) aislamiento 95-677 y (E) aislamiento 94-234.

4.1.1.1.5. Medios cromogénicos

Para el estudio se emplearon los medios cromogénicos CHROMagar Candida (CAC), agar CHROM-Pal (CH-P) y ChromID Candida. El medio CAC es uno de los medios cromogénicos más utilizados en los laboratorios de micología; en este medio, las colonias de *C. dubliniensis* NCPF 3949 se desarrollaron de color verde oscuro, mientras que las colonias de *C. albicans* SC 5314 ofrecieron un color verde claro. Los aislamientos atípicos desarrollaron colonias de color verde oscuro con diferentes tonalidades como se puede apreciar en la figura 4.4.

En el medio agar CH-P⁽²⁹⁹⁾, las colonias de *C. dubliniensis* se desarrollaron de color verde con ciertas tonalidades azul oscura y liso-rugosas, mientras que las colonias de *C. albicans* se mostraron de color verde claro y lisas. Las colonias de los aislamientos atípicos presentaron un aspecto liso con diferentes tonalidades: azul verdosa (98-277), verde rodeado por un halo de color azul (95-677) y verde claro para la cepa 94-234 (Figura 4.4).

En el medio cromogénico ChromID Candida, *C. dubliniensis* NCPF 3949 desarrolló colonias de color azul turquesa al igual que los aislamientos 98-277 y 95-677, mientras que las colonias de *C. albicans* SC 5314 ofrecieron un color azul cobalto. En el caso de la cepa 94-234 las colonias se desarrollaron de un color blanco con cierta tonalidad azulada (Figura 4.4).

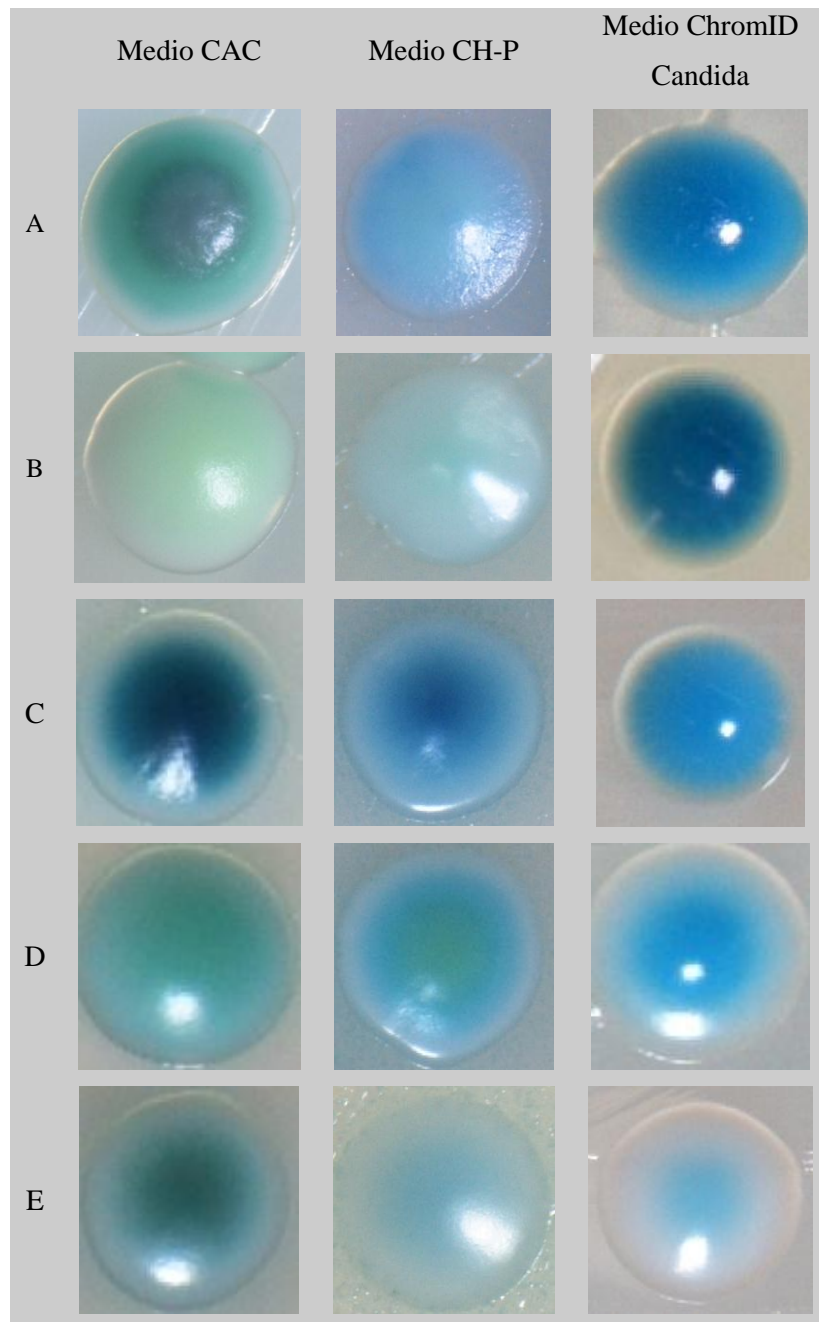


Figura 4.4. Aspecto de las colonias desarrolladas en medio CAC y ChromID Candida a 37 °C durante 48 h y en el medio CH-P a 30 °C durante 72h. (A) *C. dubliniensis* NCPF 3949, (B) *C. albicans* SC 5314, (C) aislamiento 98-277, (D) aislamiento 95-677 y (E) aislamiento 94-234.

4.1.1.1.6. Asimilación de azúcares

Los tres aislamientos atípicos se inocularon en los pocillos de las galerías de API ID 32 C y tras 48h de incubación a 30 °C, la capacidad para aprovechar los diferentes sustratos se detectó con el equipo ATB mini API (bioMérieux) obteniéndose la siguiente identificación (Tabla 4.3):

Tabla 4.3. Perfil de asimilación de azúcares de los tres aislamientos atípicos

	98-277	95-677	94-234
Categoría	perfil dudoso	muy buena identificación	buena identificación en género
Identificación	99,9% similitud con <i>Cd</i>	99,7% similitud con <i>Cd</i>	87,8% similitud con <i>Cd</i>
PERFIL	7142100215	7142140015	7143140015

Cd: *C. dubliniensis*

En el detalle de la asimilación de sustratos carbonados con las galerías API ID32C de la tabla 4.4, se puede apreciar que las cepas atípicas eran incapaces de asimilar metil- α -D-glucósido, ácido láctico, trehalosa (a excepción de la cepa 94-234), ni xilosa, características que permiten diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Tabla 4.4. Detalle de la asimilación de sustratos carbonados con las galerías API ID32C

	Ca	Cd	98-277	95-677	94-234
	SC 5314	NCPF 3949			
Galactosa	+	+	+	+	+
Cicloheximida	+	+	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+	+	+
N-Acetil-Glucosamina	+	+	+	+	+
Ácido láctico	+	-	-	-	-
Ácido Arabinosa	-	-	-	-	-
D-Celobiosa	-	-	-	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	-	-
D-Maltosa	+	+	+	+	+
D-Trehalosa	+	-	-	-	+
2-Cetogluconato potásico	+	+	+	+	+
Metil- α D-	+	-	-	-	-

Glucopiranosido					
D-Manitol	+	+	+	+	+
D-Lactosa	+	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	+	+	+	+
D-Xilosa	-	-	-	-	-
D-Ribosa	+	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-
L-Ramnosa	-	-	-	-	-
Palatinosa	-	-	-	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-
D-Melibiosa	-	-	-	-	-
Glucuronato sódico	-	-	-	-	-
D-Melecitosa	+	-	-	-	-
Gluconato potásico	-	-	+	-	-
Ácido levunílico	-	-	-	-	-
D-Glucosa	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-
Glucosamina	+	+	+	+	+
Esculina	-	-	-	-	-

(+) Positivo; (-) negativo; Ca: *C. albicans*; Cd: *C. dubliniensis*

4.1.1.2. Métodos inmunológicos

4.1.1.2.1. Prueba de Bichro-Dubli Fumouze®

La prueba de Bichro-Dubli Fumouze® se realizó con cepas correspondientes a los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* (NCPF 3949, CBS 2747, 05-199 y 05-200 respectivamente), los aislamientos del grupo blp (98-277, 95-677 y 94-234) y *C. albicans* SC 5314 como control negativo. Los resultados de esta prueba fueron positivos para las cepas de los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* y negativos para *C. albicans* y para los tres aislamientos atípicos (Figura 4.5).

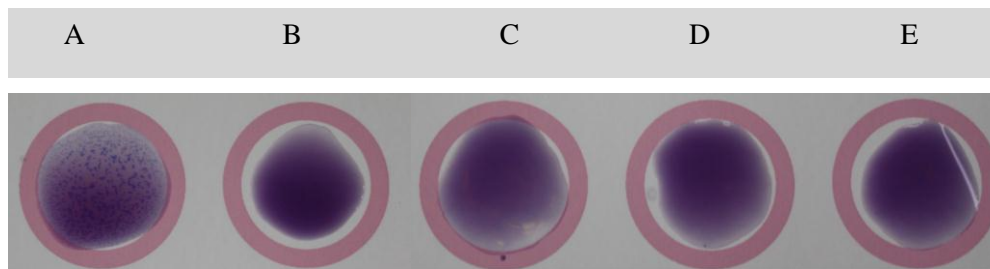


Figura 4.5. Prueba de aglutinación con el test comercial Bichro-Dubli Fumouze[®]: (A) *C. dubliniensis* NCPF 3949 control positivo, (B) *C. albicans* SC 5314 control negativo, (C) aislamiento 98-277, (D) aislamiento 95-677 y (E) aislamiento 94-234.

4.1.1.2.2. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se estudió la reacción del suero policlonal 17814 desarrollado en un conejo infectado con *C. dubliniensis* NCPF 3949 y del AcM 12F7-F2 (anticuerpo específico de Bichro-Dubli) con las cepas correspondientes a los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* (NCPF 3949, CBS 2747, 05-199 y 05-200 respectivamente), con *C. albicans* SC 5314 y con los tres aislamientos atípicos (98-277, 95-677, 94-234).

La reacción con el AcM 12F7-F2 fue positiva con las cepas correspondientes a los cuatro genotipos de *C. dubliniensis*, por el contrario, no se observó reacción con *C. albicans* SC 5314 ni con las cepas atípicas 98-277, 95-677 y 94-234 (Figura 4.6). Sin embargo, la reacción con el suero policlonal 17814 fue positiva con las cepas correspondientes a los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* y con los tres aislamientos atípicos (Figura 4.7), mientras que fue negativa con *C. albicans* SC 5314.

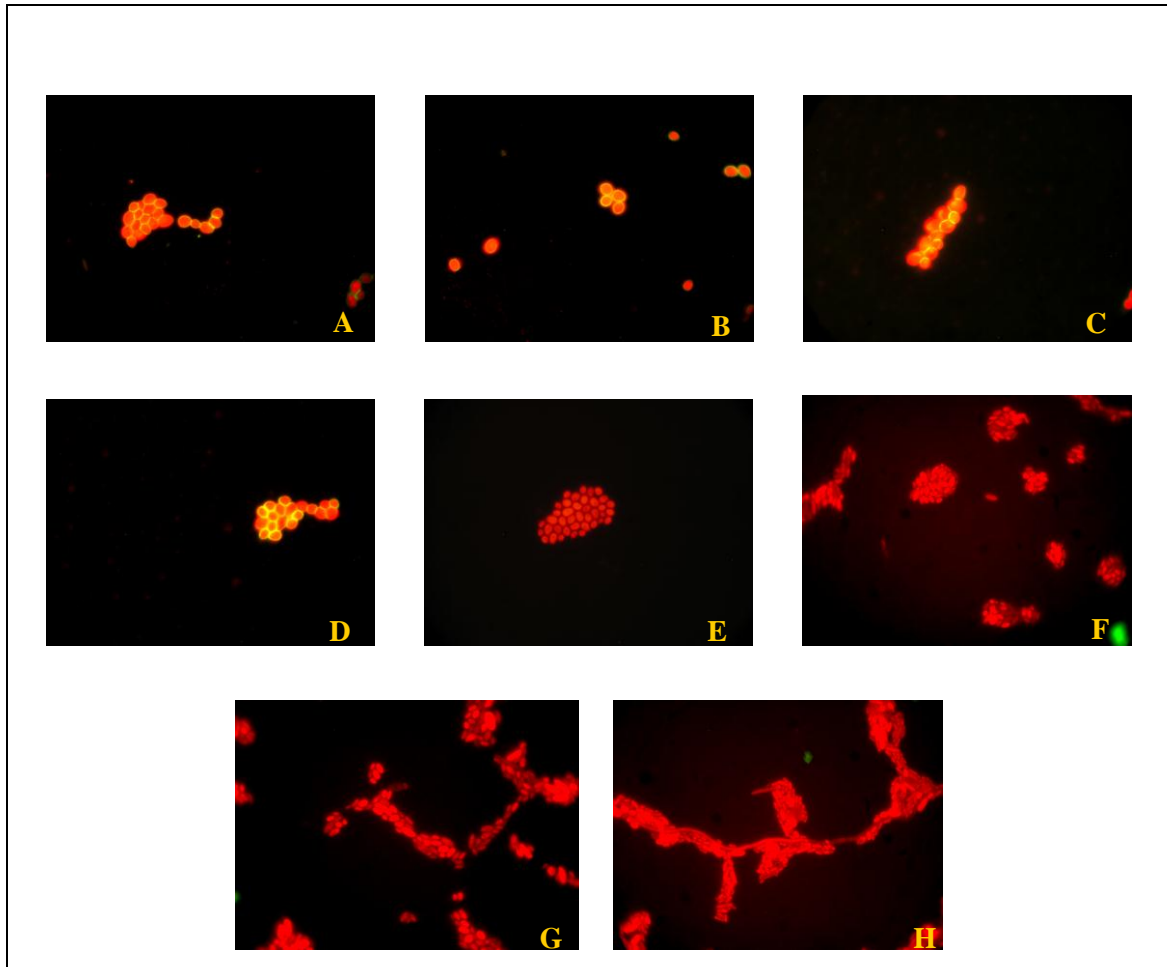


Figura 4.6. Reacción del AcM 12F7-F2 mediante IFI con los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* (A) G1 NCPF 3949, (B) G2 CBS 2747, (C) G3 05-199 (D) y G4 05-200; (E) *C. albicans* SC 5314, (F) aislamiento 98-277, (G) aislamiento 95-677 y (H) aislamiento 94-234. (400x).

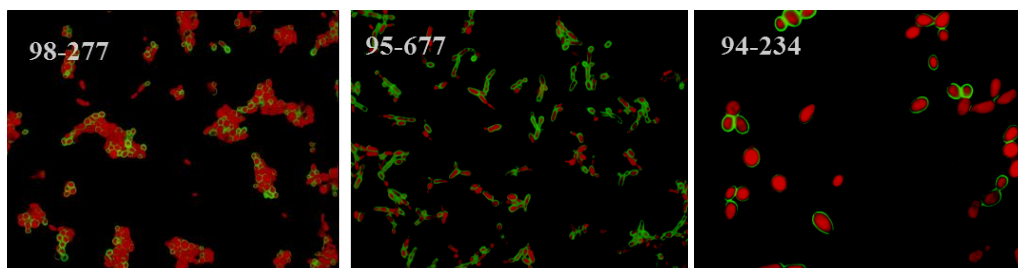


Figura 4.7. Reacción con suero policlonal 17814 mediante IFI con las cepas 98-277 (100x), 95-677 (100x) y 94-234 (400x).

4.1.1.3. Métodos genotípicos

4.1.1.3.1. PCR

Se utilizó la PCR múltiple que permite identificar aislamientos de *C. albicans* y de *C. dubliniensis* simultáneamente mediante dos pares de cebadores específicos para cada especie; los cebadores CALB1 F y CALB2 R⁽¹⁷⁴⁾ amplifican una banda de 273 pb para *C. albicans*, mientras que los cebadores CDBF28 F y CDBR110 R⁽¹⁴⁵⁾ amplifican una banda de 816 pb para *C. dubliniensis*. El producto de PCR amplificado con cada uno de los tres aislamientos atípicos mostró correspondencia con una banda de 816 pb esperada para *C. dubliniensis* (Figura 4.8).

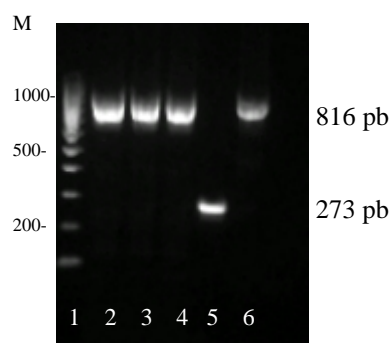


Figura 4.8. Producto de PCR con los cebadores específicos CALB1 F, CALB2 R, CDBF28 F y CDBR110 R. Calle 1: Marcador hyperladder IV (Bioline). Calle 2, 3 ,4: Aislamientos 98-277, 95-677 y 94-234 de *C. dubliniensis*; calle 5: *C. albicans* SC 5314 y calle 6: *C. dubliniensis* NCPF 3949.

La identificación de los aislamientos atípicos como *C. dubliniensis* también se pudo comprobar utilizando una única pareja de cebadores: CRR f y CRR r⁽²⁷³⁾ que permiten diferenciar entre *C. africana* (700 pb), *C. albicans* (941 pb) y *C. dubliniensis* (569 pb) por el tamaño de los amplicones. En nuestro caso el producto de PCR amplificado de los aislamientos del grupo blp mostró correspondencia con una banda de 569 pb esperada para *C. dubliniensis* (Figura 4.9).

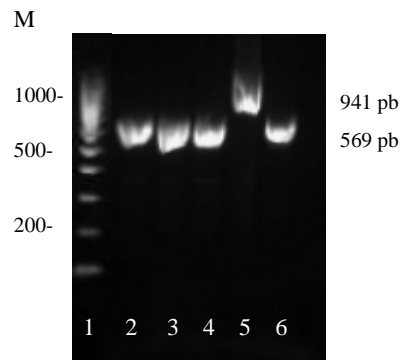


Figura 4.9. Producto de PCR con los cebadores específicos CRR f y CRR r. Calle 1: Marcador hyperladder IV. Calle 2, 3 ,4: Aislamientos 98-277, 95-677 y 94-234 de *C. dubliniensis*; calle 5: *C. albicans* SC 5314 y calle 6: *C. dubliniensis* NCPF 3949.

4.1.1.3.2. Determinación del genotipo de *C. dubliniensis*

Se determinó el genotipo para los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* (98-277, 95-677 y 94-234) y se tomó como controles las cepas correspondientes a los genotipos de *C. dubliniensis*. La reacción de amplificación se realizó con cada una de las parejas de cebadores específicos para cada genotipo: G1F/G1R, G2F/G2R, G3F/G3R y G4F/G4R⁽¹⁰²⁾ obteniéndose en el caso de resultar positiva un fragmento de aproximadamente 330 pb (Figura 4.10). Los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis*, amplificaron sólo con los cebadores G1F/G1R un producto de 330 pb, correspondiéndose con el genotipo 1 de *C. dubliniensis*.

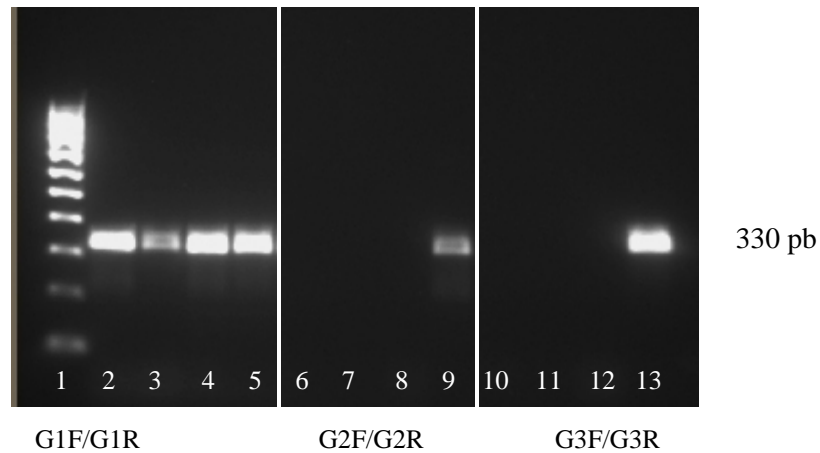


Figura 4.10. Productos de la reacción de amplificación de los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* (98-277, 95-677 y 94-234) con la pareja de iniciadores G1F/G1R. Calle 1: Marcador hyperladder IV; calle 2: aislamiento 98-277; calle 3: aislamiento 95-677; calle 4: aislamiento 94-234; calle 5: cepa NCPF 3949; calle 9: cepa CBS 2747 y calle 13: cepa 05-199.

4.1.1.3.3. Tipo de apareamiento de *C. dubliniensis*

Se estudió el tipo de locus de *MTL* (*Mating Type Like*) de *C. dubliniensis* mediante PCR múltiple con los cebadores *MTLa1-F* y *MTLa1-R*⁽²⁷⁸⁾ que amplifican un fragmento de 535 pb, y *MTL α 2-F* y *MTL α 2-R*⁽²⁷⁸⁾ que amplifican un fragmento de 615 pb. La prueba se realizó con las cepas correspondientes a los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* (NCPF 3949, CBS 2747, 05-199 y 05-200 respectivamente) y los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* (98-277, 95-677, 94-234). En nuestro caso, los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* presentaron un locus *MTL* heterocigótico tipo *aa* al igual que las cepas de referencia de los genotipos 1 y 2 de *C. dubliniensis*, mientras que el genotipo 3 mostró un locus *MTL* homocigótico tipo *aa* y la cepa del genotipo 4 homocigótico *aa* (Figura 4.11).

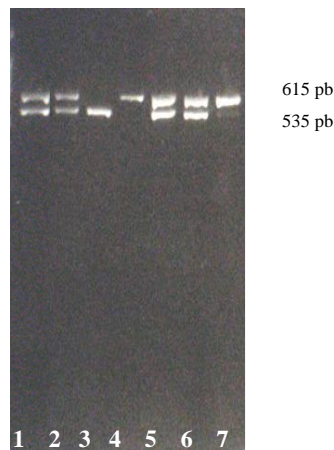


Figura 4.11. Productos de PCR con los cebadores específicos para determinar el tipo de locus de *MTL* de las diferentes cepas de *C. dubliniensis*. Calle 1: cepa NCPF 3949; calle 2: cepa CBS 2747; calle 3: cepa 05-199; calle 4: cepa 05-200; calle 5: aislamiento 98-277; calle 6: aislamiento 95-677 y calle 7: aislamiento 94-234.

4.1.1.3.4. Secuenciación de la región D1-D2 de los aislamientos de *C. dubliniensis*

Los productos de PCR de la región D1-D2 obtenidos con los cebadores universales NL1 y NL4⁽¹⁶⁰⁾ a partir de los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* se secuenciaron en el servicio de Genómica de la UPV/EHU.

Las secuencias obtenidas con cada uno de los aislamientos fueron analizadas con el programa informático Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Figura 4.12). La comparación de las secuencias en la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) dio como resultado que la cepa 94-234 presentaba un 98% de similitud con *C. dubliniensis*, mientras que las cepas 95-677 y 98-277 (Figura 4.13) presentaron un 99% de similitud con *C. dubliniensis*.

4.1.1.4. Sensibilidad a antifúngicos *in vitro*: Sensititre YeastOne YO8

Se estudió la sensibilidad *in vitro* a ocho antifúngicos mediante el método comercial Sensititre YeastOne YO 8. De acuerdo con los puntos de corte recomendados en el protocolo M27-A3 y el suplemento M27-S3 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; EE.UU.) ^(62,63), los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* fueron sensibles a los ocho antifúngicos. Los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* presentaron una mayor sensibilidad frente a la anfotericina B y en algún caso al fluconazol en comparación con los datos obtenidos para la cepa de referencia *C. dubliniensis* NCPF 3949 (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. CMI ($\mu\text{g/ml}$) obtenida para los distintos antifúngicos con el método comercial Sensititre YeastOne YO8

Cepa	Antifúngicos							
	FCZ	ITZ	VCZ	PCZ	KTZ	AMB	5-FC	CAS
94-234	1	$\leq 0,008$	0,03	0,03	$\leq 0,008$	0,128	0,06	0,125
95-677	0,25	0,016	0,016	0,016	0,016	0,06	0,125	0,25
98-277	0,5	0,06	$\leq 0,008$	0,016	0,016	0,128	0,06	0,125
NCPF 3949	1	0,016	0,016	0,016	0,016	1	$\leq 0,03$	0,125

4.1.2. Caracterización de los seis aislamientos atípicos del grupo rosa

Como ya se ha avanzado en el apartado 4.1, el estudio de los 477 aislamientos clínicos reveló la presencia de otro grupo de cepas atípicas, al que denominamos grupo rosa. La caracterización e identificación de estos seis aislamientos clínicos del grupo rosa se llevó a cabo mediante los mismos métodos descritos en el apartado 4.1.

Los resultados obtenidos mediante los métodos fenotípicos se resumen en la tabla 4.6.1. De este modo, los seis aislamientos fueron incapaces de crecer a 45 °C y en los medios cromogénicos CAC y CH-P desarrollaron colonias de color rosa y de color blanco en el medio ChromID (Figura 4.14). Por otra parte, fueron capaces de formar clamidosporas en varios medios que estimulan la formación de clamidosporas en *C. dubliniensis* y la asimilación de fuentes carbonadas indicó que se correspondían con cepas de *C. dubliniensis*.

Los resultados obtenidos por métodos inmunológicos y genotípicos se resumen en las tablas 4.6.2 y 4.6.3. Los aislamientos del grupo rosa reaccionaron por aglutinación con el AcM 12F7-F2 del test Bichro-Dubli Fumouze® específico para *C. dubliniensis* (Figura 4.15) y además mediante PCR se identificaron como aislamientos de *C. dubliniensis*. Los métodos genotípicos determinaron que pertenecían al genotipo 2 y que presentaban un locus *MTL* heterocigótico tipo *aa*.

La prueba de sensibilidad a los antifúngicos realizada con el método comercial Sensititre YeastOne YO8 reveló que los 6 aislamientos del grupo rosa presentaban una sensibilidad disminuida a la anfotericina B con respecto a la cepa de referencia del genotipo 2 de *C. dubliniensis* (tabla 4.6.4).

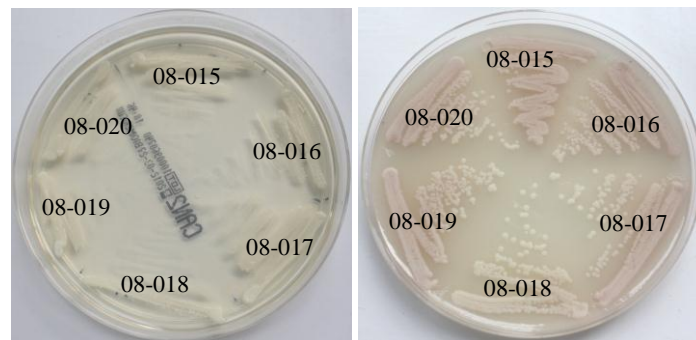


Figura 4.14. Colonias de las seis cepas atípicas de *C. dubliniensis* del grupo rosa desarrolladas en los medios ChromID Candida y CH-P tras 48h a 37 °C y 30°C respectivamente.

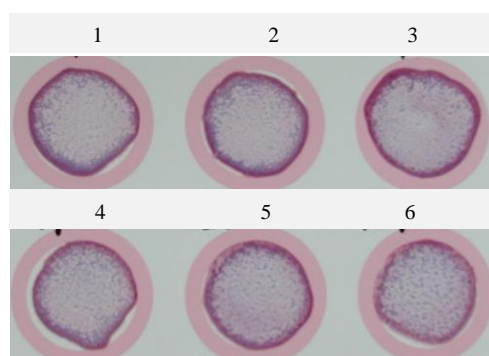


Figura 4.15. Prueba de aglutinación con el test Bichro-Dubli Fumouze: (1) cepa 08-015, (2) cepa 08-016, (3) cepa 08-017, (4) cepa 08-018, (5) cepa 08-019 y (6) cepa 08-020.

Tabla 4.6.1. Resumen de las características fenotípicas de los 6 aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* del grupo rosa en relación con la cepa de referencia del genotipo 2 CBS 2747.

Pruebas fenotípicas	08-015	08-016	08-017	08-018	08-019	08-020	CBS 2747
Tubo germinal	+	+	+	+	+	+	+
Crecim. 45 °C	-	-	-	-	-	-	-
CAC	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	verde oscuro
CH-P	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	verde azulado
ChromID Candida	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	azul turquesa
Formación clamidosp. Pal	+	+	+	+	+	+	+
Formación clamidosp. Staib	+	+	+	+	+	+	+
Formación clamidosp. harina maíz	+	+	+	+	+	+	+
Formación clamidosp. caseína	+	+	+	+	+	+	+
ID32C	7342140015	7342140015	7342140015	7342140015	7342140015	7342140015	7345340115

+: Positivo; (+) Producción escasa; -: Negativo

Tabla 4.6.2. Resumen de las características inmunológicas de los 6 aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* del grupo rosa en relación con la cepa de referencia del genotipo 2 CBS 2747.

Pruebas inmunológicas	08-015	08-016	08-017	08-018	08-019	08-020	CBS 2747
Bichro-Dubli	+	+	+	+	+	+	+
IFI (12F7-F2)	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 4.6.3. Resumen de las características genotípicas de los 6 aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* del grupo rosa en relación con la cepa de referencia del genotipo 2 CBS 2747.

Pruebas genotípicas	08-015	08-016	08-017	08-018	08-019	08-020	CBS 2747
Secuenciación (D1/D2)	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
PCR (CDBF28F/CDBR110 R)	809 pb	809 pb	809 pb	809 pb	809 pb	809 pb	809 pb
PCR (CRf/CRr)	569 pb	569 pb	569 pb	569 pb	569 pb	569 pb	569 pb
Genotipo	2	2	2	2	2	2	2
MTL	αα	αα	αα	αα	αα	αα	αα

Tabla 4.6.4. Resumen de sensibilidad a los antifúngicos de los 6 aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* del grupo rosa en relación con la cepa de referencia del genotipo 2 CBS 2747.

Prueba Sensititre YO8	08-015	08-016	08-017	08-018	08-019	08-020	CBS 2747
FCZ	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5
ITZ	0,032	0,032	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064
VCZ	≤0,008	≤0,008	≤0,008	≤0,008	0,016	≤0,008	≤0,008
PCZ	0,016	0,016	0,032	0,032	0,032	0,064	ND
KTZ	≤0,008	≤0,008	≤0,008	≤0,008	≤0,008	≤0,008	≤0,008
AMB	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,064
5-FC	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,06
CAS	0,125	0,25	0,125	0,25	0,125	0,125	ND

ND: No definido

4.2. Estudio mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de la expresión de ocho genes asociados con la formación de clamidosporas

La incapacidad para producir clamidosporas de las cepas atípicas 98-277, 95-677 y 94-234 en distintos medios de esporulación con respecto a la cepa control de *C. dubliniensis*, nos llevó a estudiar la expresión de ocho genes que han sido relacionados previamente con la formación de clamidosporas en *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Este análisis se realizó mediante la técnica de qRT-PCR en las tres cepas atípicas de *C. dubliniensis*, empleando como controles dos cepas del genotipo 1 de *C. dubliniensis* (NCPF 3949 y CBS 8501).

El ARN se aisló de levaduras desarrolladas en medio SDA, mientras que para la formación de clamidosporas se empleó YNB suplementado con galactosa y metionina (25 mg/l). El cálculo de la expresión génica relativa se realizó comparando el nivel de expresión del gen objeto de estudio con el del gen constitutivo *ACT1* cuya expresión no varía en las condiciones del experimento, utilizando el método descrito por Schmittgen y Livak⁽²⁹⁹⁾, y los valores obtenidos con cada uno de los genes se representaron en un diagrama de barras.

Los resultados obtenidos para el gen *NRG1* se representan en la figura 4.16. Uno de los controles de *C. dubliniensis* (CBS 8501) mostró una considerable disminución del nivel de expresión en la forma de clamidospora respecto al nivel encontrado en la levadura. En cambio, la otra cepa control NCPF 3949 no presentó variaciones en los niveles de expresión. Las tres cepas atípicas presentaron un comportamiento común similar al observado en la cepa de referencia CBS 8501.

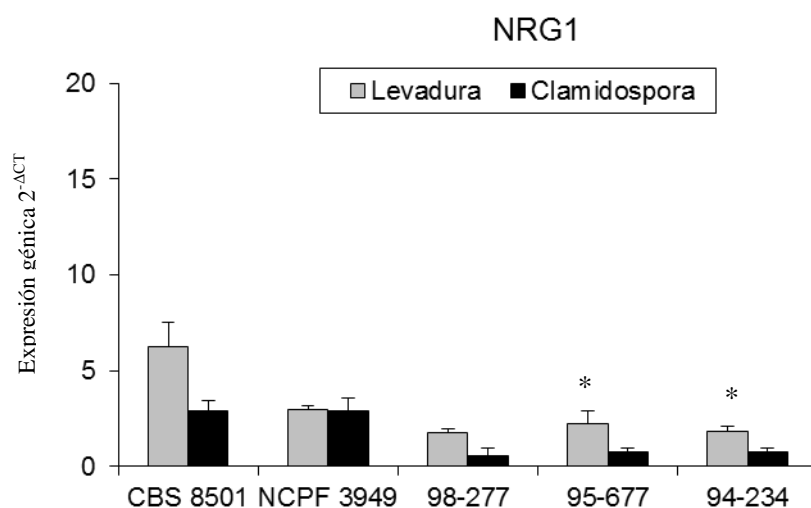


Figura 4.16. Expresión del gen *NRG1*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas. (*) $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión entre las dos formas morfológicas.

En la figura 4.17 se muestra los resultados de expresión del gen *OLE1*. Mientras que la cepa control de *C. dubliniensis* CBS 8501 apenas mostró variaciones en la expresión, la otra cepa de referencia NCPF 3949 presentó un incremento en la expresión de este gen en la forma de clamidospora respecto a la levaduriforme. Las cepas atípicas 98-277 y 95-677 presentaron un perfil de expresión similar a la cepa de referencia NCPF 3949, sin embargo, la otra cepa atípica (94-234) presentó un patrón invertido, en el que los niveles de expresión más bajos se observaron en condiciones de formación de clamidosporas.

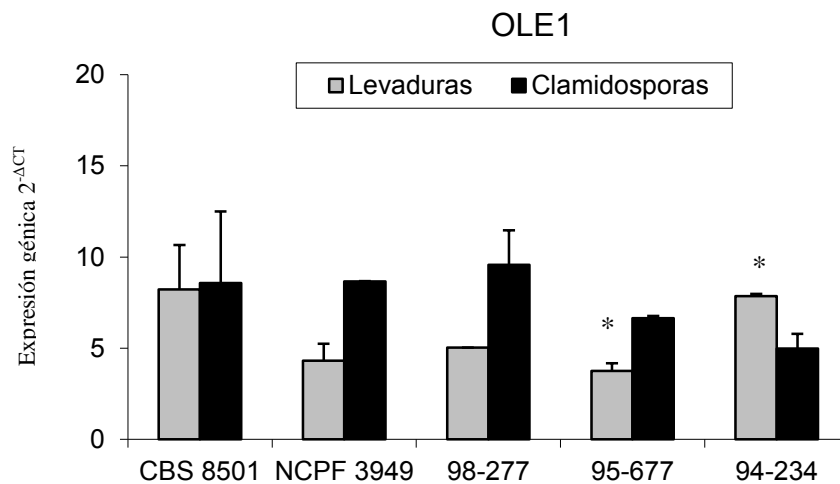


Figura 4.17. Expresión del gen *OLE1*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas. (*) $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión entre las dos formas morfológicas.

Los resultados de expresión para el gen *EFG1* se representan en la figura 4.18. Tanto en las cepas de referencia como en las atípicas, en condiciones de esporulación los niveles de expresión de este gen mostraron incrementos moderados respecto a las levaduras. No obstante, cabe destacar que los niveles de expresión de la cepa atípica 94-234 fueron considerablemente inferiores respecto al resto de las cepas.

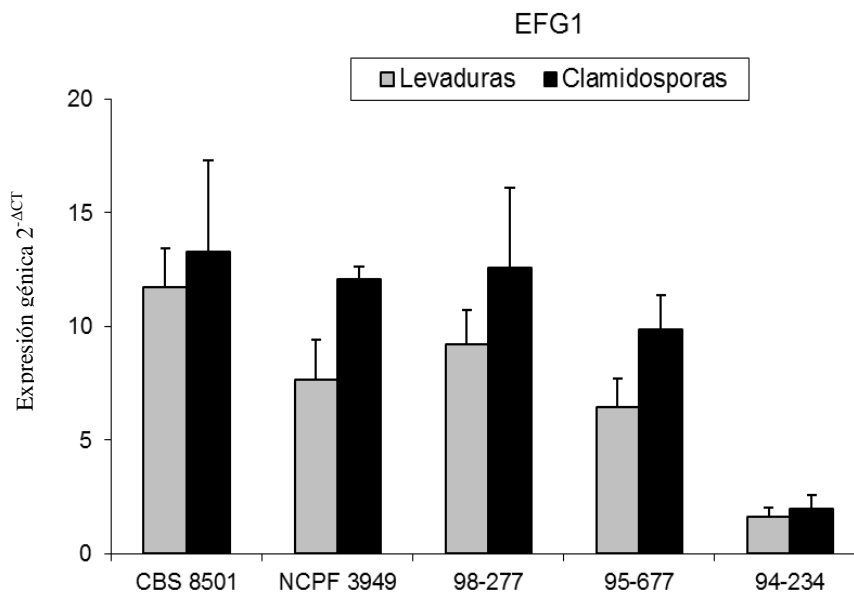


Figura 4.18. Expresión del gen *EFG1*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas.

El nivel de expresión de los genes *HOG1*, *RIM13*, *SUV3*, *ISW2* y *SCH9* fue muy inferior con respecto a los genes *NRG1*, *OLE1* y *EFG1* por lo que los resultados se han representado a menor escala para poder apreciar las variaciones de expresión.

En la figura 4.19 se muestran los resultados del gen *HOG1*. La cepa control de *C. dubliniensis* CBS 8501 mostró un incremento en el nivel de expresión de este gen en la forma de clamidospora respecto a la levadura, sin embargo, la otra cepa de referencia no presentó variaciones en los niveles de expresión. Por el contrario, las cepas atípicas 98-277 y 95-677 presentaron un patrón de expresión invertido respecto a la cepa de referencia CBS 8501, siendo sus niveles de expresión en condiciones de esporulación significativamente más bajos. El perfil de expresión de la cepa 94-234 fue similar al de la cepa control NCPF 3949.

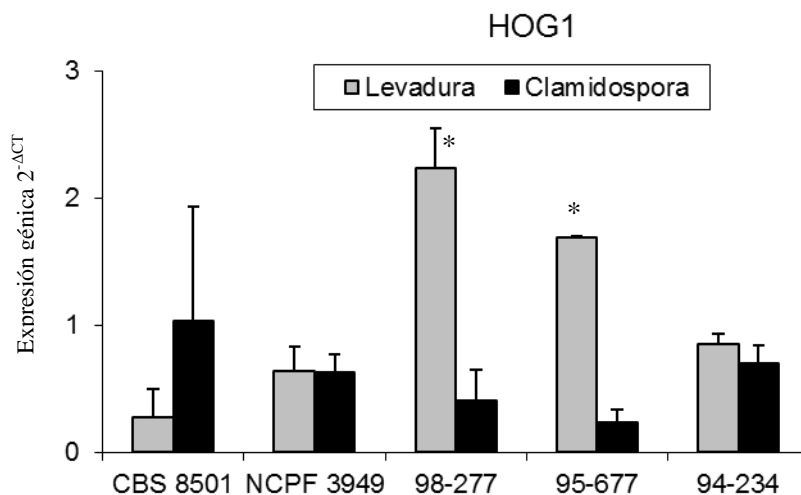


Figura 4.19. Expresión del gen *HOG1*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas. (*) $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión entre las dos formas morfológicas.

Como se muestra en la figura 4.20, el nivel de expresión que detectamos de la cepa CBS 8501 presentó un aumento en la forma de clamidospora respecto a la levadura. En cambio, los niveles detectados en la cepa NCPF 3949 fueron poco significativos. Por el contrario, las cepas atípicas presentaron un perfil invertido, con reducciones considerables de la expresión del gen *RIM13* en condiciones de formación de clamidosporas.

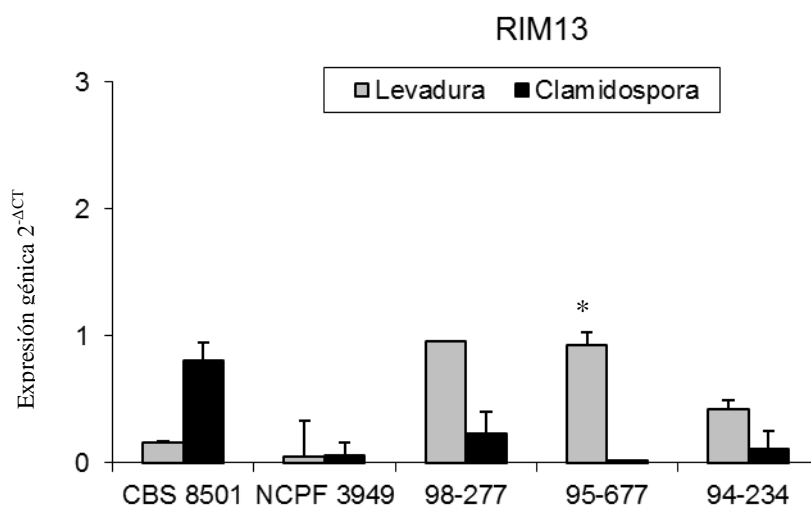


Figura 4.20. Expresión del gen *RIM13*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas. (*) $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión entre las dos formas morfológicas.

Los resultados obtenidos para el gen *SUV3* se representan en la figura 4.21. Las dos cepas de referencia de *C. dubliniensis* presentaron un incremento similar de los niveles de expresión en la forma de clamidospora respecto a la levadura. Sin embargo, las tres cepas atípicas mostraron un comportamiento inverso, con niveles de expresión reducidos en condiciones de formación de clamidosporas.

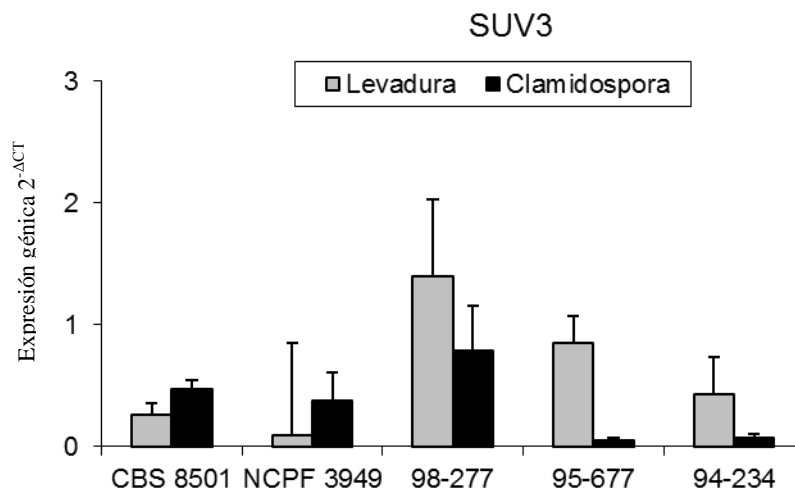


Figura 4.21. Expresión del gen *SUV3*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas.

En la figura 4.22 se muestran los resultados obtenidos del nivel de expresión del gen *ISW2*. En la cepa control CBS 8501 observamos un leve aumento en la forma de clamidospora respecto al nivel levaduriforme, sin embargo, la otra cepa de referencia NCPF 3949 presentó una reducción de los niveles de expresión en la forma de clamidospora respecto a la levadura. Las cepas atípicas presentaron un comportamiento común semejante a la cepa control NCPF 3949, siendo la reducción más acusada en la cepa 95-677.

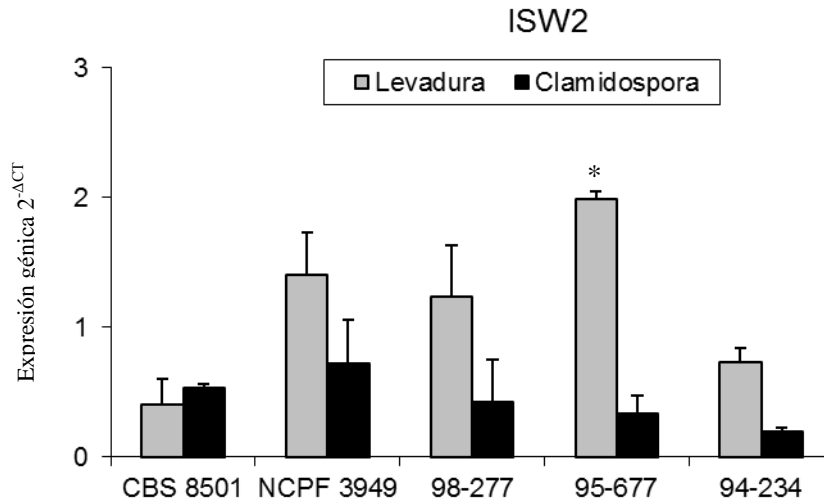


Figura 4.22. Expresión del gen *ISW2*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas. (*) $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión entre las dos formas morfológicas.

Como se muestra en la figura 4.23, en la cepa control CBS 8501 no observamos variaciones en la expresión del gen *SCH9*. En cambio, la otra cepa de referencia, NCPF 3949 presentó una reducción del nivel de expresión de este gen en la forma de clamidospora respecto a la levadura. Las cepas atípicas presentaron un comportamiento común similar al observado en la cepa control NCPF 3949.

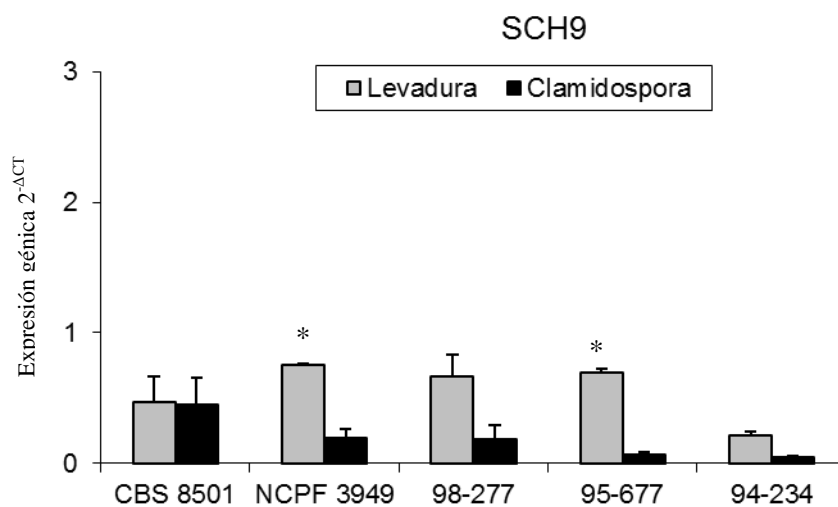


Figura 4.23. Expresión del gen *SCH9*. Barras de color gris, cepas crecidas en forma levaduriforme y barras de color negro, cepas crecidas en condiciones de formación de clamidosporas. (*) $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión entre las dos formas morfológicas.

4.3. Identificación de un antígeno reconocido por el AcM 12F7-F2

La ausencia de reacción de las cepas atípicas de *C. dubliniensis* 98-277, 95-677 y 94-234 con el AcM 12F7-F2 nos llevó a identificar el componente específico de *C. dubliniensis* que reaccionaba con el AcM 12F7-F2. Con esta finalidad se realizaron extractos DTT de la pared de las cepas de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y las atípicas de 98-277, 95-677 y 94-234.

Estos extractos DTT se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes según el método de Laemmli ⁽¹⁶³⁾ y tras finalizar la electroforesis, se realizó una electrotransferencia a membranas de PVDF. Se efectuó una inmunodetección con el AcM 12F7-F2 y se observó que éste AcM reconocía un componente de alto peso molecular (> 200 kDa) en *C. dubliniensis* NCPF 3949 y otro componente de 50 kDa tanto en la cepa de *C. dubliniensis* NCPF 3949 como en las cepas atípicas de *C. dubliniensis* (Figura 4.24).

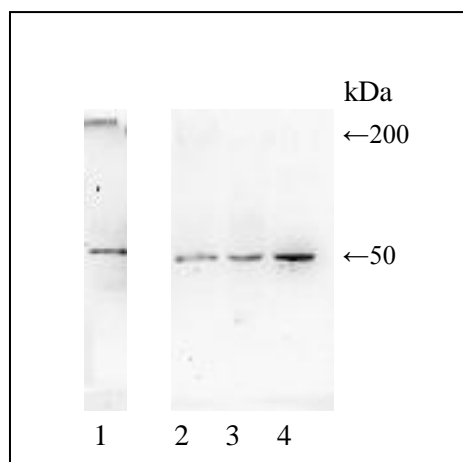


Figura 4.24. Inmunodetección con el AcM 12F7-F2 de los extractos DTT de pared de levaduras de *C. dubliniensis*: (1) NCPF 3949, (2) 98-277, (3) 95-677 y (4) 94-234.

4.3.1. Caracterización del componente proteico de la pared de alto peso molecular (>200 kDa)

4.3.1.1. Electroelución del componente de >200 kDa

A partir de extractos DTT de pared celular separados en geles SDS-PAGE, se procedió al aislamiento del componente de >200 kDa mediante electroelución. Por inmunodetección, se comprobó que la fracción seleccionada reaccionaba intensamente con el AcM 12F7-F2 (Figura 4.25).

Debido a la dificultad para secuenciar la fracción proteica como consecuencia de su elevado contenido en glúcidos (Figura 4.25), se procedió a la desglicosilación del componente de alto peso molecular.

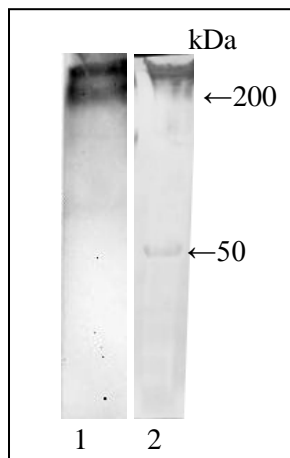


Figura 4.25. Reacción con concanavalina A (1) y con el AcM 12F7-F2 (2) del componente de >200 kDa de la cepa NCPF 3949.

4.3.1.2. Tratamientos enzimáticos: desglicosilación

La desglicosilación parcial de la fracción proteica de 200 kDa con la enzima N-Glicosidasa F, puso de manifiesto una banda de 90 kDa que mantenía su intensa reacción con el AcM 12F7-F2 (Figura 4.26). Esta banda se escindió de un gel SDS-PAGE teñido con Colloidal Coomassie[®] para su posterior secuenciación.

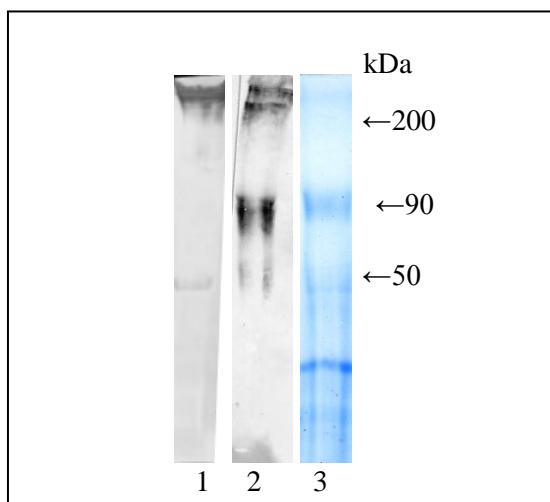


Figura 4.26. (1) Reacción del componente de 200 kDa sin desglicosilar y (2) desglicosilado con el AcM 12F7-F2. (3) Tinción con Colloidal Coomassie[®] de la fracción desglicosilada.

4.3.2. Secuenciación del componente de 90 kDa

La fracción proteica de 90 kDa fue sometida a un proceso de digestión con tripsina obteniéndose varios fragmentos peptídicos. El análisis de los péptidos resultantes se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

La búsqueda de homologías se realizó con el programa informático MASCOT diseñado por Perkins y cols. ⁽²⁴²⁾. El sistema informático MASCOT lleva incorporado un algoritmo de búsqueda denominado MOWSE, para la comparación de los listados de masas medidos con MALDI-TOF con las masas de los péptidos de digestiones teóricas de proteínas recogidas en las bases de datos NCBI, SWISS-PROT y TIGR. El programa genera una lista priorizada que incluye aquellas proteínas que presentan una mayor probabilidad de correspondencia con la identidad de la proteína analizada.

El análisis de los péptidos obtenidos a partir de la banda de 90 kDa determinó que dicha proteína se correspondía con la Metionina sintasa independiente de cobalamina (Met6) de *C. dubliniensis*, con una masa molecular de casi 90 kDa, una puntuación de 352 y un 40% de cobertura de la proteína (Tabla 4.7). En la tabla 4.8 se muestran los péptidos secuenciados para la identificación de dicha proteína.

Tabla 4.7. Análisis de secuenciación de la proteína de 90 kDa

N° de acceso	Masa	Score	Descripción
gi 223645097	86277	352	Metionina sintasa independiente de cobalamina [<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949]
gi 68475194	85763	291	Metionina sintasa independiente de cobalamina [<i>C. albicans</i> SC5314]
gi 149246429	85831	254	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase [<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239]
gi 50406606	86145	187	Hypothetical protein DEHA0A07524g [<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767]
gi 146420955	85853	179	Conserved hypothetical protein [<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260]
gi 223640785	47204	133	Enolase (1), putative [<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949]
gi 37078092	47111	126	Enolase;Allergen=Rho m 1
gi 149247418	47123	126	Enolase [<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239]
gi 126136489	85640	121	Methionine-synthesizing 5- methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [<i>Pichia stipitis</i> CBS 6054]
gi 50427089	47210	121	Hypothetical protein DEHA0G14927g [<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767]
gi 247626	3618	120	46 kda IgE-binding antigen [<i>C. albicans</i>]
gi 68488457	47202	117	Hypothetical protein CaO19.8025 [<i>C. albicans</i> SC5314]
gi 146415384	46951	116	Enolase 1 [<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260]
gi 223644020	56950	108	Chitinase precursor [<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949]
gi 47132400	86027	100	Methionine synthase [<i>Pichia pastoris</i>]
gi 88910027	86024	95	Methionine synthase [<i>S. cerevisiae</i>]
gi 6320936	85978	90	Cobalamin-independent methionine synthase, involved in amino acid biosynthesis[<i>S. cerevisiae</i>]
gi 609350	86063	90	Methionine synthase
gi 88910021	85979	90	Methionine synthase [<i>S. cerevisiae</i>]
gi 151944808	85948	90	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate homocysteine methyltransferase [<i>S. cerevisiae</i> YJM789]

Tabla 4.8. Secuencia de los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina para la identificación de la Met6p de *C. dubliniensis*

Observado	Mr(esp)	Mr(calc)	Empieza	Acaba	Péptido
1054.5332	1053.5259	1053.5131	21	29	K.ITEAYWSGK.A
1089.5939	1088.5866	1088.5979	2	11	M.VQSSVLGFPR.I
1173.6543	1172.6470	1172.6587	567	577	K.GMLTGPVTILR.W
1190.6066	1189.5993	1189.6455	713	722	R.IPSKQEFVSR.I
1195.7399	1194.7326	1194.7448	589	599	K.IQALQLGLALR.D
1235.5765	1234.5692	1234.5805	735	744	K.FWVNPDCGLK.T
1439.7919	1438.7846	1438.7919	183	195	K.DSLDLEPISLLPK.I
1457.6688	1456.6615	1456.6735	633	644	R.SDYLNWAAQSFR.V
1580.7953	1579.7880	1579.8069	86	99	K.FDLAPIDVLFAMGR.G
1642.7755	1641.7682	1641.7886	467	480	K.GQITAEYETFK.E
1695.9714	1694.9641	1694.9832	533	547	R.YVRPPIVGDVSRPK.A
1860.9243	1859.9170	1859.9265	142	158	K.LNTDAGIKPVDEFNEAK.A
1920.9276	1919.9203	1919.9874	104	121	K.KATETQAAVDVTALEMVK.W
1966.9705	1965.9632	1965.9796	488	504	R.FQEEIGLDVLVHGEPER.N
2025.0450	2024.0377	2024.0619	438	455	K.YNLPLFPTTTIGSFPQTK.D
2272.3271	2271.3198	2271.3354	159	179	K.ALGIQTRPVILGPISYLYLGK.A
2383.1963	2382.1890	2382.1914	600	621	R.DEVNDLESAGITVIQVDEPAIR.E
2548.1611	2547.1538	2547.1608	122	141	K.WFDSNYHYVRPTFSHSTEFK.L
2719.4414	2718.4341	2718.4327	209	233	K.EAGAEVQIDEPVLDLPEIVQSK.F
3173.5139	3172.5066	3172.4890	686	712	K.DDPNYIQEFSEYPNHIGLGLFDIHSR.I
No match to: 982.5655, 984.4954, 994.4910, 1017.6600, 1211.5955, 1284.6808, 1318.6819, 1416.7087, 1470.8213, 1473.7216, 1622.7964, 1653.8984, 1679.8450, 1795.9884, 1809.8727, 1809.8727, 1822.9479, 1863.9208, 1863.9208, 1891.9657, 1891.9657, 1935.8888, 1977.0535, 2015.2632, 2230.1975, 2303.1589, 2408.0879, 2414.1533, 2450.2117, 2470.2241, 2527.2266, 2662.3806, 2691.2791					

Los productos de PCR obtenidos de los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* se secuenciaron en el Servicio de Genómica (UPV/EHU). Las secuencias obtenidas en cada caso fueron analizadas en el programa informático Bioedit y comparadas con la de la cepa NCPF 3949 presentando un 100% de homología. Sin embargo, la comparación de la secuencia nucleotídica del gen *MET6* de la cepa de *C. dubliniensis* NCPF 3949 con la de la cepa de *C. albicans* SC 5314, mostró un 92% de homología (Figura 4.28).



Figura 4.28. Alineamiento de las secuencias codificadas por el gen *MET6* de las cepas atípicas (95-677, 98-277 y 94-234) de *C. dubliniensis* y de las cepas de referencia NCPF 3949 y SC 5314 con el programa ClustalW. El símbolo (*) indica los nucleótidos idénticos, el símbolo (.) indica las sustituciones conservadas y (:) indica sustituciones semiconservadas.

```

95-677 AAATGGTTTGATTCTAATTATCATTATGTTAGACCAACATTTTCTCATTCTACTGAATTT 420
98-277 AAATGGTTTGATTCTAATTATCATTATGTTAGACCAACATTTTCTCATTCTACTGAATTT 420
94-234 AAATGGTTTGATTCTAATTATCATTATGTTAGACCAACATTTTCTCATTCTACTGAATTT 420
NCPF 3949AAATGGTTTGATTCTAATTATCATTATGTTAGACCAACATTTTCTCATTCTACTGAATTT 420
SC 5314AAATGGTTTGATTCTAACTACCATTATGTCAGACCAACCTTTTCTCACTCTACTGAATTC 420
***** ** ***** ***** .***** ***** .

95-677 AAATTAACACTGATGCTGGTATTAACCCGTTGATGAATCAATGAAGCTAAAGCTTTA 480
98-277 AAATTAACACTGATGCTGGTATTAACCCGTTGATGAATCAATGAAGCTAAAGCTTTA 480
94-234 AAATTAACACTGATGCTGGTATTAACCCGTTGATGAATCAATGAAGCTAAAGCTTTA 480
NCPF 3949AAATTAACACTGATGCTGGTATTAACCCGTTGATGAATCAATGAAGCTAAAGCTTTA 480
SC 5314AAATTAACACTGATGCTGGTATTAACCCGTTGATGAATCAACGAAGCTAAAGCTTTG 480
****.*****.***** *****.***** ***** *****.

95-677 GGTATTCAAAC TAGACCAGTTATTTGGGTCCAATTTCTTATTATATTAGGTAAAGCT 540
98-277 GGTATTCAAAC TAGACCAGTTATTTGGGTCCAATTTCTTATTATATTAGGTAAAGCT 540
94-234 GGTATTCAAAC TAGACCAGTTATTTGGGTCCAATTTCTTATTATATTAGGTAAAGCT 540
NCPF 3949GGTATTCAAAC TAGACCAGTTATTTGGGTCCAATTTCTTATTATATTAGGTAAAGCT 540
SC 5314GGTATTCAAAC TAGACCAGTTATTTGGGTCCAATTTCTTACTTGTATTAGGTAAAGCT 540
***.***** ***** ** *****.***** ** .***** *****

95-677 GATAAAGATTCCTTGATTGGAACCAATTTCTTTATTACCAAAATCTTGCCAGTTTAT 600
98-277 GATAAAGATTCCTTGATTGGAACCAATTTCTTTATTACCAAAATCTTGCCAGTTTAT 600
94-234 GATAAAGATTCCTTGATTGGAACCAATTTCTTTATTACCAAAATCTTGCCAGTTTAT 600
NCPF 3949GATAAAGATTCCTTGATTGGAACCAATTTCTTTATTACCAAAATCTTGCCAGTTTAT 600
SC 5314GATAAAGATTCCTTGATTGGAACCAATTTCTTTATTACCAAAATCTTGCCAGTTTAC 600
** ***** ***** ** *****.***** *****.

95-677 AAAGAATTGTTGCAAAAATTGAAAGAAGCTGGTGCTGAACAAGTTCAAATGATGAACCA 660
98-277 AAAGAATTGTTGCAAAAATTGAAAGAAGCTGGTGCTGAACAAGTTCAAATGATGAACCA 660
94-234 AAAGAATTGTTGCAAAAATTGAAAGAAGCTGGTGCTGAACAAGTTCAAATGATGAACCA 660
NCPF 3949AAAGAATTGTTGCAAAAATTGAAAGAAGCTGGTGCTGAACAAGTTCAAATGATGAACCA 660
SC 5314AAAGAATTGTTGCAAAAATTGAAAGAAGCTGGTGCTGAACAAGTTCAAATGATGAACCA 660
** .***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

95-677 GTATTGGTTTGGATTACCAGAAATGTTCAATCTAAATTTAAAGAAGCTTATGACGCT 720
98-277 GTATTGGTTTGGATTACCAGAAATGTTCAATCTAAATTTAAAGAAGCTTATGACGCT 720
94-234 GTATTGGTTTGGATTACCAGAAATGTTCAATCTAAATTTAAAGAAGCTTATGACGCT 720
NCPF 3949GTATTGGTTTGGATTACCAGAAATGTTCAATCTAAATTTAAAGAAGCTTATGACGCT 720
SC 5314GTATTGGTTTGGATTACCAGAAATGTTCAATCTAAATTTAAAGAAGCTTACGACGCT 720
** :***** ** .***** . ***** ***** ***** ***** *****

95-677 TTGGTTGGTTCTAATGATGATATCCAGAATTAATCTTGACTACTTATTTGGTGATGTT 780
98-277 TTGGTTGGTTCTAATGATGATATCCAGAATTAATCTTGACTACTTATTTGGTGATGTT 780
94-234 TTGGTTGGTTCTAATGATGATATCCAGAATTAATCTTGACTACTTATTTGGTGATGTT 780
NCPF 3949TTGGTTGGTTCTAATGATGATATCCAGAATTAATCTTGACTACTTATTTGGTGATGTT 780
SC 5314TTGGTTGG-----TGCTGATGTCCAGAATGATCTTGACTACCTACTTTGGTGATGTC 774
***** ** .**** . ***** .***** ** *****.

95-677 AGACCAAAC TTGAAAGCCATTGAAAACTTGCCAGTTTCTGGATTCCATTTGATTTTGTC 840
98-277 AGACCAAAC TTGAAAGCCATTGAAAACTTGCCAGTTTCTGGATTCCATTTGATTTTGTC 840
94-234 AGACCAAAC TTGAAAGCCATTGAAAACTTGCCAGTTTCTGGATTCCATTTGATTTTGTC 840
NCPF 3949AGACCAAAC TTGAAAGCCATTGAAAACTTGCCAGTTTCTGGATTCCATTTGATTTTGTC 840
SC 5314AGACCAAAC TTGAAAGCCATTGAAAACTTGCCAGTTGCTGGTTCCACTTTGATTTGTC 834
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

Figura 4.28. Continuación

```

95-677 AGAGTTCAGATCAATTGGATCAAGTTGCTTCTATTTTGAAAATGATCAAACCTTTATCT 900
98-277 AGAGTTCAGATCAATTGGATCAAGTTGCTTCTATTTTGAAAATGATCAAACCTTTATCT 900
94-234 AGAGTTCAGATCAATTGGATCAAGTTGCTTCTATTTTGAAAATGATCAAACCTTTATCT 900
NCPF 3949AGAGTTCAGATCAATTGGATCAAGTTGCTTCTATTTTGAAAATGATCAAACCTTTATCT 900
SC 5314AGAGTTCAGACAATTGGACGAAGTTGCTTCTATCTTGAAAGATGGTCAAACCTTTGCTC 894
*****:***** ***** ***** .***.*****.***

95-677 GTTGGTGTGTGTCGATGGTAGAAAACATTTGGAAAACGATTTTGCCAAGGCTTCCTCAGTG 960
98-277 GTTGGTGTGTGTCGATGGTAGAAAACATTTGGAAAACGATTTTGCCAAGGCTTCCTCAGTG 960
94-234 GTTGGTGTGTGTCGATGGTAGAAAACATTTGGAAAACGATTTTGCCAAGGCTTCCTCAGTG 960
NCPF 3949GTTGGTGTGTGTCGATGGTAGAAAACATTTGGAAAACGATTTTGCCAAGGCTTCCTCAGTG 960
SC 5314GCTGGTGTGTGTCGATGGTAGAAAACATTTGGAAGACGATTTGCGCCAAGGCTTCCTCAGTG 954
* *****.***** ***** *:***:

95-677 GTTCAAAAAGCTATTGAAAAAGTTGGTAAAGACAAAGTTGTTGTTGCTACTTCATCTTCA1020
98-277 GTTCAAAAAGCTATTGAAAAAGTTGGTAAAGACAAAGTTGTTGTTGCTACTTCATCTTCA1020
94-234 GTTCAAAAAGCTATTGAAAAAGTTGGTAAAGACAAAGTTGTTGTTGCTACTTCATCTTCA1020
NCPF 3949GTTCAAAAAGCTATTGAAAAAGTTGGTAAAGACAAAGTTGTTGTTGCTACTTCATCTTCA1020
SC 5314GTCAAAAAGCTATTGAAAAAGTTGGTAAAGATAAGGTTGTTGTTGCTACTTCATCTTCA1014
** ***** ** .*****

95-677 TTGTTACACACTCCAGTTGATTTGGAATCGGAAACTAAATTAGATGGTGTATTATAAGAC1080
98-277 TTGTTACACACTCCAGTTGATTTGGAATCGGAAACTAAATTAGATGGTGTATTATAAGAC1080
94-234 TTGTTACACACTCCAGTTGATTTGGAATCGGAAACTAAATTAGATGGTGTATTATAAGAC1080
NCPF 3949TTGTTACACACTCCAGTTGATTTGGAATCGGAAACTAAATTAGATGGTGTATTATAAGAC1080
SC 5314TTGTTGCACACTCCAGTTGATTTGGAATCTGAAACTAAATTAGACGCTGTATTATCAAGGAC1074
- *****.***** ***** * ***** *.***

95-677 TGGTTTTCTTTTGCTACCCAAAAATTGGATGAAGTTGTTGTTATTGCCAAAAATGTTTCT1140
98-277 TGGTTTTCTTTTGCTACCCAAAAATTGGATGAAGTTGTTGTTATTGCCAAAAATGTTTCT1140
94-234 TGGTTTTCTTTTGCTACCCAAAAATTGGATGAAGTTGTTGTTATTGCCAAAAATGTTTCT1140
NCPF 3949TGGTTTTCTTTTGCTACCCAAAAATTGGATGAAGTTGTTGTTATTGCCAAAAATGTTTCT1140
SC 5314TGGTTTTCTTTTGCTACTCAAAAATTGGATGAAGTTGTTGTCATTGCCAAGAAATGTTTCT1134
***** ***** ***** *****.*****

95-677 GGTGAAGATGTTTCTAAAGAATTACAAGCTAATGCTACTTCCATTAAAGCTAGATCTGAA1200
98-277 GGTGAAGATGTTTCTAAAGAATTACAAGCTAATGCTACTTCCATTAAAGCTAGATCTGAA1200
94-234 GGTGAAGATGTTTCTAAAGAATTACAAGCTAATGCTACTTCCATTAAAGCTAGATCTGAA1200
NCPF 3949GGTGAAGATGTTTCTAAAGAATTACAAGCTAATGCTACTTCCATTAAAGCTAGATCTGAA1200
SC 5314GGTGAAGATGTTTCTAAACAATTAGAAGCCAATGCTGCTTCCATCAAAGCTAGATCCGAA1194
***** ***** ***** *****.***** *****

95-677 TCTTCTATCACCAATGATCCAAAAGTTCAAGAAAGATTAACCTACCATCAATGAAGCTTTG1260
98-277 TCTTCTATCACCAATGATCCAAAAGTTCAAGAAAGATTAACCTACCATCAATGAAGCTTTG1260
94-234 TCTTCTATCACCAATGATCCAAAAGTTCAAGAAAGATTAACCTACCATCAATGAAGCTTTG1260
NCPF 3949TCTTCTATCACCAATGATCCAAAAGTTCAAGAAAGATTAACCTACCATCAATGAAGCTTTG1260
SC5314 TCTTCTATCACCAACGACCAAGGTTCAAGAAAGATTAACCTACCATTAACGAAGCTTTG1254
***** ***** ***** ***** ** *****

95-677 GCAACTAGAAAAGCTGCTTTCCGAAAAGATTAACCTGAACAAAAGGCTAAATATAATTTG1320
98-277 GCAACTAGAAAAGCTGCTTTCCGAAAAGATTAACCTGAACAAAAGGCTAAATATAATTTG1320
94-234 GCAACTAGAAAAGCTGCTTTCCGAAAAGATTAACCTGAACAAAAGGCTAAATATAATTTG1320
NCPF 3949GCAACTAGAAAAGCTGCTTTCCGAAAAGATTAACCTGAACAAAAGGCTAAATATAATTTG1320
SC 5314GCTACCAGAAAAGCCGCTTTCCGAAAAGATTAACCTGAACAAAAGGCTAAATACAACCTTG1314
**:* ***** ***** ***** ** **

```

Figura 4.28. Continuación

```

95-677 CCATTGTTCCCAACCACCACCATTGGTTCTTTCCACAAACTAAAGATATTAGAATCAAT1380
98-277 CCATTGTTCCCAACCACCACCATTGGTTCTTTCCACAAACTAAAGATATTAGAATCAAT1380
94-234 CCATTGTTCCCAACCACCACCATTGGTTCTTTCCACAAACTAAAGATATTAGAATCAAT1380
NCPF 3949CCATTGTTCCCAACCACCACCATTGGTTCTTTCCACAAACTAAAGATATTAGAATCAAT1380
SC 5314CCATTGTTCCCAACCACCACCATTGGTTCTTTCCACAAACTAAAGACATTAGAATCAAC1374
*****.

95-677 AGAAATAAATTTGCTAAAGGTCAAATTAAGTGAAGAATACGAACTTTTATTAACAAA1440
98-277 AGAAATAAATTTGCTAAAGGTCAAATTAAGTGAAGAATACGAACTTTTATTAACAAA1440
94-234 AGAAATAAATTTGCTAAAGGTCAAATTAAGTGAAGAATACGAACTTTTATTAACAAA1440
NCPF 3949AGAAATAAATTTGCTAAAGGTCAAATTAAGTGAAGAATACGAACTTTTATTAACAAA1440
SC 5314AGAAATAAATTTGCTAAAGGTCAAATTAAGTGAAGAATACGAACTTTTATTAACAAA1434
*****.***** **

95-677 GAAATTGAACTGTTGTTAGATTTCAAGAAGAAATTTGGTTGGATGTTTTAGTCCATGGT1500
98-277 GAAATTGAACTGTTGTTAGATTTCAAGAAGAAATTTGGTTGGATGTTTTAGTCCATGGT1500
94-234 GAAATTGAACTGTTGTTAGATTTCAAGAAGAAATTTGGTTGGATGTTTTAGTCCATGGT1500
NCPF 3949GAAATTGAACTGTTGTTAGATTTCAAGAAGAAATTTGGTTGGATGTTTTAGTCCATGGT1500
SC 5314GAAATTGAACTGTTGTTAGATTTCAAGAAGAAATTTGGTTGGATGTTTTAGTCCATGGT1494
*****

95-677 GAACCAGAAAGAAATGATATGGTTCAATATTTGGTGAACAATTGAATGGATTTGCTTTC1560
98-277 GAACCAGAAAGAAATGATATGGTTCAATATTTGGTGAACAATTGAATGGATTTGCTTTC1560
94-234 GAACCAGAAAGAAATGATATGGTTCAATATTTGGTGAACAATTGAATGGATTTGCTTTC1560
NCPF 3949GAACCAGAAAGAAATGATATGGTTCAATATTTGGTGAACAATTGAATGGATTTGCTTTC1560
SC 5314GAACCAGAAAGAAATGATATGGTTCAATATTTGGTGAACAATTGAATGGATTTGCTTTC1554
*****:*****

95-677 ACCACTAATGGTTGGGTTCAATCTTATGGTTCTAGATATGTTAGACCACCAATATTGTT1620
98-277 ACCACTAATGGTTGGGTTCAATCTTATGGTTCTAGATATGTTAGACCACCAATATTGTT1620
94-234 ACCACTAATGGTTGGGTTCAATCTTATGGTTCTAGATATGTTAGACCACCAATATTGTT1620
NCPF 3949ACCACTAATGGTTGGGTTCAATCTTATGGTTCTAGATATGTTAGACCACCAATATTGTT1620
SC 5314ACCACTAATGGTTGGGTTCAATCTTATGGTTCTAGATATGTTAGACCACCAATATTGTT1614
*****

95-677 GGTGATGTTTCTAGACCAAAAAGCTATGACAGTTAAAGAATCTGTTTATGCTCAATCTATT1680
98-277 GGTGATGTTTCTAGACCAAAAAGCTATGACAGTTAAAGAATCTGTTTATGCTCAATCTATT1680
94-234 GGTGATGTTTCTAGACCAAAAAGCTATGACAGTTAAAGAATCTGTTTATGCTCAATCTATT1680
NCPF 3949GGTGATGTTTCTAGACCAAAAAGCTATGACAGTTAAAGAATCTGTTTATGCTCAATCTATT1680
SC 5314GGTGATGTTTCTAGACCAAAAAGCTATGACTGTTAAAGAATCTGTTTATGCTCAATCTATT1674
*****.*****

95-677 ACTTCTAAACCAATGAAAGGTATGTTGACTGGTCCAGTTACCATTTGAGATGGTCATTC1740
98-277 ACTTCTAAACCAATGAAAGGTATGTTGACTGGTCCAGTTACCATTTGAGATGGTCATTC1740
94-234 ACTTCTAAACCAATGAAAGGTATGTTGACTGGTCCAGTTACCATTTGAGATGGTCATTC1740
NCPF 3949ACTTCTAAACCAATGAAAGGTATGTTGACTGGTCCAGTTACCATTTGAGATGGTCATTC1740
SC 5314ACTTCTAAACCAATGAAAGGTATGTTGACTGGTCCAGTTACCATTTGAGATGGTCATTC1734
*****.*****

95-677 CCAAGAGATGATGTTTCTGGTAAAGATTCAAGCTTTACAATTAGGTTTAGCTTTAAGAGAT1800
98-277 CCAAGAGATGATGTTTCTGGTAAAGATTCAAGCTTTACAATTAGGTTTAGCTTTAAGAGAT1800
94-234 CCAAGAGATGATGTTTCTGGTAAAGATTCAAGCTTTACAATTAGGTTTAGCTTTAAGAGAT1800
NCPF 3949CCAAGAGATGATGTTTCTGGTAAAGATTCAAGCTTTACAATTAGGTTTAGCTTTAAGAGAT1800
SC 5314CCAAGAGATGATGTTTCTGGTAAAGATTCAAGCTTTGCAATTGGGTTGGCTTTAAGAGAT1794
*****.*****.*****.*****.*****

```

Figura 4.28. Continuación

```

95-677 GAAGTCAATGATTGGAAAGTGCAGGTATTACTGTTATTCAAGTTGATGAACCAGCTATT1860
98-277 GAAGTCAATGATTGGAAAGTGCAGGTATTACTGTTATTCAAGTTGATGAACCAGCTATT1860
94-234 GAAGTCAATGATTGGAAAGTGCAGGTATTACTGTTATTCAAGTTGATGAACCAGCTATT1860
NCPF 3949GAAGTCAATGATTGGAAAGTGCAGGTATTACTGTTATTCAAGTTGATGAACCAGCTATT1860
SC 5314GAAGTCAATGATTGGAAAGTGCAGGTATTACTGTTATTCAAGTTGATGAACCAGCTATT1854
***** ** ** *****.****:***** *****.

95-677 AGAGAAGTTTACCATTAAGAGCTGGTAAAGAAAGATCTGATTATTTGAATTGGGCTGCT1920
98-277 AGAGAAGTTTACCATTAAGAGCTGGTAAAGAAAGATCTGATTATTTGAATTGGGCTGCT1920
94-234 AGAGAAGTTTACCATTAAGAGCTGGTAAAGAAAGATCTGATTATTTGAATTGGGCTGCT1920
NCPF 3949AGAGAAGTTTACCATTAAGAGCTGGTAAAGAAAGATCTGATTATTTGAATTGGGCTGCT1920
SC 5314AGAGAAGTTTACCATTAAGAGCTGGTAAAGAAAGATCTGATTATTTGAATTGGGCTGCT1914
*****.*****.***** ***** ***** ** ***** *****

95-677 CAATCATTTAGAGTTGCCACTTCTGGTGTGAAAATTCTACTCAAATTCATTTCCATTTTC1980
98-277 CAATCATTTAGAGTTGCCACTTCTGGTGTGAAAATTCTACTCAAATTCATTTCCATTTTC1980
94-234 CAATCATTTAGAGTTGCCACTTCTGGTGTGAAAATTCTACTCAAATTCATTTCCATTTTC1980
NCPF 3949CAATCATTTAGAGTTGCCACTTCTGGTGTGAAAATTCTACTCAAATTCATTTCCATTTTC1980
SC 5314CAATCATTTAGAGTTGCCACTTCTGGTGTGAAAATTCTACTCAAATTCATTTCCATTTTC1974
***** ***** ***** ** ***** **

95-677 TGTATTTCAGATTTAGATCCAAATCATATTAAGCTTTAGATGCTGATGTTGTTCTATT2040
98-277 TGTATTTCAGATTTAGATCCAAATCATATTAAGCTTTAGATGCTGATGTTGTTCTATT2040
94-234 TGTATTTCAGATTTAGATCCAAATCATATTAAGCTTTAGATGCTGATGTTGTTCTATT2040
NCPF 3949TGTATTTCAGATTTAGATCCAAATCATATTAAGCTTTAGATGCTGATGTTGTTCTATT2040
SC 5314TGTATTTCAGATTTAGATCCAAATCATATTAAGCTTTAGATGCTGATGTTGTTCTATT2034
***** ** .*****.***** ***** ***** ***** ***** **

95-677 GAATTTTCTAAAAAAGATGATCCAAATATATTCAAGAATTCCTGAATATCCTAATCAT2100
98-277 GAATTTTCTAAAAAAGATGATCCAAATATATTCAAGAATTCCTGAATATCCTAATCAT2100
94-234 GAATTTTCTAAAAAAGATGATCCAAATATATTCAAGAATTCCTGAATATCCTAATCAT2100
NCPF 3949GAATTTTCTAAAAAAGATGATCCAAATATATTCAAGAATTCCTGAATATCCTAATCAT2100
SC 5314GAATTTTCTAAAAAAGATGATCCAAATATATTCAAGAATTCCTGAATATCCTAATCAT2094
***** ** ** .** .***** ***** ***** ***** ***** *****

95-677 ATTGGTTTAGGTTTATTTGATATCCATTACCAAGAATTCCTAATAACAAGAATTTGTT2160
98-277 ATTGGTTTAGGTTTATTTGATATCCATTACCAAGAATTCCTAATAACAAGAATTTGTT2160
94-234 ATTGGTTTAGGTTTATTTGATATCCATTACCAAGAATTCCTAATAACAAGAATTTGTT2160
NCPF 3949ATTGGTTTAGGTTTATTTGATATCCATTACCAAGAATTCCTAATAACAAGAATTTGTT2160
SC 5314ATTGGTTTAGGTTTATTTGATATCCACTCCTCAAGAATTCCTAATAACAAGAATTTGTT2154
***** ***** ***** ** :***** ***** ***** *****

95-677 TCTAGAATTGAAGAAATCTTGAAAGTTTATCCAGCTTCTAAATTTGGGTTAACCAGAT2220
98-277 TCTAGAATTGAAGAAATCTTGAAAGTTTATCCAGCTTCTAAATTTGGGTTAACCAGAT2220
94-234 TCTAGAATTGAAGAAATCTTGAAAGTTTATCCAGCTTCTAAATTTGGGTTAACCAGAT2220
NCPF3949TCTAGAATTGAAGAAATCTTGAAAGTTTATCCAGCTTCTAAATTTGGGTTAACCAGAT2220
SC 5314TCCAGAATTGAAGAAATCTTGAAAGTTTATCCAGCTTCTAAATTTGGGTTAACCAGAT2214
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

95-677 TGTGGTTTGAAAAC TAGAGTTGGCCAGAAGTTAAAGAATCATTGACTAATATGGTTGAT2280
98-277 TGTGGTTTGAAAAC TAGAGTTGGCCAGAAGTTAAAGAATCATTGACTAATATGGTTGAT2280
94-234 TGTGGTTTGAAAAC TAGAGTTGGCCAGAAGTTAAAGAATCATTGACTAATATGGTTGAT2280
NCPF 3949TGTGGTTTGAAAAC TAGAGTTGGCCAGAAGTTAAAGAATCATTGACTAATATGGTTGAT2280
SC 5314TGTGGTTTGAAAAC TAGAGTTGGCCAGAAGTTAAAGAATCATTGACTAATATGGTTGAA2274
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** :

```

Figura 4.28. Continuación

95-677	GCTGCTAAAGAATTCAGAGCTAAATACTAA	2310
98-277	GCTGCTAAAGAATTCAGAGCTAAATACTAA	2310
94-234	GCTGCTAAAGAATTCAGAGCTAAATACTAA	2310
NCPF 3949	GCTGCTAAAGAATTCAGAGCTAAATACTAA	2310
SC 5314	GCTGCTAAAGAATTCAGAGCTAAATACTAA	2304

Figura 4.28. Continuación

4.4.2. Expresión del gen *CdMET6*

La expresión del gen *CdMET6* de los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* se cuantificó mediante la técnica de qRT-PCR.

Los resultados de la expresión del gen se normalizaron con el nivel de expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos obtenidos se analizaron mediante el test t de Student de dos colas y revelaron que los niveles de expresión de las cepas 95-677 y 94-234 eran similares al obtenido con la cepa NCPF 3949, sin embargo los niveles de expresión de la cepa 98-277 fueron significativamente menores respecto a los de la cepa NCPF 3949, como se muestra en la figura 4.29.

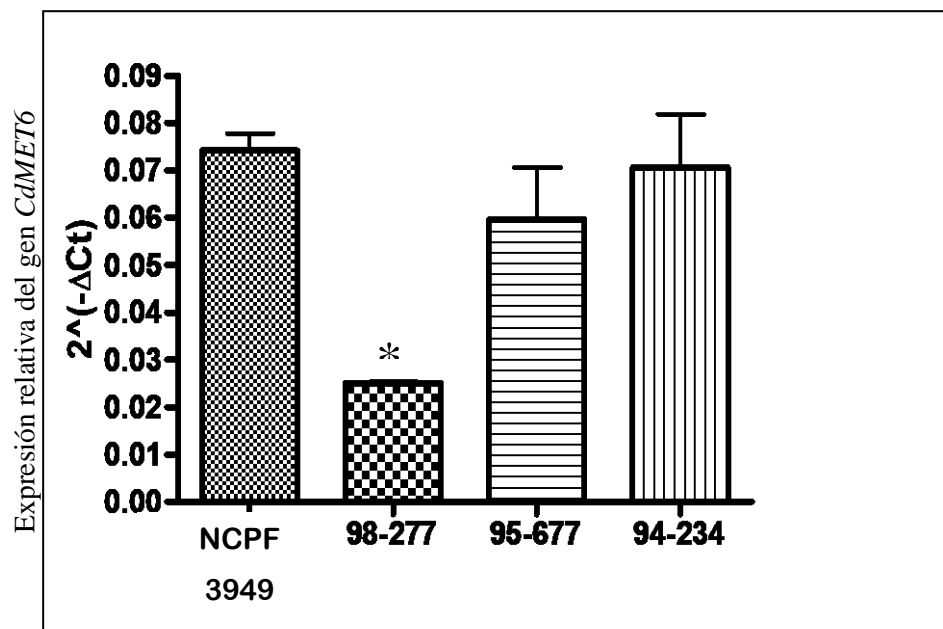


Figura 4.29. Expresión del gen *CdMET6* mediante qRT-PCR para la cepa control de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y las tres cepas atípicas estudiadas. (*) $p < 0,05$

4.4.3. Inserción del gen *CdMET6* en *C. albicans*.

La incorporación del gen *CdMET6* en *C. albicans*, se llevó a cabo utilizando el plásmido pNIM1⁽²³⁴⁾. En primer lugar se amplificó mediante PCR, a partir del ADN genómico de *C. dubliniensis* NCPF 3949, el fragmento completo de 2300 pb del gen *CdMET6* (Figura 4.30), con los cebadores MET6 F Sall y MET6 R BamHI (Tabla 3.18). Este amplicón y el plásmido pNIM1, se sometieron a digestión con las enzimas de restricción (Sall-BamHI y Sall-BglII respectivamente) con la finalidad de obtener extremos cohesivos para su posterior ligación (Apartado 3.11.4).

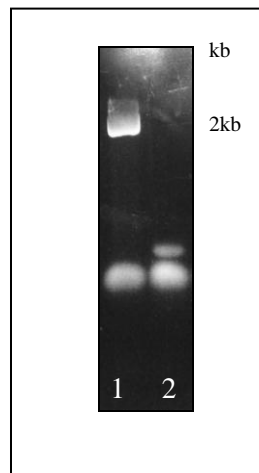


Figura 4.30. Electroforesis de los productos de PCR a partir del ADN de *C. dubliniensis* NCPF 3949 con los cebadores MET6 F Sall y MET6 R BamHI. Calle 1: reacción positiva de amplificación y calle 2: control negativo de la PCR

Tras el proceso de ligación, se realizó la transformación de células competentes de la cepa de *E. coli* XL-10 Gold (Apartado 3.11.5) y se comprobó la presencia del inserto en los plásmidos recombinantes mediante la digestión con las enzimas Sall y BamHI obteniendo dos bandas de aproximadamente de 6.0 y 2.0 Kb, mientras que en los vectores sin el inserto se obtuvieron dos bandas de 4.5 y 2.0 Kb.

La presencia del inserto en los plásmidos recombinantes también se verificó mediante PCR utilizando los cebadores específicos del inserto MET6 F Sall y MET6 R BamHI (Figura 4.31).

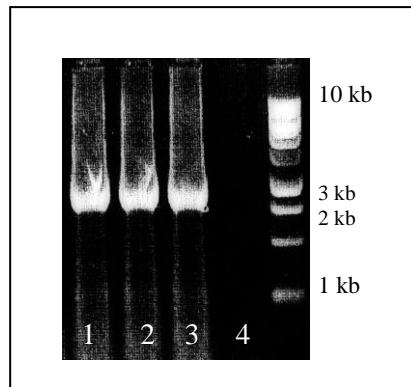


Figura 4.31. Electroforesis de los productos de PCR con los cebadores MET6 F Sall y MET6 R BamHI a partir del ADN de las colonias transformadas. Calle 1, 2 y 3: reacción positiva de amplificación y calle 4 control negativo de la PCR.

El plásmido resultante pNIM1-*CdMET6*, se digirió con las enzimas SacII y KpnI para la linealización del plásmido y se llevó a cabo la transformación en las células de *C. albicans* SC 5314 mediante electroporación.

Con el fin de confirmar la correcta integración del plásmido completo pNIM1-*CdMET6* en el lugar *ADH1* de *C. albicans* SC 5314, se llevaron a cabo 4 amplificaciones mediante PCR tal y como se describen en el apartado 3.11.8 de Materiales y Métodos (Figura 4.32). El resultado de cada una de las PCR realizadas reveló la presencia y la correcta integración de la totalidad pNIM1-*CdMET6* en *C. albicans* SC 5314.

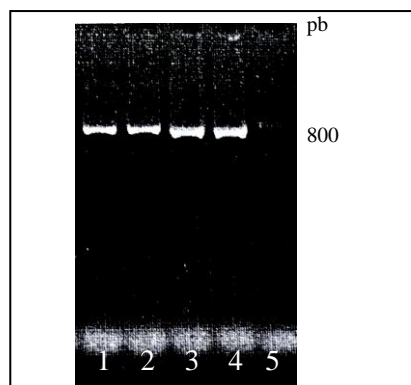


Figura 4.32. Electroforesis de los productos de PCR con los cebadores ADH1F y CartAR a partir del ADN de las colonias transformadas de *C. albicans*. Calle 1, 2, 3 y 4: reacción positiva de amplificación y calle 5 control negativo de la PCR.

4.4.4. Caracterización de la cepa *C. albicans*-CdMET6

La caracterización de la cepa *C. albicans*-CdMET6 se llevó a cabo mediante diversos métodos fenotípicos, inmunológicos y proteómicos, y los resultados fueron contrastados con los de las cepas de referencia de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y *C. albicans* SC 5314.

4.4.4.1. Métodos fenotípicos

Una de las características fenotípicas que se estudió fue la producción de clamidosporas. Esta prueba se realizó con varios medios que estimulan la formación de clamidosporas como el agar CH-P, agar Staib, agar harina de maíz, agar caseína y agar YNB suplementado con galactosa y metionina. La cepa *C. albicans*-CdMET6 no formó colonias rugosas y la observación microscópica reveló que no era capaz de formar clamidosporas (Figura 4.33).

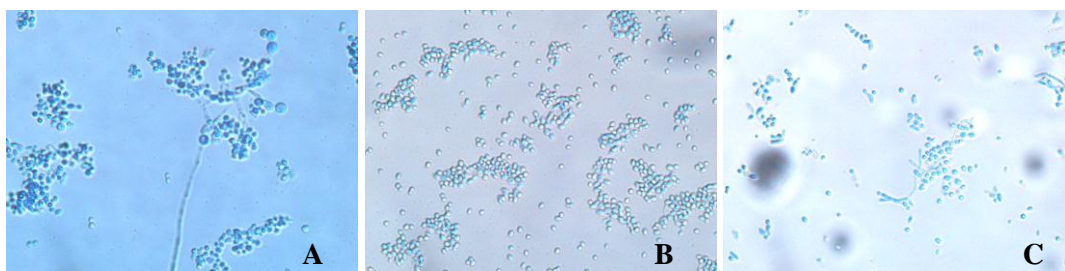


Figura 4.33. Capacidad para formar clamidosporas en agar Staib tras 72 h a 30 °C: (A) *C. dubliniensis* NCPF 3949, (B) *C. albicans* SC 5314 y (C) *C. albicans*-CdMET6. Observación microscópica a 400X.

4.4.4.2. Métodos inmunológicos

La cepa *C. albicans*-CdMET6 no modificó su reacción en la prueba de aglutinación Bichro-Dubli Fumouze® en comparación con la cepa parental (Figura 4.34) y en el mismo sentido no mostró reacción con el AcM 12F7-F2 (principio activo de Bichro-Dubli) mediante IFI.

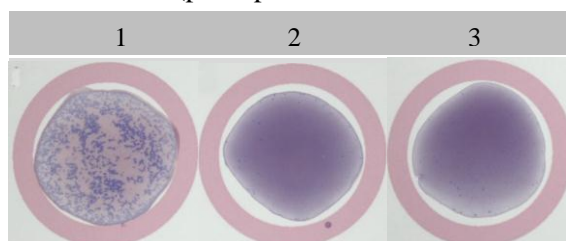


Figura 4.34. Prueba de aglutinación con el test Bichro-Dubli Fumouze: (1) *C. dubliniensis* NCPF 3949, (2) *C. albicans* SC 5314 y (3) *C. albicans*-CdMET6.

Estas dos técnicas (aglutinación e IFI) no son muy sensibles y por ese motivo se llevaron a cabo estudios de la reacción del AcM 12F7-F2 mediante microscopía confocal y la microscopía electrónica cuyos resultados se muestran más adelante en los apartados 4.4.4.2.1 y 4.6 respectivamente.

4.4.4.2.1. Reacción con el AcM 12F7-F2 por microscopía confocal

La microscopía confocal mostró una mayor sensibilidad y resolución a la hora de poner en evidencia la reacción del AcM 12F7-F2 con los antígenos de la superficie de la pared de las diferentes cepas. En la figura 4.35 se puede apreciar claramente la señal fluorescente en la superficie de las células de la cepa de *C. dubliniensis* NCPF 3949, mientras que se observó una reacción de escasa intensidad en *C. albicans* SC 5314 y en las cepas atípicas 98-277, 95-677 y 94-234 de *C. dubliniensis*. En el caso de la cepa *C. albicans*-CdMET6 se observó un incremento moderado de la reacción con el AcM en relación a su cepa parental.

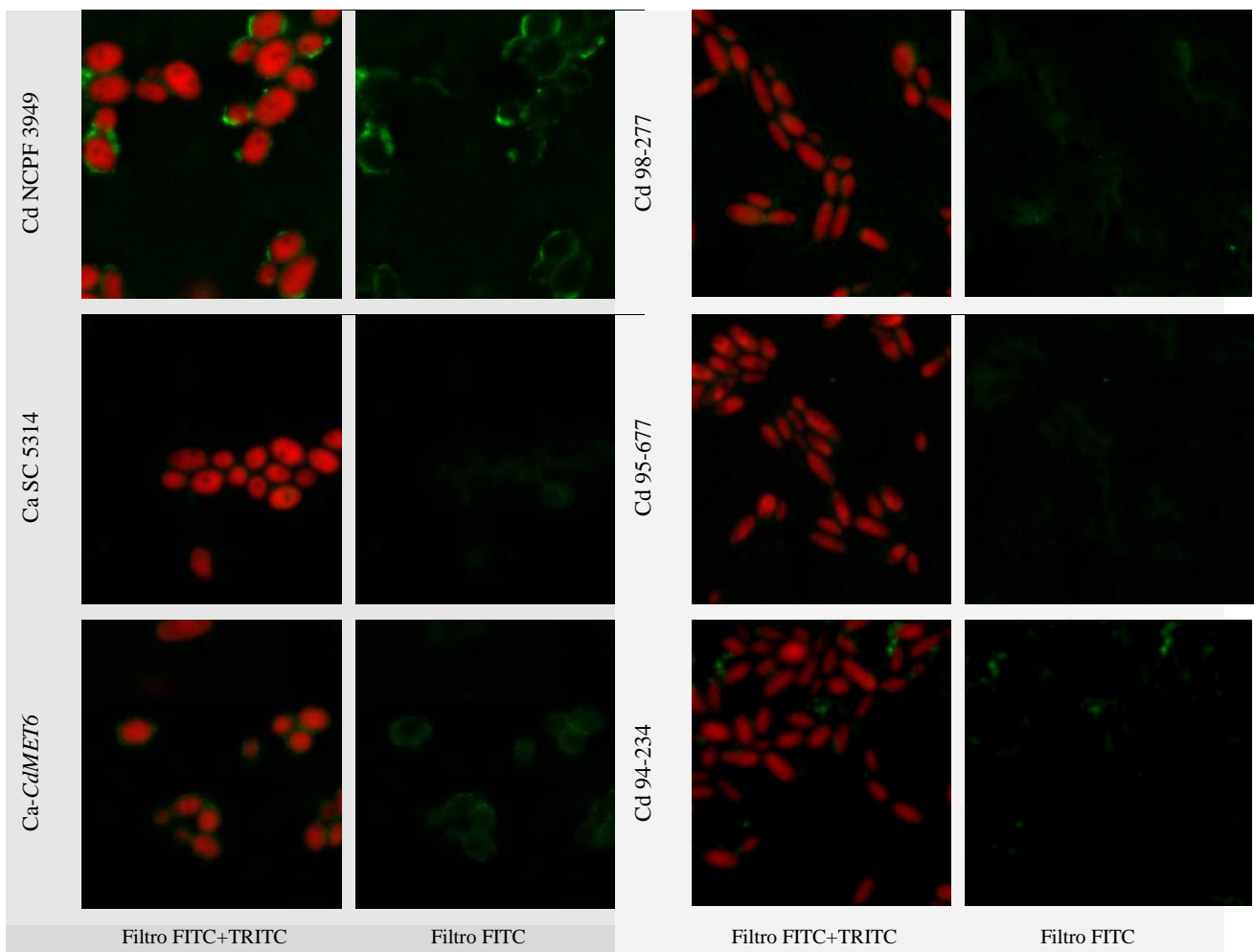


Figura 4.35. Reacción del AcM 12F7-F2 con levaduras mediante microscopía confocal (600X). *C. dubliniensis* (Cd) y *C. albicans* (Ca).

4.4.4.2.2. Reacción del AcM 12F7-F2 frente a extractos de pared separados mediante electroforesis monodimensional y bidimensional (2D-PAGE)

- **Reacción del AcM 12F7-F2 frente a extractos de pared separados mediante electroforesis monodimensional**

Se estudió la reacción del AcM 12F7-F2 mediante inmunodetección frente a los extractos de pared de la cepa transformada de *C. albicans* y los resultados fueron comparados con los de las cepas de referencia de *C. dubliniensis* NCPF 3949 y *C. albicans* SC 5314.

El AcM 12F7-F2 reconoció un componente de 90 kDa en la cepa de *C. albicans-CdMET6* que no se apreció en la cepa parental *C. albicans* SC 5314, al tiempo que se identificó un componente de 50 kDa común en ambas cepas (Figura 4.36).

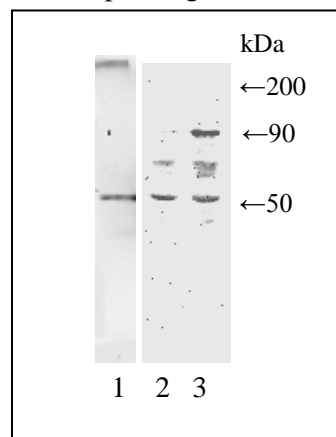


Figura 4.36. Reacción del AcM 12F7-F2 con los extractos DTT de pared de (1) *C. dubliniensis* NCPF 3949; (2) *C. albicans* SC 5314 y (3) *C. albicans-CdMET6*.

- **Reacción del AcM 12F7-F2 frente a extractos de pared separados mediante electroforesis bidimensional**

Con el objeto de caracterizar mejor el antígeno que reconoce el AcM 12F7-F2, se utilizó la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE).

Para este nuevo apartado con la técnica de electroforesis en geles 2D-PAGE, se incorporaron también los extractos DTT de la pared de las cepas atípicas de *C. dubliniensis*. Tras realizar la inmunodetección con el AcM se observó, en general, un mayor número de proteínas inmunoreactivas en cada una de las cepas estudiadas, por lo que se llevó a cabo la identificación por MALDI-TOF-TOF de aquellas que mostraron una reacción más intensa (Figuras 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41 y 4.42).

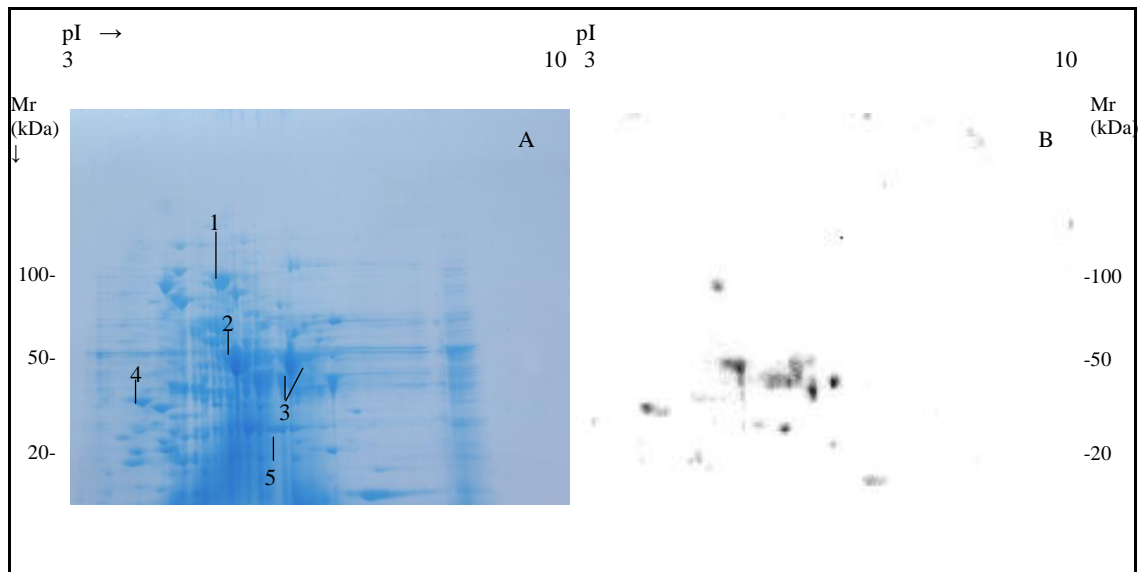


Figura 4.37. Electroforesis en geles 2D-PAGE de los extractos DTT de *C. dubliniensis* NCPF 3949. Panel A: gel teñido con Colloidal Coomassie® y panel B: inmunodetección con el AcM 12F7-F2. La identidad de las proteínas marcadas con números se muestra en la tabla 4.9.

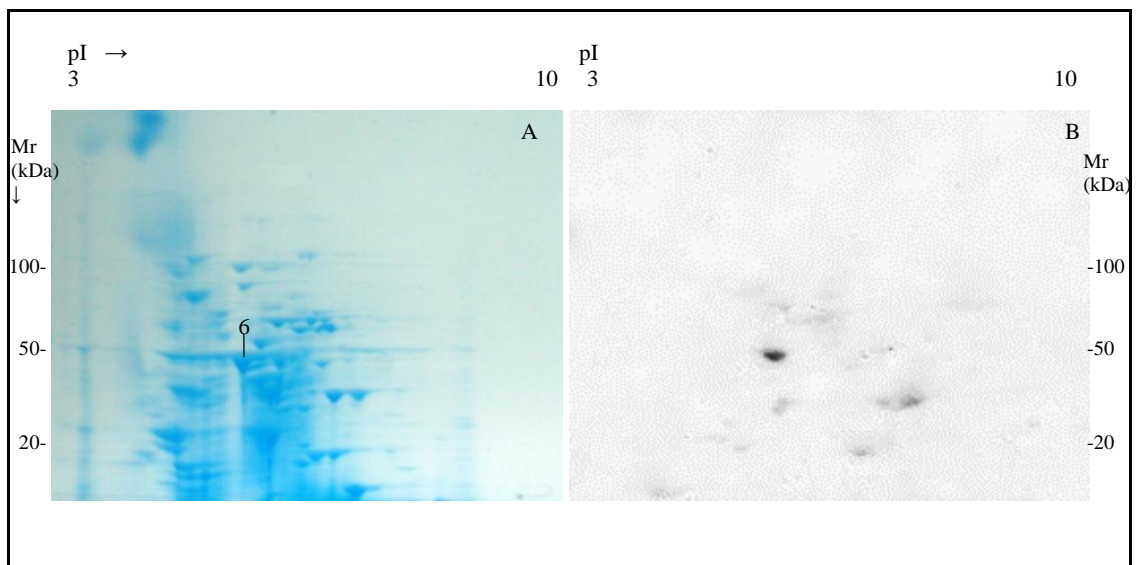


Figura 4.38. Electroforesis en geles 2D-PAGE de los extractos DTT de *C. albicans* SC 5314. Panel A: gel teñido con Colloidal Coomassie® y panel B: inmunodetección con el AcM 12F7-F2. La identidad de las proteínas marcadas con números se muestra en la tabla 4.9.

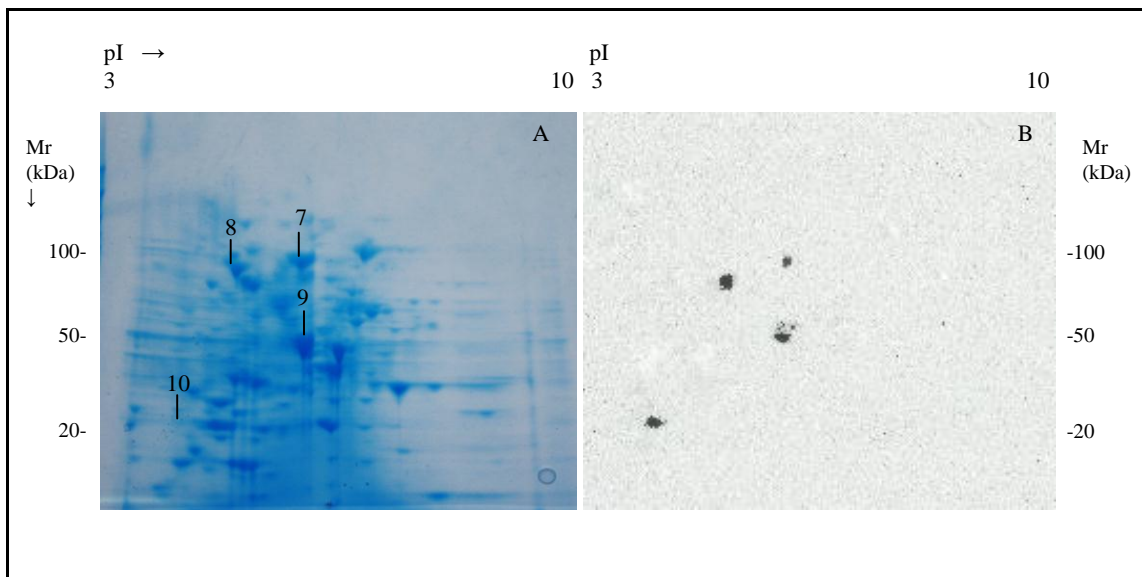


Figura 4.39. Electroforesis en geles 2D-PAGE de los extractos DTT de *C. albicans-CdMET6*. Panel A: gel teñido con Colloidal Coomassie® y panel B: inmunodetección con el AcM 12F7-F2. La identidad de las proteínas marcadas con números se muestra en la tabla 4.9.

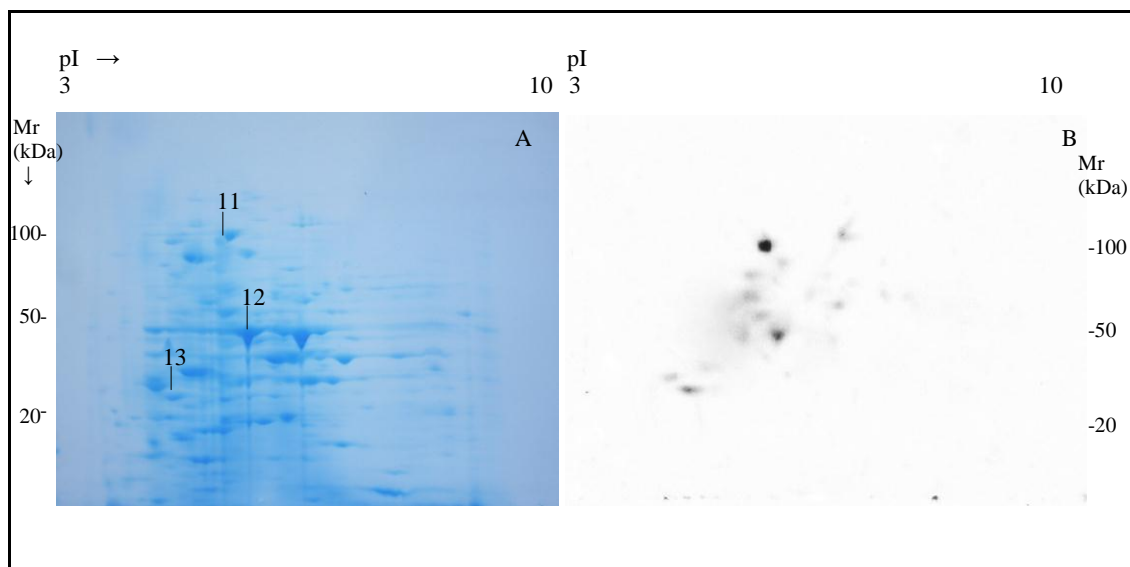


Figura 4.40. Electroforesis en geles 2D-PAGE de los extractos DTT de *C. dubliniensis* 98-277. Panel A: gel teñido con Colloidal Coomassie® y panel B: inmunodetección con el AcM 12F7-F2. La identidad de las proteínas marcadas con números se muestra en la tabla 4.9.

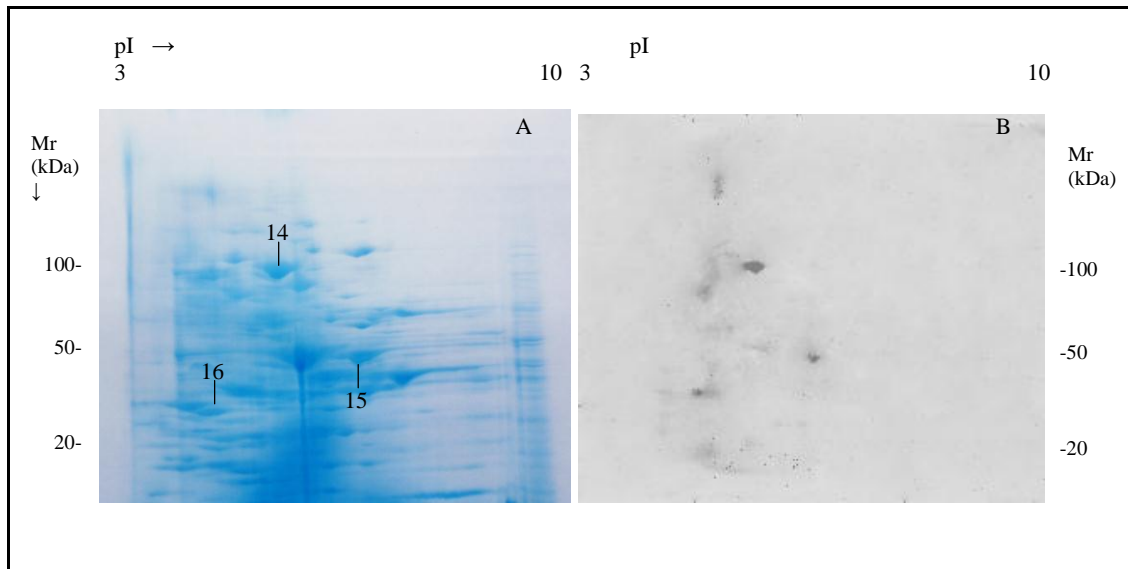


Figura 4.41. Electroforesis en geles 2D-PAGE de los extractos DTT de *C. dubliniensis* 95-677. Panel A: gel teñido con Colloidal Coomassie® y panel B: inmunodetección con el AcM 12F7-F2. La identidad de las proteínas marcadas con números se muestra en la tabla 4.9.

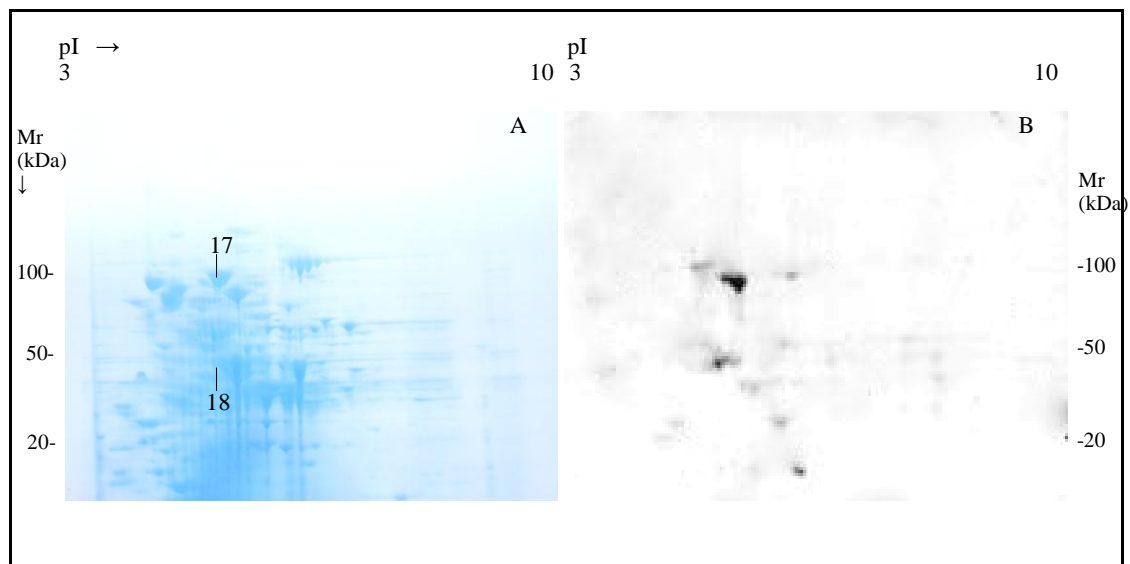


Figura 4.42. Electroforesis en geles 2D-PAGE de los extractos DTT de *C. dubliniensis* 94-234. Panel A: gel teñido con Colloidal Coomassie® y panel B: inmunodetección con el AcM 12F7-F2. La identidad de las proteínas marcadas con números se muestra en la tabla 4.9.

- **Análisis de los péptidos mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF-TOF**

Las proteínas correspondientes a las manchas reactivas con el AcM fueron escindidas de los geles teñidos con Colloidal Coomassie[®]. Cada uno de los componentes escindidos, se sometió a un proceso de digestión con tripsina obteniéndose diferentes fragmentos peptídicos que fueron analizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF. Posteriormente, se realizó la búsqueda de homologías en la base de datos MASCOT (www.matrixscience.com; Tabla 4.9). Este análisis se llevó a cabo en el servicio de proteómica (SGIker) de la UPV/EHU.

Tabla 4.9. Proteínas inmunoreactivas con el AcM 12F7-F2 en *C. dubliniensis* y *C. albicans*

Spot	Nº de acceso	Proteína	nombre del spot	pI	Score	Mr(kDa)	% Cobertura secuencia
1	gi 241958066	Metionina sintasa de <i>C. dubliniensis</i>	Met6p	5.35	2326	86,27	57
2	gi 241949449	Enolasa de <i>C. dubliniensis</i>	Eno1p	5,64	1453	47,20	48
3	gi 241956296	Fosfoglicerato quinasa de <i>C. dubliniensis</i>	Pgk1p	6.37	1734	45,24	74
4	gi 241954316	Exo-1,3-β-glucanasa de <i>C. dubliniensis</i>	Exg2p	4.67	421	34,00	25
5	gi 241951116	Fosfoglicerato mutasa 1, de <i>C. dubliniensis</i>	Gpm1p	6.00	882	27,45	57
6	gi 68488457	Enolasa de <i>C. albicans</i>	Eno1p	5.54	1174	47,20	47
7	gi 68475194	Metionina sintasa de <i>C. albicans</i>	Met6p	5.44	1938	85,76	46
8	gi 68467277	Proteína hipotética CaO19.12447 de <i>C. albicans</i>	Hsp70p	5.06	1290	70,45	41
9	ENO1_CANAL	Enolasa de <i>C. albicans</i>	Eno1p	5.54	2534	47,20	47
10	gi 37548637	Proteína de 29 kDa unida a IgE de <i>C. albicans</i>	ThiJ/Pfp1	4.79	1006	25,93	61
11	gi 241958066	Metionina sintasa de <i>C. dubliniensis</i>	Met6p	5,35	2502	86,27	66
12	gi 241949449	Enolasa de <i>C. dubliniensis</i>	Eno1p	5,64	1369	47,20	60
13	gi 241948503	Proteína 14-3-3 de <i>C. dubliniensis</i>	Bmh1p	4.75	1195	29,67	76
14	gi 241958066	Metionina sintasa de <i>C. dubliniensis</i>	Met6p	5,35	2474	86,27	56
15	gi 241956296	Fosfoglicerato quinasa de <i>C. dubliniensis</i>	Pgk1p	6,37	1252	45,24	75

16	gi 241948503	Proteína 14-3-3 de <i>C. dubliniensis</i>	Bmh1p	4,75	1195	29,67	76
17	gi 241958066	Metionina sintasa de <i>C. dubliniensis</i>	Met6p	5,35	2202	86,27	51
18	gi 241949449	Enolasa de <i>C. dubliniensis</i>	Eno1p	5,64	1449	47,20	45

- **Péptidos que reaccionan en las diferentes cepas de *C. dubliniensis* y *C. albicans* analizadas**

Se analizaron un total de 18 muestras que condujeron a la identificación de 8 proteínas: metionina sintasa (Met6), enolasa (Eno1), fosfoglicerato quinasa (Pkg1), fosfoglicerato mutasa 1 (Gpm1), exo-1,3- β -glucanasa (Exg2), proteína 14-3-3 (Bmh1), proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y la proteína de 29 kDa unida a IgE (ThiJ/Pfp1). En la tabla 4.10 se muestran las proteínas identificadas en los proteomas de las diferentes cepas estudiadas.

Cabe destacar que la proteína Met6 fue la única que estaba representada en todas las muestras de *C. dubliniensis*, con un rango de cobertura de la secuencia superior al 50%. Esta enzima también se detectó en la cepa heteróloga *C. albicans*-CdMET6, mientras que su reacción no fue significativa en la cepa parental *C. albicans* SC 5314.

En el caso de la proteína Eno1, fue un componente común en todas las muestras de *C. dubliniensis* y *C. albicans* analizadas, excepto en la cepa atípica 95-677.

El análisis de las muestras peptídicas que reaccionaban con el AcM 12F7-F2 permitió identificar otros componentes del extracto de *C. dubliniensis* NCPF 3949 como las proteínas Exg2, Gmp1 y Pkg1. Esta última proteína también estaba representada en el proteoma de la cepa del grupo blp 95-677.

La proteína Bmh1 mostró una reacción significativa con el AcM en los extractos de pared celular de las cepas atípicas de *C. dubliniensis* 98-277 y 95-677.

Cabe destacar que las proteínas Hsp70 y ThiJ/Pfp1 únicamente mostraron reacción en la cepa heteróloga *C. albicans*-CdMET6.

Tabla 4.10. Proteínas reactivas con AcM 12F7-F2 identificadas en las cepas estudiadas

	<i>C. dubliniensis</i>				<i>C. albicans</i>	
	NCPF 3949	98-277	95-677	94-234	SC 5314	<i>C. albicans</i> - <i>CdMET6</i>
Met6p	+	+	+	+	-	+
Eno1p	+	+	-	+	+	+
Pgk1p	+	-	+	-	-	-
Gpm1p	+	-	-	-	-	-
Exg2p	+	-	-	-	-	-
Bmh1p	-	+	+	-	-	-
Hsp70p	-	-	-	-	-	+
ThiJ/Pfp1p	-	-	-	-	-	+

(+) Positivo; (-) negativo

- **Comparación de las secuencias de las proteínas reconocidas por el AcM 12F7-F2**

El hecho de que el AcM 12F7-F2 presentara reacción frente a varias proteínas (Tabla 4.10), además de la metionina sintasa de *C. dubliniensis* (CdMet6), nos llevó a comparar las secuencias aminoacídicas de estas proteínas entre si, con el fin de localizar algún segmento que pudiera ser considerado como determinante antigénico. Para ello, se utilizó el programa informático T-Coffee descrito por Notredame y cols. ⁽²³⁴⁾, que permite el alineamiento de múltiples secuencias.

La comparación entre la secuencia de la proteína Eno1 y CdMet6, reveló varias regiones de alta homología (en color rojo) comprendidas entre los aminoácidos 213-225, 460-479, 494-515, 713-729 y 758-766 de la CdMet6 (Figura 4.43).

Se alinearon igualmente las secuencias de las proteínas Pgk1 y CdMet6 y en este caso se apreciaron cinco regiones que revelaron una alta similitud comprendidas entre los aminoácidos 1-6, 30-37, 114-123, 647-700 y 763-769 de la CdMet6 (Figura 4.44).

El alineamiento de la secuencia de la proteína Gpm1 con la proteína CdMet6, presentó cuatro regiones de alta homología comprendidas entre los aminoácidos 143-149, 162-177, 707-728 y 737-742 de la sintasa CdMet6 (Figura 4.45).

La comparación de la secuencia de la proteína Bmh1 frente a la proteína CdMet6 no reveló ninguna región de alta homología mientras que el alineamiento de las secuencias Exg2p y CdMet6p sólo reveló una región homóloga entre los aminoácidos 642-649 de la sintasa CdMet6

(Figura 4.46).

En el caso de la ThiJ/Pfp1, ésta presentó diversas regiones de alta homología comprendidas entre los aminoácidos 55-61, 125-137, 274-281, 637-647 y 737-745 de la CdMet6 (Figura 4.47). Finalmente, se llevó a cabo la comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas Hsp70 y CdMet6 donde se apreciaron varias regiones de alta similitud, comprendidas entre los aminoácidos 54-58, 74-83, 228-260, 298-329, 380-387, 394-416 y 534-567 de la sintasa CdMet6 (Figura 4.48).

En este estudio comparativo de las secuencias peptídicas, las proteínas Hsp70 y Eno1 fueron las que presentaron una mayor homología con la proteína CdMet6 (65% y 63% respectivamente), mientras que las proteínas Pkg1, Gpm1, Exg2 y ThiJ/Pfp1p presentaron una homología algo menor (54%, 58%, 45% y 54% respectivamente).

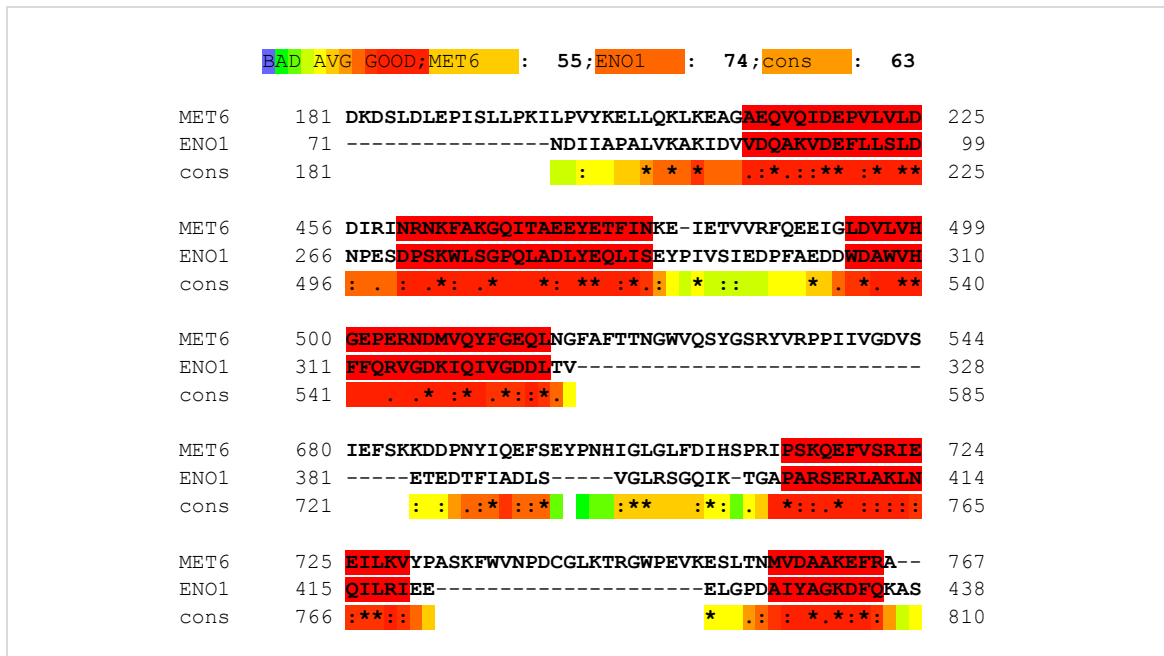


Figura 4.43. Alineamiento de las secuencias de las proteínas CdMet6 y Eno1 de *C. dubliniensis*. El símbolo (*) indica los aminoácidos idénticos, los símbolos (.) y (:) indican las sustituciones conservadas y semiconservadas, respectivamente.

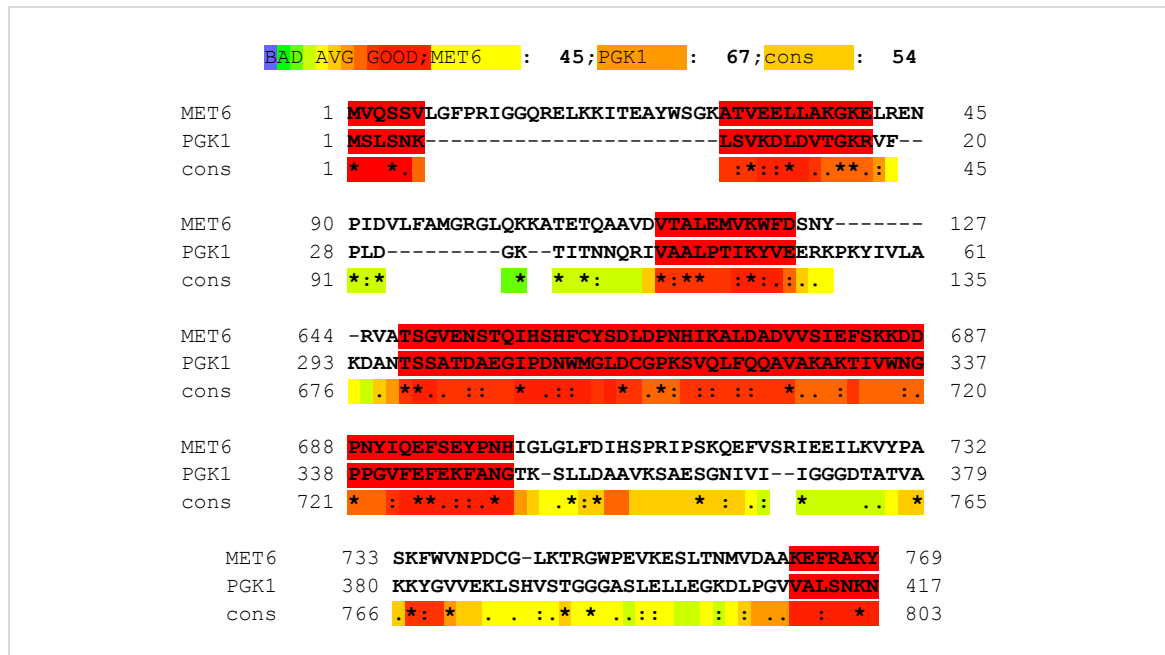


Figura 4.44. Alineamiento de las proteínas CdMet6 y Pgk1 de *C. dubliniensis*. El símbolo (*) indica los aminoácidos idénticos, los símbolos (.) y (:) indican las sustituciones conservadas y semiconservadas, respectivamente.

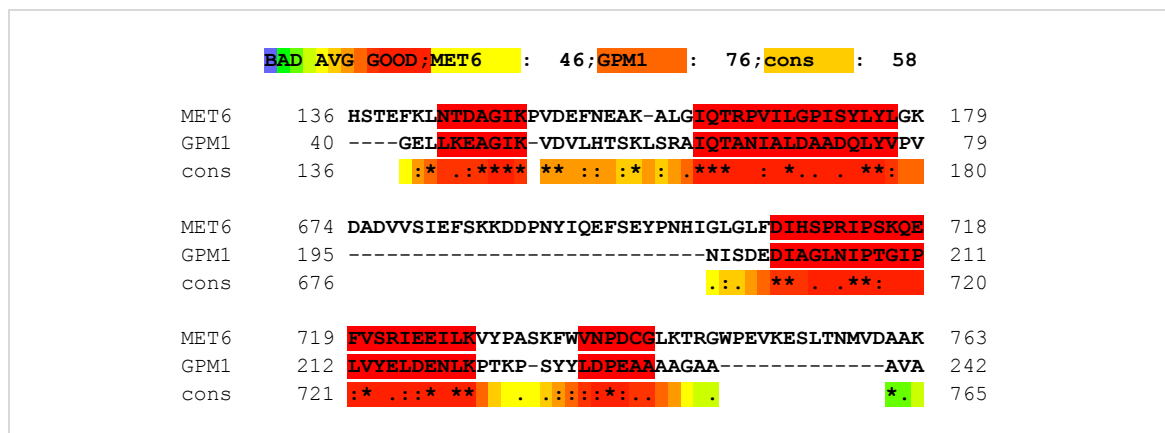


Figura 4.45. Alineamiento de las proteínas CdMet6 y Gpm1 de *C. dubliniensis*. El símbolo (*) indica los aminoácidos idénticos, los símbolos (.) y (:) indican las sustituciones conservadas y semiconservadas, respectivamente.

	BAD	AVG	GOOD	MET6	:	35	EXG2	:	64	cons	:	45
MET6	624	LPLRAGKERSDYLNWA	Q	SFRVATS	GVENSTQIHS	FCYS	DLDPN		668			
EXG2	269	-----Y	EAFDE	AWKPDTS	T-NS	VEKH	WG-----		291			
cons	631			:	:	:	:	***		***	:	*

Figura 4.46. Alineamiento de las proteínas CdMet6 y Exg2 de *C. dubliniensis*. El símbolo (*) indica los aminoácidos idénticos, los símbolos (.) y (:) indican las sustituciones conservadas y semiconservadas, respectivamente.

	BAD	AVG	GOOD	MET6	:	40	29	:	81	cons	:	54
MET6	46	NWKLQQA	GVDIIPS	NDFS	SYDQVLDLS	LLFNAI	PERYTKFDLAP		90			
29	15	FYSDGKKT	GVFVVEA	-----	-----	-----	LHP		32			
cons	46	:	:	*	*	*	*	:		*	*	
MET6	91	IDVLFAMGRGLQK	KATETQAAVD	VTALEMV	KWFDS	NYHYVR	PTFS		135			
29	33	FEVFRKKG	Y-----	EIQ	LASETGT	-----	FGW	DDHSVVPDFL	64			
cons	91	:	:	*	*	*	*	:		*	:	*
MET6	136	HS	TEFKLNTDAGIK	PVDEFNEAK	ALGIQTR	PVILGP	ISYLYL	LGKA	180			
29	65	NG	EDKEIFDNV	-----	NSEF	NVA	-----	-----	82			
cons	136	:	:	:	:	*	*	*	*	*	*	
MET6	271	PVS	GFHFD	FVR	VPDQLDQ	VASILK	NDQTL	SVGVVDGRNI	WKT	DFA		315
29	104	AGH	GTLEFDY	PHAKD	-LQKIAT	TVY	NGGGV	V-----	-----	-----		132
cons	271	.	*	*	*	:	:	*	:	:	:	*
MET6	631	ERSDYL	NWAAQS	FRVAT	SGVENSTQI	HSHFCYS	DLDPN	HIKALDA	675			
29	203	---WD	NFTVTD	GRIVT	-----	-----	-----	-----	215			
cons	631	:	*	:	:	*	:	*		*	:	*
MET6	721	SRIEEILKVYP	PASKFW	VNPDC	GLKTRG	WPEVKES	LTNMV	DAAKEF	765			
29	216	-----	-----	G	VNPQSA	VKTAE	-----	DVIAAF	233			
cons	721			*	*	*	:	:	*	*	*	

Figura 4.47. Alineamiento de las proteínas CdMet6 de *C. dubliniensis* y ThiJ/Pfp1 de *C. albicans*. El símbolo (*) indica los aminoácidos idénticos, los símbolos (.) y (:) indican las sustituciones conservadas y semiconservadas, respectivamente.

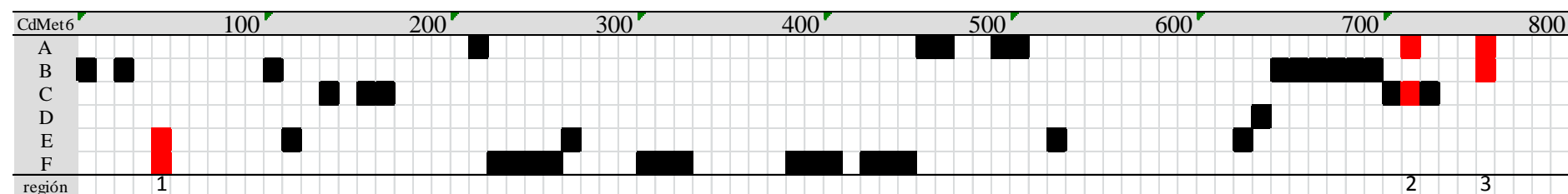
	BAD	AVG	GOOD	MET6	:	64	HSP70	:	67	cons	:	65
MET6	46	NWKLQQA	GVDI	PSNDFSYYDQVLDLS	LLFNALPERY	TKFDLAP	90					
HSP70	4	-----AVG	IDLG	TTYSCVAHFANDRVE	LIANDQGNRT	TPSFVAF	42					
cons	46		.*:*.:	.:	.:	.:	90					
MET6	220	-PVLVLDLPE	IVQSKFKEAYDALVGSNDDIPELILTTYFGDVRPN	263								
HSP70	110	KTFSPPEEISS	MVLTMKKEIAEGYLGSTVKDAVVTPAYFNDS	151								
cons	226		..	:::.*:*.:**	.:	:::.*:	270					
MET6	264	LKAIENLPVSGFHDFVVRVPDQLDQVASILKNDQ	PLSVGVVDGRN	308								
HSP70	152	-----	QRQA	TKDAGTIAGLN	166							
cons	271			:::.*	..*:	*:	315					
MET6	309	IWKTDFAKASSVVQKAIERVGKDK	---VVVATSSSSLHTPVDLES	350								
HSP70	167	VLRIINEPTAAAIAYGLDKKGSRGEHNVLI	-----FDLGL	200								
cons	316		:::.*:	:::.*:	:::.*:	:::.*:	360					
MET6	351	ETKLDGVIKDWFSFATQKLDEVVVIK	-----N	VSGEDVSKELQ	389							
HSP70	201	-----GGTFDVSLLAIDEGIFEVKATAGDTH	LGGEDFDNR	237								
cons	361		.*	..:	:::.*:	:::.*:	405					
MET6	390	A-NAT	SIKARSESSITNDPKVQERLTT	NEALATRKAFFPERLTE	433							
HSP70	238	NFFIQ	EFKRKNKKDISTNQRALRRLRTA	CERAKRTLSSSAQTSIE	282							
cons	406		:::.*:	:::.*:	:::.*:	:::.*:	450					
MET6	515	LNGFAFTTNGWVQSYGSRV	VRPPIIVGDVSRPKAMTVKESVYAQS	559								
HSP70	358	LNKSIN--PDEAVAYGA-A	VQAAILTGDTSSKTQDILLLDVAPLS	399								
cons	541	**	..:	:::.*:	:::.*:	:::.*:	585					
MET6	560	ITSKPMK	MLTGPVT-----ILRWSFPRDDVSGKI-QALQL	594								
HSP70	400	LGLETAGC	IMTKLI PRNSTIPTKKSETFSTYADNPQGVLIQVFEG	444								
cons	586		:::.*:	:::.*:	:::.*:	:::.*:	630					

Figura 4.48. Alineamiento de las proteínas CdMet6 *C. dubliniensis* y Hsp70 de *C. albicans*. El símbolo (*) indica los aminoácidos idénticos, los símbolos (.) y (:) indican las sustituciones conservadas y semiconservadas, respectivamente.

La comparación de las secuencias peptídicas de las proteínas reconocidas por el AcM 12F7-F2 reveló tres regiones de alta homología: una de 7 aminoácidos para CdMet6, ThiJ/Pfp1 y Hsp70 (región 1 de la tabla 4.11), otra de 22 aminoácidos compartida por las proteínas CdMet6, Gpm1 y Eno1 (región 2 de la tabla 4.11), y la última de 11 aminoácidos para CdMet6, Pgl1 y Eno1 en la región 3 de la tabla 4.11.

Se utilizó el programa informático Epitopia (<http://epitopia.tau.ac.il/>)⁽²⁷⁵⁾ en las tres regiones de alta homología para comprobar el grado de antigenidad de estas regiones. Como se ilustra en la tabla 4.12, la región 1 mostró una baja capacidad antigénica mientras que las regiones 2 y 3 presentaron una elevada capacidad antigénica.

Tabla 4.11. Resumen de las regiones de alta homología de las proteínas reconocidas por el AcM 12F7-F2 comunes con CdMet6p

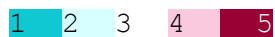


A: Eno1; B: Pgk1; C: Gpm1; D: Exg2; E: ThiJ/Pfp1; F: Hsp70; Marcado de color rojo la tres regiones de alta homología comunes a varias proteínas

Tabla 4.12. Capacidad antigénica de las tres regiones de alta homología

	REGIÓN 1	REGIÓN 2	REGIÓN 3
CdMet6	GVDIIPS	DIHSPRIPSKQEFVSRIEEILK	MVDAAKEFRAK
ThiJ/Pfp1	GVFVVEA	QIKTGAPARSERLAKLNQILRI	AIYAGKDFQKA
Hsp70	GIDLCTT	DIAGLNIPTGIPLVYELDENLK	KDLPGVVALSN

Escala de inmunogenicidad:



Bajo Medio Alto

4.5. Efecto del tratamiento con DTT de las blastosporas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* sobre la reacción con el AcM 12F7-F2

La reacción del AcM con los componentes de los extractos DTT de la pared celular de las diferentes cepas estudiadas demostró que todas ellas contenían proteínas reactivas, sin embargo el análisis por IFI confocal hacía intuir que estos antígenos, aunque presentes no estaban localizados en la superficie expuesta de la pared de las cepas estudiadas. Con estas premisas, para estudiar la distribución espacial del antígeno reactivo con el AcM 12F7-F2 en la pared celular, se desbrozó la superficie de la célula mediante incubación continuada con DTT y se llevó a cabo un análisis de la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo a lo largo del tiempo de tratamiento. Este ensayo se realizó con células de los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* (genotipo 1: NCPF 3949; genotipo 2: CBS 2747; genotipo 3: 05-199 y genotipo 4: 05-200), *C. albicans* (SC 5314 y *C. albicans*-CdMET6) y con las cepas atípicas de *C. dubliniensis* (98-277, 95-677 y 94-234). Los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* mostraron una reacción intensa con el AcM 12F7-F2 y ésta se mantuvo elevada, aunque con fluctuaciones, a lo largo del tratamiento de las blastosporas con DTT (Figura 4.49). Contrariamente los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* y la cepa de *C. albicans* SC 5314, mostraron una reacción mínima y esta no presentó modificaciones con el tratamiento de las blastosporas con DTT, mientras que la cepa *C. albicans*-CdMET6 presentó una reacción intermedia que aumentó con el tiempo de tratamiento de las blastosporas con DTT (Figura 4.50).

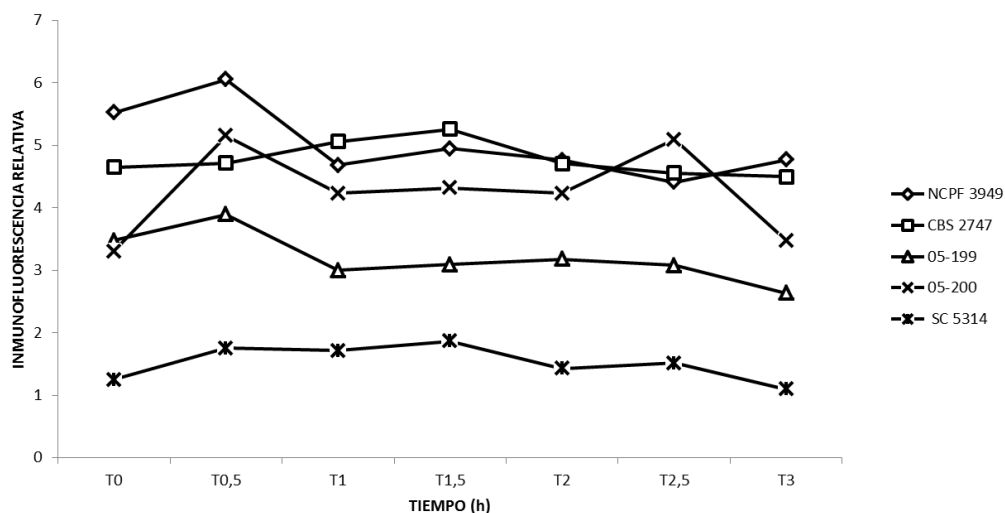


Figura 4.49. Nivel de reacción de las blastosporas de las diferentes cepas de *C. dubliniensis* y *C. albicans* con el AcM 12F7-F2 a lo largo del tratamiento con DTT: (◇) cepa NCPF 3949; (□) cepa CBS 2747; (Δ) cepa 05-199; (x) cepa 05-200 y (*) cepa SC 5314.

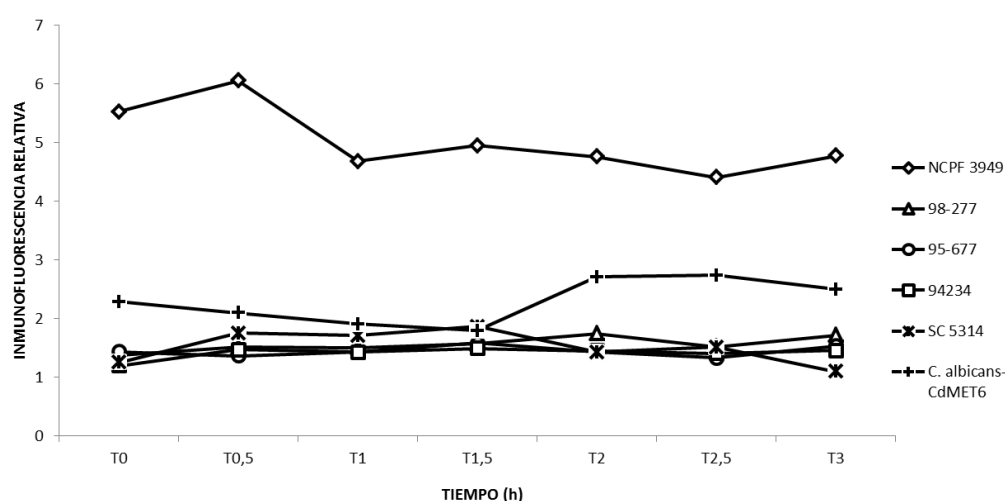


Figura 4.50. Nivel de reacción de las blastosporas de las diferentes cepas de *C. dubliniensis* y *C. albicans* con el AcM 12F7-F2 a lo largo del tratamiento con DTT: (◇) cepa NCPF 3949; (△) cepa 98-277; (○) cepa 95-677; (□) cepa 94-234; (*) cepa SC 5314 y (+) *C. albicans-CdMET6*.

4.6. Localización celular del antígeno reactivo con el AcM 12F7-F2 mediante inmunocitoquímica.

La técnica de inmunocitoquímica en combinación con la microscopía electrónica de transmisión, se utilizó con el fin de visualizar la localización celular en donde se produce la reacción antígeno-anticuerpo. Para poner de manifiesto estos complejos se utilizó un anticuerpo secundario marcado con oro coloidal.

La cepa de referencia de *C. dubliniensis* NCPF 3949 presentó acumulaciones de partículas de oro principalmente asociadas a la cara externa de la pared celular y zonas internas la pared y, en menor proporción en el citoplasma (Figura 4.51).

En las microfotografías de las células de la cepa SC 5314 de *C. albicans* (Figura 4.52) se observó que las partículas de oro se localizaban únicamente dentro del citoplasma mientras que en la cepa de *C. albicans-CdMET6* el marcaje con oro se extendía desde el citoplasma a la pared celular y, en ocasiones, se visualizó alguna partícula de oro unida a la superficie de la pared celular (Figura 4.53).

Por su parte, los tres aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* estudiados mostraron un patrón similar entre ellos y presentaron un marcaje de partículas de oro distribuido por todo el citoplasma y en las capas más internas de la pared celular. Como se ilustra en las figuras 4.54, 4.55 y 4.56, y al contrario de lo registrado para la cepa de *C. dubliniensis* de referencia no se pudieron apreciar partículas de oro en las capas externas de la pared celular.

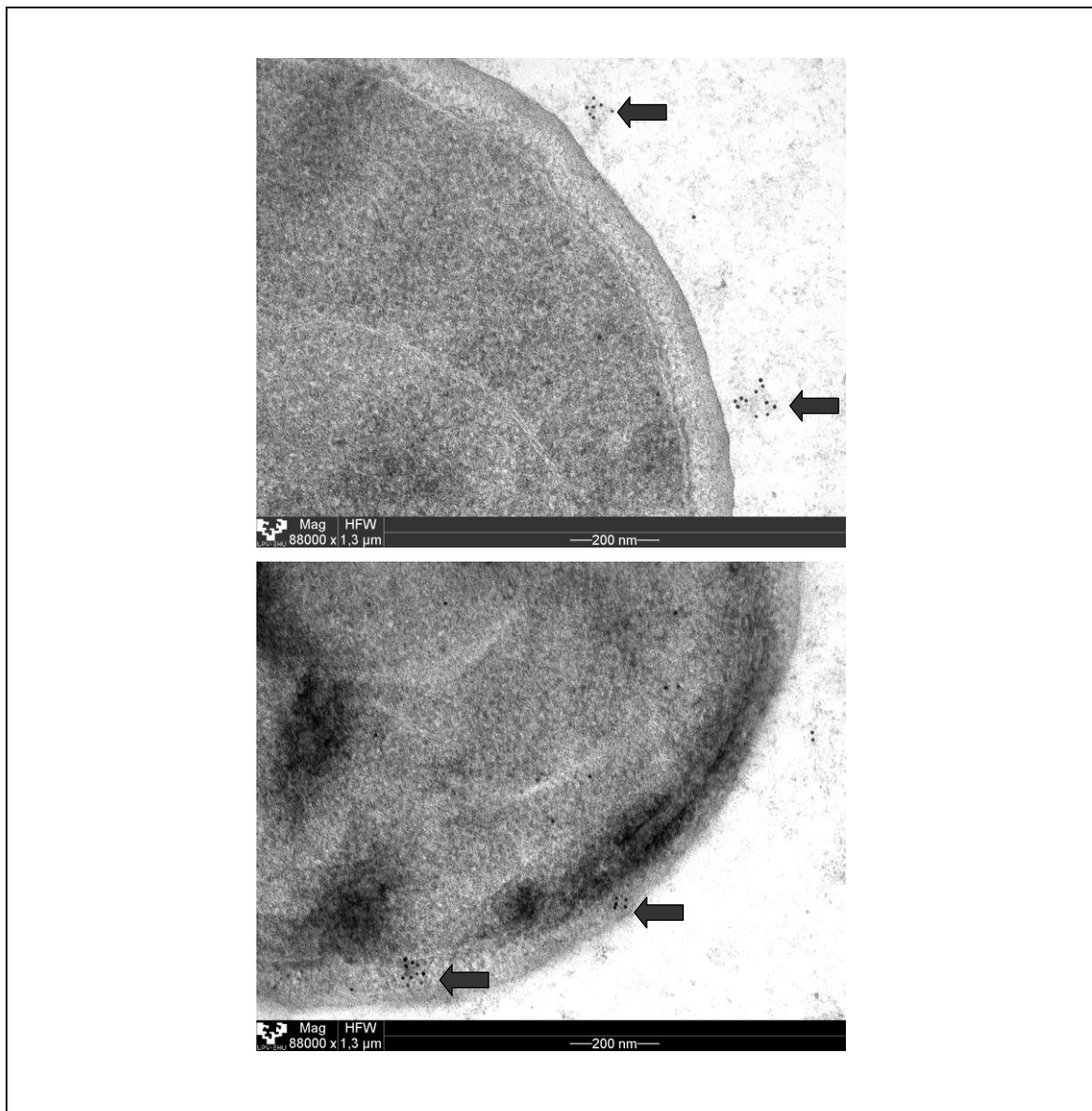


Figura 4.51. Micrografía electrónica mostrando la reacción del AcM 12F7-F2 con *C. dubliniensis* (Cd) NCPF 3949. Marcaje con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal.

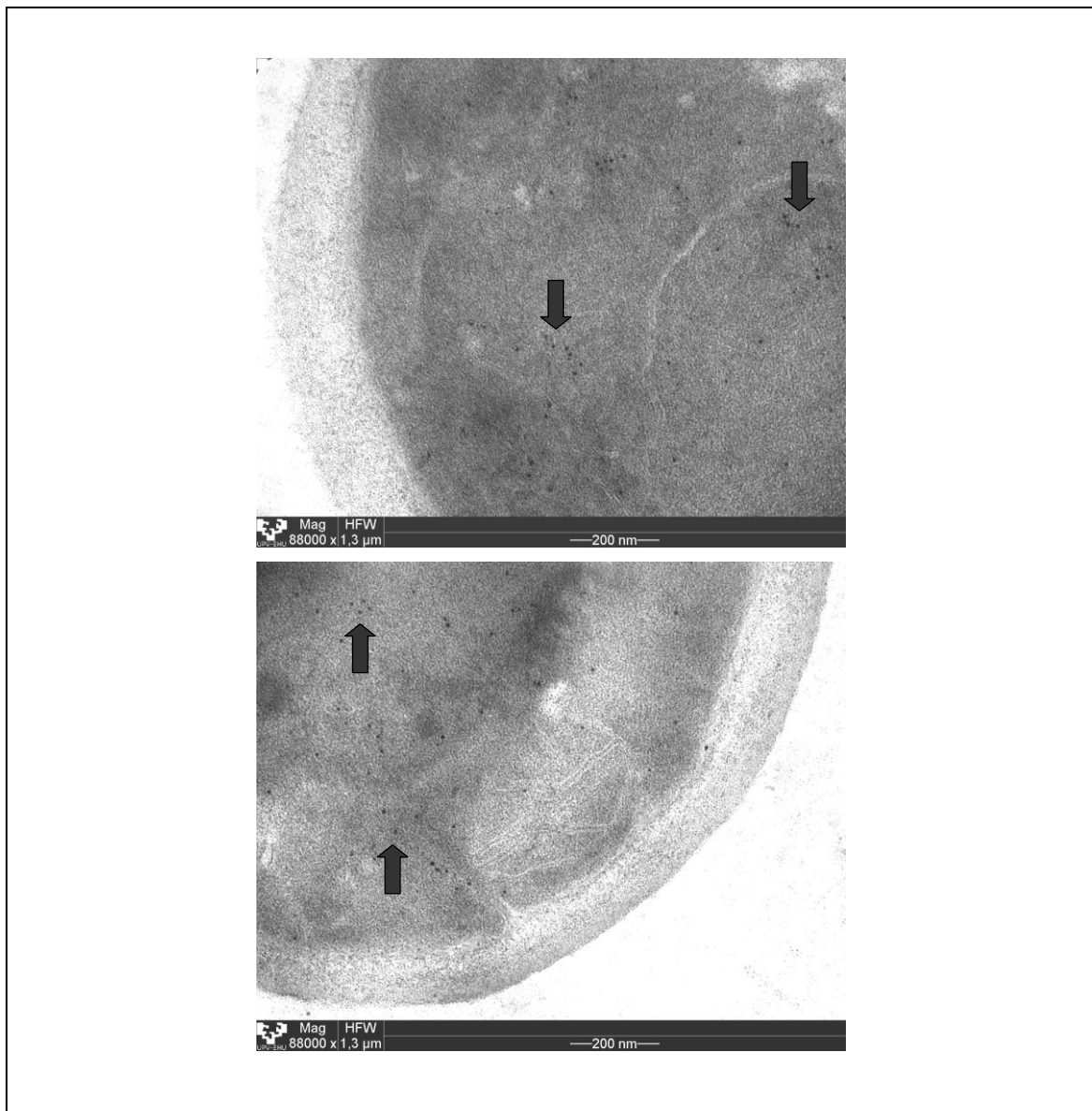


Figura 4.52. Micrografía electrónica mostrando la reacción del AcM 12F7-F2 con *C. albicans* SC 5314. Marcaje con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal.

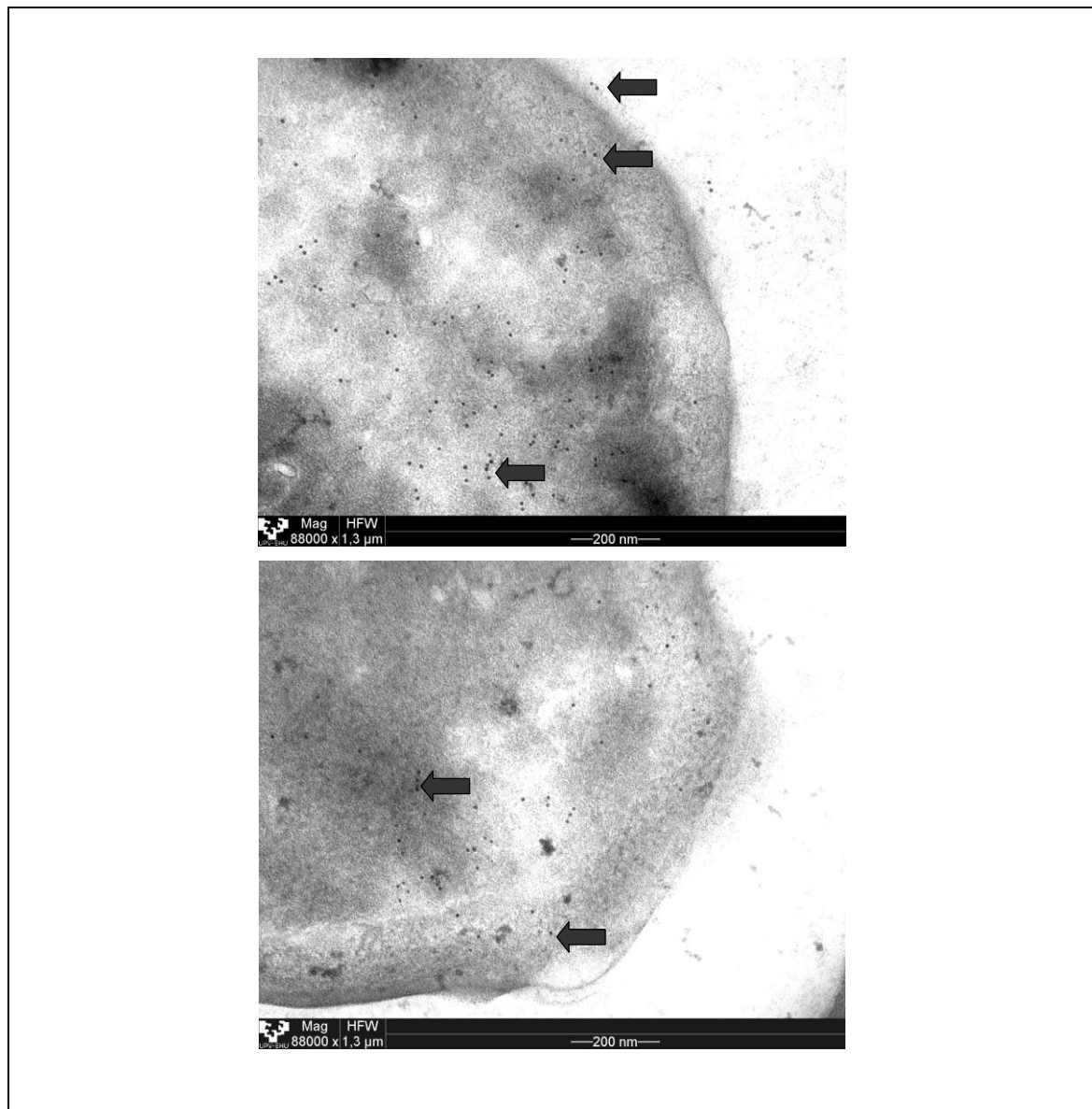


Figura 4.53. Micrografía electrónica mostrando la reacción del AcM 12F7-F2 con *C. albicans*-CdMET6. Marcaje con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal.

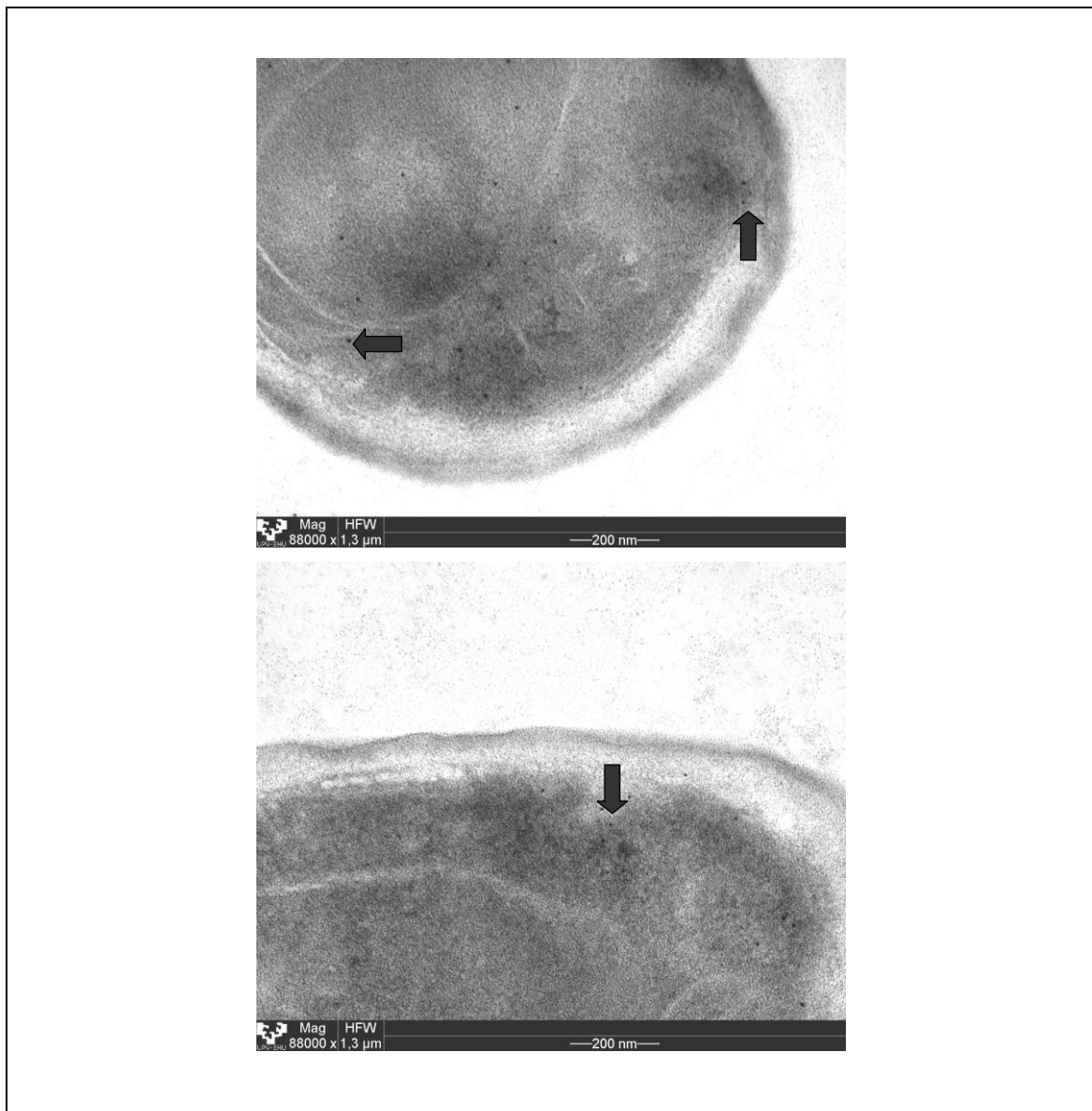


Figura 4.54. Micrografía electrónica mostrando la reacción del AcM 12F7-F2 con Cd 98-277. Marcaje con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal.

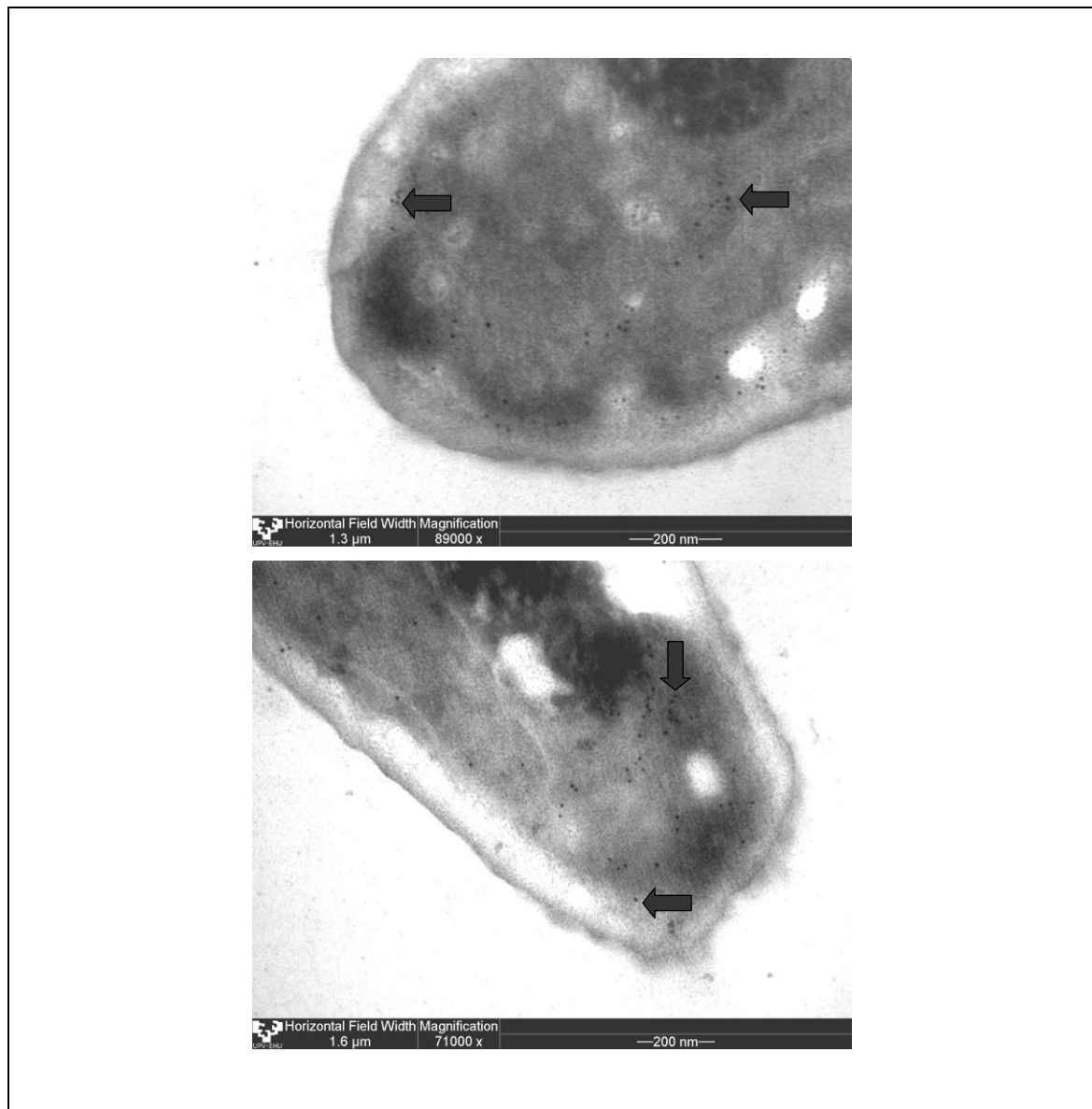


Figura 4.55. Micrografía electrónica mostrando la reacción del AcM 12F7-F2 con Cd 95-677. Marcaje con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal.

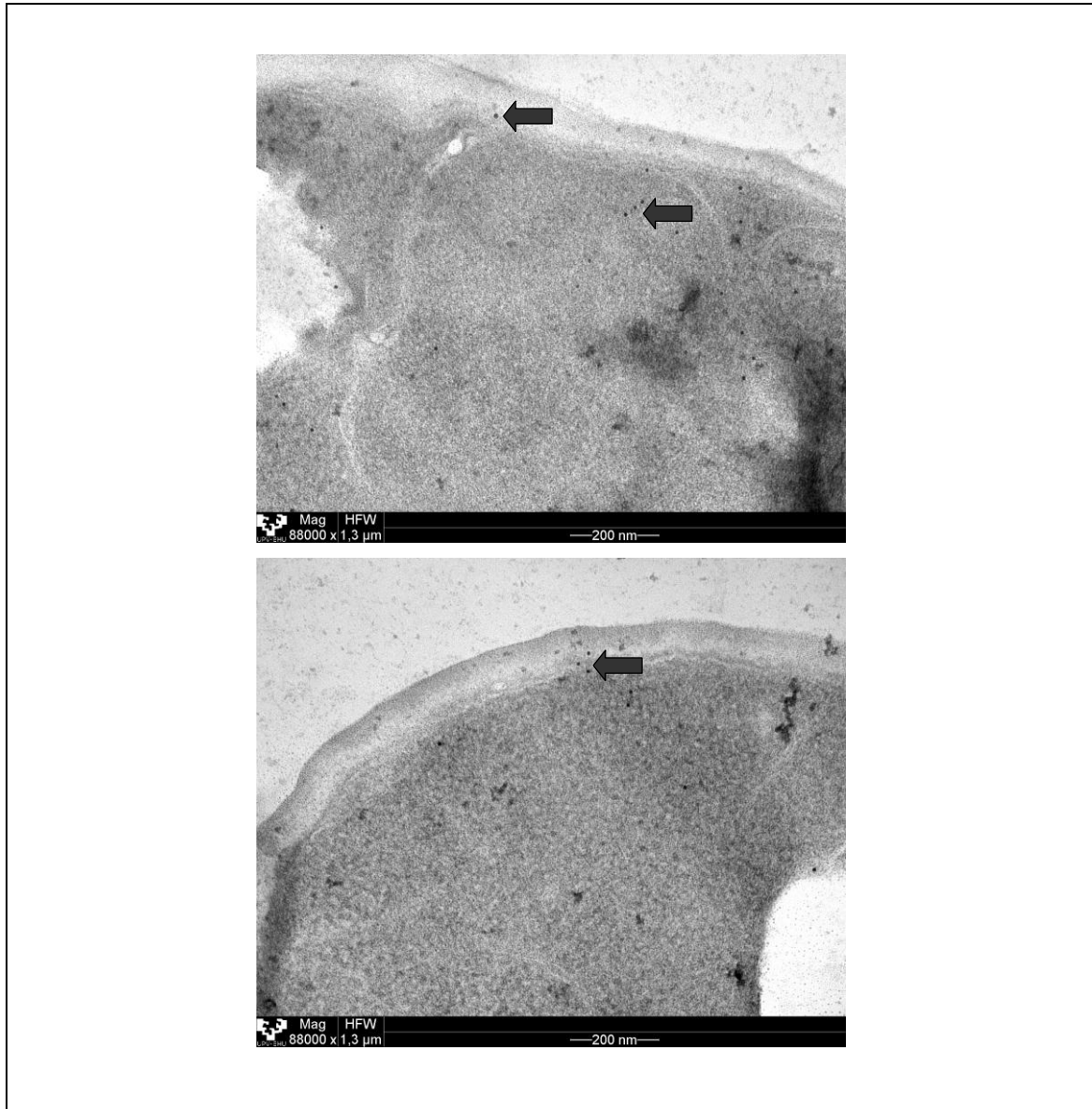


Figura 4.56. Micrografía electrónica mostrando la reacción del AcM 12F7-F2 con Cd 94-234. Marcaje con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal.

5. Discusión

En las últimas décadas, la incidencia de infecciones causadas por hongos en los seres humanos ha aumentado afectando principalmente a individuos con deficiencias en el sistema inmunológico, especialmente a personas infectadas por el VIH y pacientes que reciben tratamientos de quimioterapia que inducen inmunosupresión severa ⁽⁶⁷⁾. Por otra parte, el uso de antibióticos de amplio espectro, la colonización de las mucosas por las levaduras comensales, las terapias médicas que implican procedimientos quirúrgicos invasivos y el uso de catéteres venosos centrales hacen que los pacientes sean vulnerables a infecciones por una gran variedad de hongos patógenos oportunistas, entre los que destacan las especies de *Candida* ^(90,97,117,241,244,247,248,337,354). *Candida albicans*, un hongo común en la microbiota oral y gastrointestinal de personas sanas, es la especie más patógena del género *Candida* y es considerada la causa más frecuente de las candidiasis, tanto superficiales como sistémicas ^(67,220,226). Sin embargo cabe destacar otras especies del género *Candida* patógenas oportunistas como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida guilliermondii* que también son responsables de causar infecciones invasivas ^(124,142,248,264,286,332).

Candida dubliniensis es una especie del género *Candida* descrita en 1995 por Sullivan y cols. ⁽³³²⁾. Desde entonces, son muchos los artículos que han confirmado su amplia distribución en todo el mundo ^(65,67,261,327,330). Este microorganismo está principalmente asociado a personas infectadas por el VIH y pacientes de sida con candidiasis oral recurrente, aunque también se ha descrito, si bien en menor proporción, en individuos sanos y pacientes sin VIH pero con enfermedades severas como la diabetes y el cáncer ^(15,258,301,352).

Con respecto a su nicho anatómico, *C. dubliniensis* se ha aislado en diversas localizaciones del cuerpo humano, incluyendo la cavidad oral, el tracto respiratorio, sangre, sistema nervioso central, la vagina y la piel tanto en pacientes infectados por el VIH como en individuos sanos ^(94,224,258,332).

La existencia de aislamientos de *C. dubliniensis* resistentes a algunos antifúngicos, como el fluconazol o la 5-fluorocitosina, hace que sea necesario realizar una correcta identificación de esta especie para evitar de esta manera fracasos terapéuticos.

En un estudio con 477 aislamientos clínicos que crecieron como colonias verdes en CHROMagar Candida, se identificaron 434 cepas de *C. albicans*, 34 cepas de *C. dubliniensis* y 9 aislamientos no identificables debido a que presentaban un perfil dudoso. Los aislamientos clínicos procedían de diferentes hospitales españoles y universidades europeas y sudamericanas. En nuestro laboratorio, se observó que los nueve aislamientos sin identificar mostraban rasgos atípicos: seis de los aislamientos crecieron como colonias de color rosa (grupo rosa) en el medio cromogénico CHROM-Pal y las otras tres cepas desarrollaron blastosporas pequeñas (grupo blp) con formas ovaladas, alargadas y estrechas. A nuestro entender, hasta ahora, únicamente se ha descrito una cepa de *C. dubliniensis* aislada del torrente sanguíneo que producía blastosporas pequeñas y clamidosporas escasas ⁽²⁹⁰⁾.

Las cepas del grupo rosa fueron aisladas en Argentina a partir de la cavidad oral de diferentes individuos sanos y pacientes con gingivitis oral, mientras que los aislamientos del grupo blp fueron recuperados de la cavidad oral de tres pacientes infectados por el VIH de Granada (98-277) y Bilbao (95-677 y 94-234).

C. dubliniensis es un microorganismo que se aísla comúnmente en cultivos mixtos con *C. albicans* y otras levaduras, y crece fácilmente en agar de dextrosa Sabouraud (SDA) a 30-37 °C, desarrollando colonias de color blanco cremoso similares a las de *C. albicans* ⁽³³²⁾. *C. dubliniensis* y *C. albicans* son especies que comparten muchas características fenotípicas y genotípicas. Estas similitudes suelen dificultar la identificación eficaz de las cepas de *C. dubliniensis* ^(4,5,65,178,250,253,258,326,329-332). Las técnicas para discriminar entre estas dos especies de *Candida* estrechamente relacionadas, se basan en las características fenotípicas, inmunológicas y genotípicas. Con estas técnicas se han identificado 9 cepas de *C. dubliniensis* con alguna característica diferencial dentro del grupo a las que se denominó como cepas atípicas.

Las pruebas fenotípicas son los métodos más utilizados e incluyen el estudio de la capacidad para crecer a 45 °C, el análisis del aspecto del color de las colonias en los medios cromogénicos, así como la capacidad de formar clamidosporas y de asimilar diversos compuestos carbonados.

La incapacidad de *C. dubliniensis* para crecer a temperaturas elevadas (42 a 45 °C) es una de las pruebas fenotípicas comúnmente utilizada para discriminar entre esta especie y *C. albicans* ^(65,326,332). Sin embargo, varios autores han descrito ciertos aislamientos de *C. albicans* que no son capaces de crecer a estas temperaturas (entre el 1% ⁽²⁵³⁾ y el 23% ^(98,161)), mientras que otros autores han notificado ciertos aislamientos de *C. dubliniensis* que son capaces de crecer débilmente a 45 °C (10%) ⁽³²⁶⁾ y a 42 °C (66%) ⁽³⁰⁰⁾.

En nuestro caso ninguno de los aislamientos atípicos fue capaz de crecer a 45 °C. No obstante dada la baja sensibilidad de esta prueba para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, no consideramos que este fenotipo fuera lo suficientemente conclusivo como para poder determinar la especie de estos aislamientos atípicos.

Bajo ciertas condiciones, *C. dubliniensis* puede producir tubos germinales, pseudohifas y clamidosporas de una manera similar a *C. albicans*. La capacidad para formar tubos germinales es un método simple, eficiente y económico que se ha venido utilizando para la identificación de *C. albicans*. La presencia de suero y temperaturas superiores a 33 °C son condiciones favorables para la formación de los tubos germinales en aproximadamente el 95-97% de los aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* ^(42,67,93,105,136,137,179,258,332). En estas condiciones de inducción, los aislamientos del grupo rosa fueron capaces de producir tubos germinales con suero bovino fetal (SBF) al 10% mientras que, este fenotipo no se observó con los aislamientos del grupo blp incluso en presencia de SBF al 100%.

Otro rasgo fenotípico que comparten *C. albicans* y *C. dubliniensis* es la producción de clamidosporas. Los diferentes medios de cultivo tales como agar Staib ^(161,319), agar Pal ^(2,149,151,258,274), agar de harina de maíz ⁽²⁹⁰⁾ o agar de caseína ⁽²⁰⁹⁾ se han desarrollado para estimular la formación de clamidosporas en *C. dubliniensis* con una elevada eficiencia. Sin embargo, varios autores han descrito su preocupación por la baja sensibilidad de estos medios para la formación de clamidosporas, más aún cuando se utilizan como única prueba de identificación de *C. dubliniensis* ^(5,6,81,208). En todos estos medios, los aislamientos del grupo rosa fueron capaces de producir clamidosporas y desarrollaron colonias rugosas, mientras que las cepas del grupo blp fueron incapaces de producir clamidosporas y desarrollaron colonias lisas.

Recientemente, Citiulo y cols. ⁽⁶¹⁾ han desarrollado un nuevo medio elaborado a partir de YNB suplementado con galactosa y metionina que permite diferenciar entre aislamientos de *C. dubliniensis* y *C. albicans*, debido a que *C. dubliniensis* es capaz de producir abundantes clamidosporas, mientras que *C. albicans* crece sin cambiar su morfología.

Estos autores estimaron en 25 mg/l el contenido en metionina necesario para inducir la formación de clamidosporas en aislamientos de *C. dubliniensis* ⁽⁶¹⁾. La cepa de referencia de *C. dubliniensis* no fue capaz formar clamidosporas en ausencia de metionina. Concentraciones iguales o superiores al umbral mínimo de este aminoácido, indujeron la formación de clamidosporas en la cepa de referencia mientras que estas mismas condiciones no fueron efectivas para los aislamientos del grupo blp, que crecieron sin modificar su morfología.

Los resultados de las pruebas de producción de tubo germinal y clamidosporas, indican que los aislamientos del grupo rosa pueden ser identificados como *C. dubliniensis*.

Uno de los medios cromogénicos comerciales ampliamente utilizado para la identificación presuntiva y la diferenciación de las especies de *Candida* en muestras de población mixta es CHROMagar Candida (CAC). En este medio las colonias de *C. dubliniensis* muestran un característico color verde oscuro mientras que las de *C. albicans* son de color verde claro (17,20,45,65,67,95,96,100,107,123,125,195,227,265,351). En el caso de las cepas atípicas del grupo blp, las colonias mostraron diferentes tonalidades de color verde que imposibilitaron su alineamiento con el patrón de referencia. En la literatura están descritos algunos aislamientos de *C. dubliniensis* cuya tonalidad de verde no permite distinguirlos de *C. albicans* (82,343). Por este motivo, algunos autores (250) se muestran críticos con la especificidad de este medio CAC para discriminar entre ambas especies de *Candida*.

Por otra parte, las otras seis cepas atípicas desarrollaron colonias de color rosa y, hasta donde sabemos, únicamente Odds y Davidson (222) habían descrito previamente que algunos aislamientos de *C. albicans* eran capaces de desarrollar colonias de color rosa en el medio CAC.

Con la intención de completar el perfil de los aislamientos atípicos, éstos fueron sembrados en otros medios cromogénicos con mayor sensibilidad para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* como son ChromID Candida y CH-P agar. En medio ChromID Candida, la mayoría de las colonias de *C. albicans* son de color azul cobalto, mientras que *C. dubliniensis* forma colonias de color azul turquesa (83). Cuando utilizamos este medio con las cepas atípicas tampoco fue posible identificar de manera presuntiva la especie de las mismas. En este medio las cepas del grupo blp crecieron de color azul con varias tonalidades y las cepas del grupo rosa de color blanco. En relación a esta última observación, Eraso y cols. (82) también informaron que las colonias de ciertos aislamientos de *C. dubliniensis* mostraban un color blanco en este medio.

Por último, el medio agar CH-P desarrollado por Sahand y cols. (283) permite diferenciar aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* de los de *C. albicans*, en base al color de las colonias y a la capacidad para formar clamidosporas. La eficacia de este medio, que según sus autores, presenta una sensibilidad del 96,2% y una especificidad del 100% (280) para identificar estas dos especies de *Candida*, ha sido verificada por Raut y cols. (270).

En este medio, *C. dubliniensis* desarrolla colonias de color verde azuladas rugosas mientras que las de *C. albicans* son de color verde claro y lisas. En relación a las cepas atípicas, el color de las colonias en el medio CH-P fue similar al obtenido con el medio CAC y respecto al aspecto,

los aislamientos del grupo rosa desarrollaron colonias rugosas, mientras que las de las cepas del grupo blp fueron lisas.

Las cepas de *Candida* son capaces de asimilar diversos compuestos carbonados como única fuente de carbono, y las variaciones en el perfil de utilización de azúcares pueden utilizarse para diferenciar *C. dubliniensis*. La realización de la prueba API ID 32C con los aislamientos atípicos reveló distintos perfiles numéricos, todos ellos coincidentes con los descritos para las cepas de *C. dubliniensis* por Cárdenes-Perera y cols.⁽⁴³⁾ y Moran y cols.⁽²⁰⁶⁾.

A diferencia de la mayoría de las cepas de *C. dubliniensis*, *C. albicans* puede crecer en azúcares como metil- α -D-glucósido, lactato, trehalosa o xilosa^(154,250,285,332). En línea con estas observaciones, las cepas atípicas fueron incapaces de asimilar estos hidratos de carbono, pero la cepa 94-234 (grupo blp) fue capaz de asimilar la trehalosa, y las cepas del grupo rosa fueron capaces de crecer en lactato. La utilización de la trehalosa y del lactato por parte de algunas cepas de *C. dubliniensis* ya había sido registrada previamente por Sullivan y cols.⁽³³²⁾, Pincus y cols.⁽²⁵⁰⁾, Kurzai y cols.⁽¹⁶¹⁾ y Cárdenes-Perera y cols.⁽⁴³⁾.

La identificación de las cepas atípicas en base a las características fenotípicas resultó poco eficiente. La baja especificidad de algunos de los métodos utilizados dificultó la correcta identificación de los aislamientos atípicos. Estos resultados sugieren que las cepas del grupo rosa pueden ser *C. dubliniensis*, mientras que las cepas del grupo blp mantienen un perfil dudoso en cuanto a la especie de *Candida*.

Nuestras observaciones con las cepas atípicas refuerzan la idea de algunos autores para los que los métodos fenotípicos podrían utilizarse de forma orientativa pero no conclusiva a la hora de diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Con el fin de identificar con mayor fiabilidad todos los aislamientos atípicos, recurrimos a los métodos inmunológicos que son más específicos y sensibles que los utilizados anteriormente. Recientemente, se ha comercializado una nueva prueba de aglutinación de látex (Bichro-Dubli[®] Fumouze)⁽¹⁸⁵⁾ que ha sido descrita para la identificación de *C. dubliniensis* con fines diagnósticos.

Las partículas de látex están sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal (AcM) específico (12F7-F2), que reacciona con su antígeno correspondiente de la superficie de la pared celular de *C. dubliniensis*. Los autores que desarrollaron este método observaron que la sensibilidad del ensayo aumentaba hasta el 100% cuando los aislamientos de *C. dubliniensis* se cultivaban en los medios convencionales para levaduras⁽¹⁸⁵⁾.

Los estudios de Marot-Leblond y cols. ⁽¹⁸⁵⁾ y Sahand y cols. ⁽²⁸¹⁾ han evaluado la eficacia de esta prueba que presenta una sensibilidad del 97,8% y una especificidad del 100%; Chryssanthou y cols. ⁽⁵⁹⁾ confirmaron estos resultados y validaron este ensayo para su uso rutinario en los laboratorios de microbiología clínica. Por otra parte, los resultados de Marcos-Arias y cols. ⁽¹⁸²⁾ y Khlif y cols. ⁽¹⁵²⁾ han corroborado la eficacia de esta prueba para el diagnóstico.

En el ensayo de aglutinación los aislamientos del grupo rosa fueron clasificados como *C. dubliniensis*, mientras que las cepas del grupo blp resultaron negativas para la prueba. Confirmando para este último subgrupo las observaciones previas de Sahand y cols. ⁽²⁸²⁾.

Los autores que desarrollaron este AcM 12F7-F2 han descrito la especificidad de este AcM para distinguir cepas de *C. dubliniensis* de otras especies de hongos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). En relación a esta observación, se llevó a cabo un ensayo de IFI con el AcM 12F7-F2 frente a los aislamientos del grupo rosa que revelaron una intensa fluorescencia mientras que ninguno de los aislamientos del grupo blp mostró marcaje. Sin embargo, los aislamientos del grupo blp mostraron una intensa reacción con un suero policlonal de conejo contra *C. dubliniensis* desarrollado en nuestro laboratorio del que se habían retirado los anticuerpos reaccionantes con los antígenos de *C. albicans* para dejar únicamente los anticuerpos específicos contra antígenos de *C. dubliniensis* ⁽²²⁾.

La caracterización de las cepas del grupo rosa mediante las pruebas de látex e IFI con el AcM 12F7-F2 indicaba que los aislamientos de este grupo podían ser identificados como *C. dubliniensis*, mientras que los aislamientos del grupo blp pertenecerían a una especie diferente de *C. dubliniensis*. Sin embargo, la reacción mostrada por las cepas del grupo blp con el antisuero policlonal aumentó la incertidumbre de esta identificación presuntiva; el origen de esta disparidad podría ser debido a la naturaleza policlonal de estos anticuerpos que estarían reconociendo otros antígenos específicos de *C. dubliniensis*, diferentes al reconocido por el AcM 12F7-F2.

En la actualidad, las pruebas más fiables para discriminar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se basan en técnicas de biología molecular, tales como ADN fingerprinting, RAPD, PFGE y PCR-RFLP. Estas técnicas son un tanto laboriosas y su coste es elevado, sin embargo, tienen algunas ventajas como la reproducibilidad, y la velocidad en el diagnóstico, al tiempo que son apropiadas para los estudios epidemiológicos.

Varios autores (Bosco-Borgeat y cols. ⁽²⁵⁾ Gasparoto y cols. ⁽¹⁰¹⁾ y Khlif y cols. ⁽¹⁵²⁾) han verificado la idoneidad de un método de amplificación mediante la técnica de la PCR en base a pequeños cambios en la secuencia del gen *HWP1* para identificar aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*. Cuando aplicamos este método para el conjunto de las cepas atípicas, todas ellas fueron identificadas como *C. dubliniensis*.

La identificación de las cepas atípicas como *C. dubliniensis* fue confirmada posteriormente mediante la técnica de la PCR múltiple basada en las diferencias en la secuencia genómica de la topoisomerasa II (Kanbe y cols. ^(145,174)) y de las regiones ITS1 e ITS2 del ARNr (Luo y cols. ⁽¹⁷⁴⁾) que permiten la identificación de aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* incluso en cultivos mixtos. Marcos-Arias y cols. ⁽¹⁸²⁾ y Sahand y cols. ⁽²⁸⁰⁾ ratificaron la especificidad de estos métodos para la identificación de aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*.

De acuerdo con una revisión reciente referente a la taxonomía de las levaduras ⁽¹¹⁰⁾, la secuenciación del dominio D1/D2 en el ADN ha sido adoptada como el método molecular más preciso, y por tanto recomendado, para la identificación de las levaduras de relevancia clínica ⁽²⁶⁹⁾. La secuencia de esta región en las cepas atípicas de *C. dubliniensis* reveló una homología superior al 98% con la cepa de referencia de *C. dubliniensis* NCPF 3949.

La caracterización del conjunto de las cepas atípicas mediante los métodos de biología molecular permitió confirmar su identidad como *C. dubliniensis*.

La completa caracterización de las cepas atípicas de *C. dubliniensis* contempló la realización de otros estudios de genotipo, de tipo de apareamiento (*Mating Type Like -MTL-*) y de sensibilidad a los fármacos antifúngicos. El estudio de genotipo se llevó a cabo mediante la técnica de la PCR con cebadores específicos que amplifican las regiones de los espaciadores transcritos internos que flanquean el gen que codifica para la subunidad del 5,8S ARNr (Gee y cols. ⁽¹⁰²⁾). Las cepas del grupo blp pertenecían al genotipo 1, que es el más frecuente entre los aislamientos de *C. dubliniensis* ^(35,102), mientras que los aislamientos atípicos del grupo rosa de *C. dubliniensis* pertenecían al genotipo 2, que es el segundo en frecuencia según los mismos autores.

La plasticidad fenotípica de *C. albicans*, que incluye el intercambio entre diferentes morfologías, contribuye a su capacidad para colonizar e infectar prácticamente todo el cuerpo humano. Un caso particular es el intercambio blanco-opaco, una transición reversible entre la morfología normal de levadura (blanco) y un tipo de célula alargada (opaco) que es la forma con capacidad de apareamiento de este hongo. El cambio blanco-opaco está controlado por el locus

MTL, que en la mayoría de las cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* está definido por dos alelos, *MTLa* y *MTLa*⁽²⁰⁷⁾. El análisis del locus *MTL* para las cepas atípicas de *C. dubliniensis* se llevó a cabo mediante la técnica de la PCR basada en las diferencias de las secuencias genómicas de *MTLa2* y *MTLa1*⁽²⁷⁸⁾. Las nueve cepas atípicas de *C. dubliniensis* fueron clasificadas como heterocigóticas *MTLaa*, al igual que las cepas de referencia de los genotipos 1 y 2 de *C. dubliniensis*, siendo este tipo de apareamiento el más frecuente entre las cepas de esta especie⁽²⁶⁶⁾. A diferencia de los genotipos 1 y 2 de *C. dubliniensis* que fueron clasificados como heterocigóticos, las cepas de referencia de los genotipos 3 y 4 de *C. dubliniensis* fueron clasificados como homocigóticos *MTLaa* y *MTLaa* respectivamente.

Para finalizar la caracterización de las cepas atípicas de *C. dubliniensis* se realizó un estudio de sensibilidad a los fármacos antifúngicos.

La mayoría de los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* son sensibles a los antifúngicos de uso común, tales como los azoles^(57,66,104,175,206,246,284), la caspofungina, la anfotericina B^(57,66,194,239,245,246,267,335) y la 5-fluorocitosina. Hasta la fecha, sólo se han identificado dos patrones de resistencia a los fármacos antifúngicos en aislamientos de *C. dubliniensis*. Los casos de resistencia al fluconazol se han descrito en varios centros hospitalarios donde los pacientes habían sido tratados durante largo tiempo con este fármaco, especialmente en pacientes infectados por VIH^(60,141,146,189,205,206,268,277), mientras que, hasta el momento, todos los aislamientos clínicos de *C. dubliniensis* que presentan resistencia a 5-fluorocitosina pertenecen a los genotipos 3 y 4^(3,4,66,192).

Se aplicó el ensayo comercial Sensititre YO8 a las cepas atípicas y se encontró que todas ellas mostraban sensibilidad al conjunto de fármacos ensayados, principalmente a fluconazol y anfotericina B. Por lo tanto, parece poco probable que la aparición de estas cepas atípicas de *C. dubliniensis* constituya un problema para la terapia clínica antifúngica.

Durante el proceso de identificación y caracterización de las cepas atípicas de *C. dubliniensis*, el grupo blp mostró dos características fenotípicas diferentes a las observadas en los demás aislamientos y de las descritas para esta especie: la incapacidad para formar clamidosporas y la falta de reconocimiento por un anticuerpo monoclonal altamente específico para esta especie. Por esta razón, centramos nuestro estudio en la caracterización del comportamiento específico de este subgrupo de aislamientos atípicos de *C. dubliniensis*.

La producción de clamidosporas es un proceso morfogénico que se induce en medios con bajo contenido de nutrientes, condiciones de limitación de oxígeno y bajas temperaturas. La formación de las clamidosporas está asociada con variaciones en la expresión génica. Varios estudios genéticos han identificado diversos genes que están implicados directamente en el desarrollo de clamidosporas. Actualmente, se sabe que la inactivación de cada uno de los genes *HOG1*, *EFG1*, *SUV3*, *ISW2*, *RIM13* y *SCH9* da como resultado la incapacidad o el retraso en el proceso de formación de las clamidosporas en *C. albicans* ^(10,217,313,316), sin embargo la reconstitución de todos estos mutantes inactivos con una copia del gen recupera el fenotipo silvestre.

Recientemente se ha descrito un mutante condicional en el gen esencial *OLE1*, que es capaz de crecer normalmente con bajos niveles de Ole1p pero presenta defectos en la formación de clamidosporas, lo que induce a pensar que se necesita un nivel umbral de expresión de la enzima Ole1 para conseguir el desarrollo normal de las clamidosporas ⁽¹⁵⁸⁾.

En esta misma línea, en un análisis funcional del gen *BMH1*, se ha demostrado que se requiere un umbral estricto de expresión de este gen para que se desarrolle el programa de formación de clamidosporas ⁽²³²⁾ y ese nivel umbral no se alcanza en el mutante heterocigoto portador de una sola copia activa del gen.

Por otra parte, también está bien establecido que la expresión diferencial del gen *NRG1* es la responsable del fenotipo de formación de clamidosporas en *C. albicans* y *C. dubliniensis*, de modo que *C. albicans* mantiene el nivel de expresión de *NRG1* para continuar su crecimiento en forma de levadura mientras que, en las mismas condiciones, *C. dubliniensis* reduce la expresión de *NRG1* consiguiendo inducir el programa de desarrollo de clamidosporas ^(204,316,317).

Todas estas evidencias y la incapacidad de producir clamidosporas que mostraron las cepas del grupo blp de *C. dubliniensis* fueron la base para realizar un análisis de los niveles de expresión de varios de estos genes relacionados con la formación de clamidosporas tanto en este grupo de aislamientos como en otras cepas de referencia de *C. dubliniensis*.

En nuestro estudio se ha observado que en las cepas de referencia de *C. dubliniensis* los niveles de expresión de los genes *OLE1*, *EFG1*, *HOG1*, *RIM13* y *SUV3* fueron más elevados en condiciones de inducción de clamidosporas que en condiciones normales de crecimiento como blastosporas. Este aumento de expresión fue variable con cada uno de los genes registrándose incrementos entre el 13% y el 100% en los genes *OLE1* y *EFG1*, en los genes *HOG1* y *SUV3* el incremento fue de aproximadamente el 300%, y en el caso concreto del gen *RIM13* el aumento de expresión alcanzó casi el 400%. En cambio, el nivel de expresión de los genes *NRG1* y *SCH9* disminuyó en condiciones de inducción de clamidosporas respecto al crecimiento levaduriforme con valores que oscilaban entre el 35 y el 50%.

Cabe destacar que la expresión del gen *NRG1* también disminuyó en condiciones de inducción de clamidosporas, respecto al estado de levadura, en todas las cepas del grupo blp. Este perfil de expresión está en concordancia con la tendencia de *C. dubliniensis* a subexpresar este gen para inducir la formación de clamidosporas^(204,316,317). En cambio, en claro contraste con las cepas de referencia de *C. dubliniensis*, las cepas del grupo blp mostraron una tendencia a disminuir el nivel de expresión de los demás genes, con la excepción de *EFG1* y *OLE1*, cuyos niveles se mantuvieron o aumentaron en este grupo de cepas atípicas.

El análisis comparativo del nivel de expresión de todos los genes en cada una de las cepas del grupo blp respecto a las cepas de referencia de *C. dubliniensis* en condiciones de inducción de clamidosporas arrojó resultados poco uniformes: Por ejemplo, en la cepa 98-277 el nivel de expresión de los genes *EFG1*, *OLE1* y *SUV3* alcanzó o superó los niveles registrados para las cepas de referencia de *C. dubliniensis* en condiciones de inducción de clamidosporas, mientras que los niveles de expresión de los genes *HOG1*, *RIM13*, *ISW2* y *SCH9* apenas alcanzan el 50% del nivel registrado en las cepas de referencias.

En la cepa 95-677 cabe destacar que el nivel de expresión de todos los genes estudiados en ningún caso alcanzó el nivel registrado por las cepas de referencia de *C. dubliniensis* en condiciones de producción de clamidosporas. Los niveles de expresión de los genes *OLE1* y *EFG1* alcanzan aproximadamente el 80% del nivel de las cepas de referencia. Los niveles de expresión en el caso de *HOG1*, *RIM13*, *SUV3*, *ISW2* y *SCH9* no llegaron al 50% respecto a las cepas de referencia. Finalmente el nivel de expresión del gen *RIM13* apenas fue detectable por la técnica, mientras que en la cepa de referencia CBS 8501 se alcanzaron niveles elevados en condiciones de producción de clamidosporas.

Por último, en la cepa 94-234, sólo la expresión del gen *HOG1* parece seguir el patrón de las cepas de referencia. El resto de los genes presentaron unos niveles inferiores al 50% de los niveles registrados en las cepas de referencia de *C. dubliniensis* en condiciones de producción de clamidosporas. Cabe destacar que el nivel de expresión del gen *EFG1*, que codifica para un factor de transcripción que actúa como regulador de varios procesos morfogénicos^(168,313,314,322), apenas alcanza el 10% del nivel observado en las cepas de referencia en las mismas condiciones. En el caso de requerir un nivel umbral de *EFG1* para el desarrollo de clamidosporas, los bajos niveles de expresión alcanzados en esta cepa no serían adecuados para la inducción de este proceso.

En todas las cepas blp de *C. dubliniensis* el nivel de expresión de uno o más de estos genes esenciales para el desarrollo de clamidosporas está por debajo del 50% del nivel de expresión de las dos cepas de referencia de *C. dubliniensis*. Si se requiere un umbral de expresión de todos estos genes para la formación de clamidosporas en *C. albicans* ^(10,217,313,316), por analogía, la subexpresión de uno o más de ellos impediría el desarrollo de estas estructuras en *C. dubliniensis*.

En cuanto a la identificación específica de *C. dubliniensis*, diversos autores han descrito anticuerpos monoclonales (AcMs) dirigidos frente a distintos componentes de la pared del género *Candida*, sin embargo, hasta el momento únicamente Marot-Leblond y cols. ⁽¹⁸⁵⁾ han desarrollado un AcM altamente específico dirigido frente a un antígeno de superficie de las células de *C. dubliniensis*. Los intentos de identificación del antígeno reconocido por este AcM condujeron a la conclusión de que el epítipo específico residía en una fracción de proteína de *C. dubliniensis* que no estaba representada en *C. albicans*. Sin embargo, no se pudo identificar la proteína diana por inmunodetección, probablemente como consecuencia de las condiciones drásticas del método de extracción utilizado por Marot-Leblond y cols.

En nuestro estudio nos propusimos identificar este componente de *C. dubliniensis* aplicando un método de extracción de la pared celular con DTT ⁽³⁰⁹⁾ que conserva inalterada la mayor parte de las proteínas extraídas ^(48,52,53,199,262,309). Los primeros ensayos de inmunodetección realizados con el AcM 12F7-F2 frente a los extractos DTT revelaron dos componentes proteicos, uno de 50 kDa común a todas las cepas estudiadas y otro de más de 200 kDa (>200 kDa) presente únicamente en la cepa de referencia de *Candida dubliniensis*.

Los resultados indicaban que el componente de >200 kDa reconocido por el AcM podría ser su diana específica, ya que esta proteína estaba ausente en los tres extractos del grupo blp de *C. dubliniensis*. Dado el elevado contenido glucídico del componente de >200 kDa, previamente a la secuenciación, fue necesario realizar un proceso de desglicosilación que dio como resultado una banda inmunoreactiva de 90 kDa que fue identificada como metionina sintasa independiente de cobalamina de *C. dubliniensis* (CdMet6).

La metionina sintasa es una enzima citoplásmica que cataliza la transferencia de un grupo metilo del 5-metil-tetrahidrofolato a homocisteína formando metionina. Esta enzima forma parte de una amplia familia de proteínas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos azufrados. Esta sintasa es esencial para el crecimiento y es necesaria para limitar la toxicidad de la homocisteína en células de *C. albicans* ⁽³²⁵⁾. Recientemente, se ha descrito que Met6p esta implicada en la virulencia, la capacidad antigénica y en la morfogénesis de la pared celular de *C. albicans*

(37,38,71,255,257,260). En este mismo sentido, Met6p se ha descrito como un biomarcador adecuado para la detección precoz de la candidiasis invasiva ⁽²⁵⁴⁾ y se considera que podría ser una nueva diana para el desarrollo de agentes antifúngicos.

La falta de reacción de las cepas del grupo blp de *C. dubliniensis* con el AcM 12F7-F2, podría deberse a la presencia de una versión alterada de la proteína CdMet6 en estas cepas atípicas. Para comprobar esta hipótesis a nivel genético, se determinaron las secuencias genómicas completas de *MET6* de *C. dubliniensis* (*CdMET6*) que codifican para la proteína CdMet6 de las tres cepas atípicas del grupo blp de *C. dubliniensis*. A la vista de que las secuencias génicas de estas cepas no mostraban diferencias respecto a la secuencia de referencia, se consideró la posible influencia de variaciones en los niveles de expresión de este gen, encontrando cambios significativos sólo en la cepa 98-277 cuyos niveles de expresión estaban notablemente reducidos en relación con la cepa de referencia.

Las evidencias genéticas precedentes no justificaban el perfil inmunológico de las cepas blp, por lo que para confirmar que CdMet6 era la diana del AcM 12F7-F2 recurrimos a una estrategia alternativa. Ante la imposibilidad de disponer un mutante de *C. dubliniensis* defectivo en el gen *CdMET6*, por ser un gen esencial ⁽³²⁵⁾, se optó por construir una cepa heteróloga de *C. albicans* que incorporara en su genoma este gen de *C. dubliniensis* a la que se denominó *C. albicans-CdMET6*.

La cepa heteróloga no reaccionó con el AcM 12F7-F2 tanto en el ensayo de IFI como en la prueba de aglutinación. Sin embargo en el extracto de su pared celular, por inmunodetección, el AcM 12F7-F2 reconoció una banda de 90 kDa que estaba ausente en la cepa parental de *C. albicans*. Considerando que tras la desglicosilación del compuesto de > 200 kDa de la cepa de referencia de *C. dubliniensis* se detectó una banda de 90 kDa, identificada como CdMet6p, parece razonable pensar que la proteína de 90 kDa de la cepa heteróloga también sea CdMet6p.

Los datos obtenidos mediante los ensayos de IFI y la prueba de aglutinación con el AcM 12F7-F2, parecen indicar que la cepa heteróloga no expresaba la proteína CdMet6 en la superficie de la pared celular, sin embargo el análisis de los extractos de pared por inmunodetección con el AcM sugiere que esta proteína estaría situada en capas internas de la pared celular. Esta supuesta ubicación de la proteína en capas internas de la pared de la cepa heteróloga estaría determinada por su bajo grado de glicosilación, que según el modelo de Pavia y cols. ⁽²³⁵⁾, impediría la migración de glicoproteínas hacia capas exteriores.

Esta misma hipótesis de que la proteína CdMet6 expresada en las cepas atípicas estuviera enmascarada en las capas profundas de la pared justificaría la falta de reacción con el AcM por IFI o aglutinación, de forma similar a lo encontrado para la cepa heteróloga.

La electroforesis bidimensional (2D-PAGE) de los extractos DTT de la pared de estas cepas permitió analizar su composición con mayor sensibilidad y precisión. La secuenciación de los componentes inmunoreactivos con el AcM 12F7-F2 permitió identificar ocho proteínas incluyendo: metionina sintasa (Met6), enolasa (Eno1), fosfoglicerato quinasa (Pgk1), fosfoglicerato mutasa (Gpm1), Exo-1, 3-β-glucanasa (Exg2), proteína 14-3-3 (Bmh1), proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y la proteína 29 kDa de unión de IgE (ThiJ/Pfp1).

Estas proteínas no se detectaron uniformemente en todas las cepas estudiadas (tabla 4.10 del apartado de resultados). Este es el caso, por ejemplo, de la proteína Bmh1, una proteína esencial para el crecimiento y la filamentación de *Candida* ⁽⁶⁴⁾, que solamente fue detectada en las cepas atípicas 98-277 y 95-677 de *C. dubliniensis*; o de las proteínas Hsp70 y ThiJ/Pfp1 que fueron detectadas únicamente en la cepa heteróloga. Tanto la proteína Hsp70, con carácter inmunogénico a nivel de la pared celular de *C. albicans* ⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾ como la ThiJ/Pfp1p, que no tiene ninguna función descrita hasta la fecha ^(294,295), son inducidas en condiciones de estrés, por lo que parecía razonable que estas proteínas sólo se hubieran manifestado en la cepa heteróloga. En esta última cepa también se detectaron otras dos proteínas, Eno1 y Met6. La enzima glicolítica Eno1, considerada un biomarcador importante de la candidiasis invasiva ^(112,198,345,346), se localizó igualmente en el resto de cepas de *C. dubliniensis* y *C. albicans* ensayadas, a excepción de la cepa atípica 95-677. En el caso de la sintasa Met6, como era de esperar fue inmunoreactiva para la cepa de referencia de *C. dubliniensis* (CdMet6) y para la cepa heteróloga de *C. albicans*, no así para su cepa parental. Sorprendentemente, esta proteína apareció en el patrón de reacción con el AcM 12F7-F2 de las tres cepas atípicas de *C. dubliniensis*. La disparidad de los resultados de la inmunodetección de los extractos DTT de pared de estas cepas atípicas separados por electroforesis monodimensional y bidimensional, podría explicarse por la capacidad de esta segunda técnica para analizar una mayor cantidad de proteína que estimamos del orden de 16 veces en nuestro caso.

Las proteínas Pgk1, Gpm1 y Exg2, que están involucradas en diversas funciones de la pared celular ^(49,52,289), se detectaron exclusivamente en la cepa de referencia de *C. dubliniensis* a excepción de la Pgk1p que también se detectó en la cepa 95-677. De este modo el extracto de pared de la cepa de referencia de *C. dubliniensis* fue la muestra con más proteínas reconocidas por el AcM 12F7-F2.

Los resultados de Eno1p, Gpm1p, Pgk1p y Hsp70p en nuestro análisis deberían interpretarse con la debida precaución, debido a la frecuente identificación de estas clases de proteínas en los experimentos de proteómica 2D-PAGE. Sin embargo, tal y como advierten Petrak y cols. ⁽²⁴³⁾ estas consideraciones refuerzan el hallazgo de las proteínas Met6, Exg2 y Bmh1 como componentes significativos de las muestras. Considerando que Met6 fue la única proteína inmunoreactiva con el AcM 12F7-F2 en todas las muestras de *C. dubliniensis*, así como en la cepa heteróloga de *C. albicans*, la sintasa Met6 se postula como la diana principal del anticuerpo monoclonal 12F7-F2.

La comparación de las secuencias peptídicas de las proteínas reconocidas por el AcM 12F7-F2 reveló tres regiones de alta homología: una región de 7 aminoácidos para CdMet6, ThiJ/Pfp1 y Hsp70, otra de 22 aminoácidos compartida por las proteínas CdMet6, Gpm1 y Eno1, y la última de 11 aminoácidos para CdMet6, Pgk1 y Eno1. En relación a estas dos últimas secuencias aminoacídicas, ambas estaban localizadas en el extremo C-terminal de CdMet6p y se comprobó que eran altamente inmunogénicas por lo que podrían constituir el epítipo reconocido por el AcM 12F7-F2.

Los resultados comentados hasta este punto apoyan la hipótesis de que el antígeno reconocido por el AcM 12F7-F2 se expresa en las capas profundas de la pared celular de las cepas atípicas blp de *C. dubliniensis*. Como objetivo final del trabajo, nos propusimos localizar con mayor precisión el antígeno específico de *C. dubliniensis* que reacciona con el AcM.

La expresión y la distribución de proteínas en la pared celular depende de varios factores, tales como la morfología celular, las condiciones de crecimiento, las propiedades hidrófobas de la superficie celular, etc... ^(53,169). Por consiguiente, algunas proteínas antigénicas están localizadas en la parte más profunda de la pared celular, mientras que otras parecen estar irregularmente situadas dentro de esta estructura de múltiples capas ⁽²⁶²⁾.

La microscopía confocal permite conocer la localización celular de un determinante antigénico o proteína mediante el uso de anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes. La cepa tipo de *C. dubliniensis* mostró la máxima fluorescencia indicando la presencia del antígeno en la superficie de la célula, mientras que en las cepas del grupo blp y en la cepa parental de *C. albicans* no se observó fluorescencia, lo que apoyaría la hipótesis que propugna la localización del antígeno en capas profundas de la pared celular de estas últimas cepas.

En el caso de la cepa heteróloga el marcaje fluorescente fue moderado, lo que podría indicar bien que la abundancia de este antígeno en la superficie de la pared celular era menor o que el antígeno se localizaba en una capa intermedia de la pared dificultando el acceso del AcM.

Los resultados de microscopía confocal se vieron confirmados mediante el estudio de la capacidad de reacción del AcM con células que habían sido tratadas con DTT para descubrir sus componentes de la pared de forma secuencial. Así, la reacción intensa sostenida a lo largo del tratamiento de la cepa tipo de *C. dubliniensis* sugería que el antígeno estaba localizado en todas las capas de la pared celular. En el caso de la cepa heteróloga *C. albicans*-*CdMET6* la reacción inicial fue débil incrementándose a lo largo del tratamiento con DTT hasta alcanzar niveles moderados, lo que se correspondería con una localización del antígeno en las capas intermedias de la pared. Finalmente, las cepas atípicas blp de *C. dubliniensis* y cepa de tipo de *C. albicans*, no mostraron reacción con el AcM a lo largo del tratamiento con DTT, lo que podría interpretarse como que el antígeno estaba localizado en las capas más profundas de la pared o en el interior celular.

La técnica de inmunomicroscopía electrónica con anticuerpos monoclonales específicos ha permitido la localización precisa de numerosas proteínas celulares ^(33,34,167,238,320). La utilización de este enfoque para determinar con mayor precisión la localización exacta del antígeno reconocido por el AcM 12F7-F2 en las cepas atípicas y cepas de referencia contribuyó a reforzar la hipótesis que veníamos defendiendo. Las células de la cepa de referencia de *C. dubliniensis* presentaban el antígeno principalmente en la superficie y zonas internas de la pared celular y, en menor medida dentro de la célula; en cambio la cepa de referencia de *C. albicans* mostraba el antígeno distribuido por el citoplasma. La incorporación del gen *CdMET6* a la cepa de *C. albicans* amplió la reacción antigénica del citoplasma a la pared celular, y ocasionalmente a su superficie, imitando parcialmente el comportamiento de la cepa parental de *C. dubliniensis*.

Por último, en las cepas atípicas blp de *C. dubliniensis* la reacción con el AcM se localizaba en el citoplasma y en las capas más profundas de la pared, y en ningún caso afectaba a la superficie externa.

Todas las evidencias acumuladas hasta el momento explicarían la falta de reacción de las cepas atípicas blp en la prueba de aglutinación Bichro-Dubli Fumouze, basada en el AcM 12F7-F2.

La existencia de cepas atípicas de *C. dubliniensis*, que no pueden ser identificadas por los métodos convencionales utilizados en el laboratorio clínico, plantea la necesidad de recurrir a técnicas más sofisticadas, como las basadas en la biología molecular, para llegar a la correcta identificación de este tipo de aislamientos atípicos de *C. dubliniensis*. Los estudios de

sensibilidad indican que estas cepas no presentan resistencias a los antifúngicos de uso habitual en la clínica, por lo que no parecen suponer un problema adicional en este aspecto.

Las características del grupo de cepas atípicas blp de *C. dubliniensis* que se han descrito en este proyecto las cualifican como posibles herramientas para futuros estudios de procesos morfogénicos poco desarrollados como la formación de clamidosporas, modificaciones postraduccionales de proteínas como la glicosilación o los sistemas secretores de vesículas que contienen la sintasa Met6 entre otras proteínas^(7,91). Estos modelos de estudio pueden ampliar el conocimiento de la biología fúngica, y por extensión podrían contribuir al desarrollo de métodos de control de las infecciones causadas por hongos.

6. Conclusiones

- 1.- Los estudios de caracterización fenotípica, inmunológica y genotípica de 477 aislamientos clínicos, seleccionados por mostrar colonias verdes en medio CHROMagar Candida, han confirmado la identidad de 434 cepas como *Candida albicans*, mientras que las restantes 43 se han identificado como *Candida dubliniensis*, incluyendo en este último grupo 9 aislamientos que no habían sido identificados previamente debido a que presentaban un perfil dudoso en las pruebas de identificación preliminares.
- 2.- Las nueve cepas de *C. dubliniensis*, que hemos denominado atípicas, muestran heterocigosis en el locus de apareamiento *MTL*, al igual que las cepas de referencia de los genotipos 1 y 2 de *C. dubliniensis*, a cuyos grupos pertenecen todas ellas. Los tres aislamientos del grupo blp presentan genotipo 1, que es el más frecuente de esta especie, y los seis restantes del grupo rosa son del genotipo 2.
- 3.- Las pruebas fenotípicas e inmunológicas que se vienen utilizando tradicionalmente para la identificación de aislamientos clínicos de levaduras, son poco eficientes y deben ser utilizadas de modo orientativo para la identificación presuntiva de aislamientos atípicos. De acuerdo con nuestra experiencia, es conveniente recurrir a pruebas de ADN y técnicas de biología molecular para identificar correctamente los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis*.
- 4.- La incapacidad para formar clamidosporas que presentan las cepas atípicas del grupo blp de *C. dubliniensis* está asociada con bajos niveles de expresión de varios genes esenciales para la inducción de este programa de desarrollo biológico, entre los que cabe destacar los genes *HOG1*, *RIM13*, *SUV3*, *ISW2* y *SCH9*. Esta característica convierte a las cepas atípicas del grupo blp de *C. dubliniensis* en un posible modelo para el estudio de procesos morfogenéticos, como es la formación de clamidosporas.
- 5.- La enzima metionina sintasa independiente de cobalamina, Met6, se muestra como la principal diana proteica reconocida por el anticuerpo monoclonal 12F7-F2 en los extractos de pared celular de *C. dubliniensis*.
- 6.- Los aislamientos atípicos de *C. dubliniensis* del grupo blp no expresan el antígeno específico del anticuerpo monoclonal 12F7-F2 en la superficie de la célula, sino en zonas profundas de la pared celular. Este hecho explica la incapacidad de estas cepas para aglutinar las partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo en la prueba comercial Bichro-Dubli Fumouze®.

7.- Las diferencias fenotípicas observadas en las cepas atípicas de *C. dubliniensis* no justifican la descripción de una nueva especie dentro del género *Candida* o una subespecie de *C. dubliniensis*.

7. Bibliografía

1. Aguirre JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol. 2002;19:17-21.
2. Ahmad S, Mokaddas E, Al-Sweih N, Khan ZU. Phenotypic and molecular characterization of *Candida dubliniensis* isolates from clinical specimens in Kuwait. Med Princ Pract. 2005; 14 Suppl 1:77-83.
3. Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. J Med Microbiol. 2004; 53:633-637.
4. Al MA, Sullivan DJ, Polacheck I, Shaheen FA, Soliman O, Al HS, et al. Novel 5-flucytosine-resistant clade of *Candida dubliniensis* from Saudi Arabia and Egypt identified by Cd25 fingerprinting. J Clin Microbiol. 2005; 43:4026-4036.
5. Al MA, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. J Clin Microbiol. 2003; 41:4787-4789.
6. Al MA, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and Caffeic acid-ferric citrate agar. J Clin Microbiol. 2001; 39:323-327.
7. Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancopé-Oliveira RM, et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: An effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. Cell Microbiol. 2008; 10(8):1695-1710.
8. Alexis-Diomedes P. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. Rev Chil Infect. 2004; 21(2):89-101.
9. Allouh HM, Lopez-Ribot JL, Masten BJ, Chaffin WL. 3-phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. Microbiology. 1997; 143 2:321-330.
10. Alonso-Monge R, Navarro-García F, Roman E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C, et al. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2003; 2:351-361.
11. Alves SH, de Loreto ES, Linares CE, Silveira CP, Scheid LA, Pereira DI, et al. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48(3):119-121.

12. Alves SH, Milan EP, Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO, et al. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001; 39(3):165-168.
13. Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti N, Cassone A. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis.* 1996; 173:684-690.
14. Arendorf TM, Bredekamp B, Cloete CA, Sauer G. Oral manifestations of HIV infection in 600 South African patients. *J Oral Pathol Med.* 1998; 27:176-179.
15. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA, et al. High prevalence of *non-albicans* yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med.* 2003; 17:477-481.
16. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2003; 226:3-6.
17. Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar Candida plates. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:454-456.
18. Berkhout CM. De Schimmelgeslachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*. Thesis, Rijksuniversiteit Utrecht. 1923.
19. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 2002; 3:918-930.
20. Bernal S, Martin ME, Garcia M, Aller AI, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996; 24:201-4.
21. Bial-Aristegui. El reino de los hongos. In: Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G, editors. *Hongos y Actinomicetos Alergénicos*. Revista Iberoamericana de Micología. Bilbao. 2002; Cap.1.

22. Bikandi J, Millan RS, Moragues MD, Cebas G, Clarke M, Coleman DC, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. J Clin Microbiol. 1998; 36:2428-2433.
23. Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaro HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. Med Mycol. 2005; 43(5):431-7.
24. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. J Clin Microbiol. 2003; 41(5):1838-1842.
25. Bosco-Borgeat ME, Taverna CG, Cordoba S, Isla MG, Murisengo OA, Szusz W, et al. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia in Argentina: Identification by a novel multiplex PCR and comparison of different phenotypic methods. Mycopathologia. 2011; 172(5):407-414.
26. Bougnoux ME, Diogo D, Francois N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel JF, et al. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. J Clin Microbiol. 2006; 44:1810-1820.
27. Bougnoux ME, Aanensen DM, Morand S, Theraud M, Spratt BG, d'Enfert C. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. Infect Genet Evol. 2004; 4:243-52.
28. Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003; 41:5265-5266.
29. Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2002; 40:1290-1297.
30. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays.2006; 28:799-808.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem.1976; 72:248-254.
32. Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li RK, et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. Emerg Infect Dis.2000; 6:46-49.

33. Brawner DL, Cutler JE. Variability in expression of cell surface antigens of *Candida albicans* during morphogenesis. *Infect Immun*. 1986; 51(1):337-343.
34. Brawner DL, Cutler JE. Ultrastructural and biochemical studies of two dynamically expressed cell surface determinants on *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1986; 51(1):327-336.
35. Brena S, Rubio MC, Salesa R, Iglesias I, Gil J, Rezusta A, et al. Genotypes of *Candida dubliniensis* in clinical isolates. *Rev Iberoam Micol*. 2004; 21:20-23.
36. Brown DM, Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Baqui AA, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV-seropositive pediatric dental patients. *Pediatr Dent*. 2000; 22(3):234-238.
37. Bruneau JM, Maillet I, Tagat E, Legrand R, Supatto F, Fudali C, et al. Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: Comparison of the effect of $\beta(1,3)$ glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole. *Proteomics*. 2003; 3(3):325-336.
38. Burt ET, O'Connor C, Larsen B. Isolation and identification of a 92-kDa stress induced protein from *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 1999; 147(1):13-20.
39. Calderone RA. *Candida and Candidiasis*. American Society of Microbiology, Washington D. C. 2002.
40. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001; 9:327-335.
41. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 1991; 55:1-20.
42. Campanha NH, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Pavarina AC. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis*. 2005; 11(6):392-398.
43. Cardenas-Perera CD, Torres-Lana A, Alonso-Vargas R, Moragues-Tosantos MD, Pontón J, Quindós-Andres G, et al. Evaluation of API ID 32C and VITEK-2 to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50:219-221.
44. Carrillo-Muñoz AJ, Quindos G, López-Ribot J. Current developments in antifungal agents. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Interactive Agents*. 2004; 49:293-297.

45. Casal M, Linares MJ, Solis F, Rodriguez FC. Appearance of colonies of prototheca on CHROMagar Candida medium. *Mycopathologia*. 1997; 137(2):79-82.
46. Casanova M, Gil ML, Cardenoso L, Martinez JP, Sentandreu R. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1989; 57:262-271.
47. Cassone A, Torosantucci A, Boccanera M, Pellegrini G, Palma C, Malavasi F. Production and characterisation of a monoclonal antibody to a cell-surface, glucomannoprotein constituent of *Candida albicans* and other pathogenic candida species. *J Med Microbiol*. 1988; 27(4):233-238.
48. Cassone A, Mattia E, Boldrini L. Agglutination of blastospores of *Candida albicans* by concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall. *J Gen Microbiol*. 1978; 105(2):263-273.
49. Castillo L, Martinez AI, Garcera A, Garcia-Martinez J, Ruiz-Herrera J, Valentin E, et al. Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. *Fungal Genet Biol*. 2006; 43(2):124-134.
50. Castro-Méndez C, Martín-Mazuelos E. Diagnóstico de la Infección Fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. *SEIMC*. 2004;1-10.
51. Ceballos A, Aguirre JM, Echebarria M, Ceballos L. Prevalence and distribution of oral candidosis in patients with AIDS. *Med Oral*. 1996; 1:6-10.
52. Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008; 72(3):495-544.
53. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:130-180.
54. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow AJ. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 1968; 51:367-376.
55. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006; 48(1):21-26.

56. Chen KW, Chen YC, Lo HJ, Odds FC, Wang TH, Lin CY, et al. Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2172-2178.
57. Chen SC, Marriott D, Playford EG, Nguyen Q, Ellis D, Meyer W, et al. Candidemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15:662-669.
58. Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. *Med J Aust.* 2007; 187:404-409.
59. Chryssanthou E, Fernandez V, Petrini B. Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in routine diagnostics. *APMIS.* 2007; 115(11):1281-1284.
60. Chunchanur SK, Nadgir SD, Halesh LH, Patil BS, Kausar Y, Chandrasekhar MR. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009; 52(4):501-504.
61. Citiulo F, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydospores cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9:1051-1060.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. In: CLSI document M27-A3. Approved standard 3rd ed. Wayne: CLSI; 2008.
63. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. In: CLSI document M27-S3. Informational supplement 3rd ed. Wayne: CLSI; 2008.
64. Cognetti D, Davis D, Sturtevant J. The *Candida albicans* 14-3-3 gene, *BMH1*, is essential for growth. *Yeast.* 2002; 19(1):55-67.
65. Coleman D, Sullivan D, Harrington B, Haynes K, Henman M, Shanley D, et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis.* 1997; 3(1):96-101.
66. Coleman DC, Moran GP, McManus BA, Sullivan DJ. Mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Future Microbiol.* 2010; 5(6):935-949.

67. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. *Candidiasis: the emergence of a novel species, Candida dubliniensis*. AIDS.1997; 11:557-567.
68. Cuenca M, Gadea I, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez JL. Diagnóstico microbiológico y de la micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. In: Procedimientos en Microbiología clínica. SEIMC. 2006; Cap. 21.
69. Dahiya MC, Redding SW, Dahiya RS, Eng TY, Kirkpatrick WR, Coco BJ, et al. Oropharyngeal candidiasis caused by *non-albicans* yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003; 57(1):79-83.
70. Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. Oral Microbiol Immunol. 2002 ; 17(2):79-84.
71. De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, Vanden Bossche H. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(6):1660-1670.
72. De Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de JL, Hellingwerf KJ, et al. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. Eukaryot Cell.2004; 3:955-965.
73. De Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. Yeast. 2003; 20(9):781-796.
74. De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. Infect Immun. 2000; 68(6):3172-3179.
75. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J Clin Microbiol. 2003; 41:5709-5717.
76. Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of *ACT1* intron and exon sequences. Microbiology.1999; 145 (8):1871-1882.
77. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol. 2002; 19:139-143.

78. Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol.* 2004; 337(2):243-253.
79. Eisman B, Alonso-Monge R, Roman E, Arana D, Nombela C, Pla J. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2006; 5:347-358.
80. Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(3):415-429.
81. Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: Comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(6):379-388.
82. Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, Gonzalez-Gomez N, Pontón J, et al. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3340-3345.
83. Eraso E, Sahand IH, Villar-Vidal M, Marcos C, Moragues M.D., Madariaga L, et al. Usefulness of Candida ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Med Mycol.* 2006; 44:611-615.
84. Eroles P, Sentandreu M, Elorza MV, Sentandreu R. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology.* 1997; 143 (2):313-320.
85. Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science.* 2001; 292(5515):288-290.
86. Faggi E, Pini G, Campisi E, Martinelli C, Difonzo E. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses.* 2005;48(3):211-215.

87. Fell JW, Statzell-Tallman A, Lutz MJ, Kurtzman CP. Partial rRNA sequences in marine yeasts: a model for identification of marine eukaryotes. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1992; 1:175-186.
88. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(2):109-118.
89. Fisher JM, Basson NJ, van Zyl A. Identification of *Candida dubliniensis* in a HIV-positive South African population. *SADJ.* 2001; 56(12):599-601.
90. Fisher-Hoch SP, Hutwagner L. Opportunistic candidiasis: An epidemic of the 1980s. *Clin Infect Dis.* 1995; 21(4):897-904.
91. Fonzi WA. The protein secretory pathway of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2009.
92. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses.* 2005; 48:62-67.
93. Fotedar R, Al Hedaithy SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses.* 2004; 47(3-4):150-155.
94. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. *Candida dubliniensis* at a University hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5):1907-1911.
95. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001; 39:9-33.
96. Freydiere AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997; 16:464-467.
97. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(4):499-511.
98. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(12):3804-3808.

99. Garcera A, Martinez AI, Castillo L, Elorza MV, Sentandreu R, Valentin E. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology*. 2003; 149(8):2137-2145.
100. Garcia-Martos P, Garcia-Agudo R, Hernandez-Molina JM, Marin P, Tallero E, Mira J. Identification of yeasts of clinical interest on CHROMagar Candida culture medium. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15(3):131-135.
101. Gasparoto TH, Dionisio TJ, de Oliveira CE, Porto VC, Gelani V, Santos CF, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. *J Med Microbiol*. 2009; 58(7):959-962.
102. Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JF, Verweij PE, Polacheck I, et al. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:556-574.
103. Ghannoum MA, Burns GR, Elteen KA, Radwan SS. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infect Immun*. 1986; 54:189-193.
104. Giammanco GM, Pecorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici ME, Pizzo G. Fluconazole susceptibility of Italian *Candida dubliniensis* clinical isolates determined by reference and simplified tests. *New Microbiol*. 2001; 24:397-404.
105. Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*. 1998; 144(4):829-838.
106. Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martinez JP, Gozalbo D. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol*. 1997; 179:4992-4999.
107. Giusiano GE, Mangiaterra ML. Rapid differentiation and presumptive identification of yeasts using candida CHROM-agar medium. *Rev Argent Microbiol*. 1998; 30(2):100-103.
108. Goldman RC, Sullivan PA, Zakula D, Capobianco JO. Kinetics of β -1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur J Biochem*. 1995; 227(1-2):372-378.

109. Gottlieb GS, Limaye AP, Chen YC, Van Voorhis WC. *Candida dubliniensis* fungemia in a solid organ transplant patient: case report and review of the literature. *Med Mycol.* 2001; 39:483-485.
110. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(1):33-39.
111. Gutierrez J, Morales P, Gonzalez MA, Quindos G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol.* 2002; 42(3):207-227.
112. Gutierrez J, Maroto C, Piedrola G, Martin E, Perez JA. Circulating *Candida* antigens and antibodies: Useful markers of candidemia. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(9):2550-2552.
113. Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15:238-244.
114. Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12(6):358-365.
115. Hazen KC, Wu JG, Masuoka J. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun.* 2001; 69:779-786.
116. Hazen KC, Mandell G, Coleman E, Wu G. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183:89-94.
117. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:462-478.
118. Hazen KC, Brawner DL, Riesselman MH, Jutila MA, Cutler JE. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun.* 1991; 59:907-912.
119. Hazen KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun.* 1989; 57:1894-1900.

120. Heinz WJ, Kurzai O, Brakhage AA, Fonzi WA, Korting HC, Frosch M, et al. Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol.* 2000; 290(3):231-238.
121. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).*1993; 11:1026-1030.
122. Hope WW, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.*2004; 48:4377-4386.
123. Hoppe JE, Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*1999; 18:188-191.
124. Horn R, Wong B, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. *Rev Infect Dis.*1985; 7:646-655.
125. Houang ET, Chu KC, Koehler AP, Cheng AF. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol.* 1997; 50(7):563-565.
126. Hoyer LL. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9(4):176-180.
127. Hoyer LL, Fundyga R, Hecht JE, Kapteyn JC, Klis FM, Arnold J. Characterization of agglutinin-like sequence genes from *non-albicans Candida* and phylogenetic analysis of the *ALS* family. *Genetics.* 2001; 157:1555-1567.
128. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol.* 1996; 7:55-69.
129. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.*1994; 14:87-99.
130. Hull CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 2000; 289(5477):307-310.

131. Innings A, Ullberg M, Johansson A, Rubin CJ, Noreus N, Isaksson M, et al. Multiplex real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:874-880.
132. Ishiguro A, Homma M, Torii S, Tanaka K. Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. *Infect Immun.* 1992; 60:1550-1557.
133. Ito K, Ishiguro A, Kanbe T, Tanaka K, Torii S. Detection of IgE antibody against *Candida albicans* enolase and its crossreactivity to *Saccharomyces cerevisiae* enolase. *Clin Exp Allergy.* 1995; 25:522-528.
134. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Jr., Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human bucal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:17-22.
135. Jabra-Rizk MA, Ferreira SM, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(12):4520-4522.
136. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Jr, Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(6):2423-2426.
137. Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JI, Falkler WA, Jr, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(2):321-326.
138. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, et al. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* 2009; 19:2231-2244.
139. Jacobsen MD, Gow NA, Maiden MC, Shaw DJ, Odds FC. Strain typing and determination of population structure of *Candida krusei* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:317-323.
140. Jansons VK, Nickerson WJ. Chemical composition of chlamydospores of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1970; 104:922-932.

141. Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(6):505-509.
142. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 35:103-114.
143. Joly S, Pujol C, Soll DR. Microevolutionary changes and chromosomal translocations are more frequent at RPS loci in *Candida dubliniensis* than in *Candida albicans*. *Infect Genet Evol.* 2002; 2:19-37.
144. Joly S, Pujol C, Rysz M, Vargas K, Soll DR. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1035-1044.
145. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, Kikuchi A. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Sci.* 2003; 32:151-161.
146. Kantarcioglu AS, Yucel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19(1):44-48.
147. Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Muller WH, Andel A, Verkleij AJ, et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol.* 2000; 35:601-611.
148. Kennedy MJ, Rogers AL, Yancey RJ, Jr. Environmental alteration and phenotypic regulation of *Candida albicans* adhesion to plastic. *Infect Immun.* 1989; 57(12):3876-3881.
149. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Al-Sweih N, Chandy R. Sunflower seed husk agar: A new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Indian J Med Microbiol.* 2005; 23(3):182-185.
150. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4796-4798.

151. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(6):590-592.
152. Khlif M, Sellami H, Sellami A, Chelly H, Makni F, Bouaziz M, et al. *Candida dubliniensis*: first identification in Sfax Hospital, Tunisia. Mycoses.2009; 52:171-175.
153. Kim TH, Park BR, Kim HR, Lee MK. *Candida dubliniensis* screening using the germ tube test in clinical yeast isolates and prevalence of *C. dubliniensis* in Korea. J Clin Lab Anal. 2010; 24(3):145-148.
154. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol.1998; 36:3007-3012.
155. Klebl F, Tanner W. Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1989; 171(11):6259-6264.
156. Kohler GA, White TC, Agabian N. Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. J Bacteriol. 1997; 179:2331-2338.
157. Koneman E., Allen SD, Janda WM., Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999.
158. Krishnamurthy S, Plaine A, Albert J, Prasad T, Prasad R, Ernst JF. Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. Microbiology.2004; 150:1991-2003.
159. Kumar CP, Menon T. Tobacco agar: a new medium for chlamydosporulation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Med Mycol.2005; 43:473-5.
160. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek.1998; 73:331-371.

161. Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, Bautsch W, Molitor M, Frosch M, et al. Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J Mol Med (Berl)*. 2000; 78(9):521-529.
162. Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, Soll DR. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1 (SAP1)* in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*. 1999; 67(12):6652-6662.
163. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685.
164. Lane T, Garcia JR. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses*. 1991; 34(5-6):217-220.
165. Larone DH. Medically important fungi: A guide to identification. In: American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2010; p. 193-211.
166. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:3249-3254.
167. Li RK, Cutler JE. A cell surface/plasma membrane antigen of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 1991; 137(3):455-464.
168. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Non-filamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997; 90:939-949.
169. Lopez-Ribot JL, Casanova M, Murgui A, Martinez JP. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004; 41(3):187-196.
170. Lopez-Ribot JL, Alloush HM, Masten BJ, Chaffin WL. Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infect Immun*. 1996; 64(8):3333-3340.
171. Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1996; 178(15):4724-4726.

172. Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia*. 2010; 169(6):431-443.
173. Lumbreras C, Lizasoain M, Aguado J. Antifúngicos de uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(7):366-380.
174. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:2860-2865.
175. Luque AG, Biasoli MS, Tosello ME, Binolfi A, Lupo S, Magaro HM. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses*. 2009; 52:53-59.
176. Maesaki S, Hossain MA, Sasaki E, Hashiguchi K, Higashiyama Y, Yoshitsugu Y, et al. The future of antifungal agents. Non azole antifungal agents. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 1999; 40:157-161.
177. Magee BB, Magee PT. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLalpha* strains. *Science*. 2000; 289(5477):310-313.
178. Mahmoudabadi AZ, Radcliffe CE, Coleman DC, Drucker DB. Comparison of *Candida dubliniensis* and *C. albicans* based on polar lipid composition. *J Appl Microbiol*. 2002; 93(5):894-899.
179. Mahnss B, Stehr F, Schafer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. 2005; 48(1):55-61.
180. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95:3140-3145.
181. Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17(3):181-185.
182. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(2):127-131.

183. Mariano Pde L, Milan EP, da Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(4):533-538.
184. Marone M, Mozzetti S, De RD, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. Biol Proced Online.2001; 3:19-25.
185. Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. J Clin Microbiol.2006; 44:138-142.
186. Marot-Leblond A, Grimaud L, Nail S, Bouterige S, Apaire-Marchais V, Sullivan DJ, et al. New monoclonal antibody specific for *Candida albicans* germ tube. J Clin Microbiol. 2000; 38:61-67.
187. Marot-Leblond A, Robert R, Aubry J, Ezcurra P, Senet JM. Identification and immunochemical characterization of a germ tube specific antigen of *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol.1993; 7:175-186.
188. Martinez JP, Gil ML, Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev.1998;11:121-141.
189. Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J Clin Microbiol.2002; 40:3135-3139.
190. McCullough M, Ross B, Reade P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol.1995; 33:696-700.
191. McManus BA, Moran GP, Higgins JA, Sullivan DJ, Coleman DC. A Ser29Leu substitution in the cytosine deaminase Fca1p is responsible for clade-specific flucytosine resistance in *Candida dubliniensis*. Antimicrob Agents Chemother.2009; 53:4678-4685.
192. McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bougnoux ME, et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol.2008; 46:652-664.

193. Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui A, Kelley JI, Meeks VI, Merz WG, et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88(5):573-580.
194. Melkusova S, Bujdakova H, Vollekova A, Myoken Y, Mikami Y. The efficiency of the benzothiazole APB, the echinocandin micafungin, and amphotericin B in fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Pharmazie.* 2004; 59(7):573-574.
195. Merlino J, Tambosis E, Veal D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(4):1157-1159.
196. Miller MG, Johnson AD. White-Opaque Switching in *Candida albicans* is Controlled by Mating-Type Locus Homeodomain Proteins and Allows Efficient Mating. *Cell.* 2002; 110(3):293-302.
197. Minczuk M, Dmochowska A, Palczewska M, Stepień PP. Overexpressed yeast mitochondrial putative RNA helicase Mss116 partially restores proper mtRNA metabolism in strains lacking the Suv3 mtRNA helicase. *Yeast.* 2002; 19(15):1285-1293.
198. Mitsutake K, Kohno S, Miyazaki T, Miyazaki H, Maesaki S, Koga H. Detection of *Candida* enolase antibody in patients with candidiasis. *J Clin Lab Anal.* 1994; 8(4):207-210.
199. Molloy C, Shepherd MG, Sullivan PA. Differential extraction of N-acetylglucosaminidase and trehalase from the cell envelope of *Candida albicans*. *Exp Mycol.* 1995; 19:178-185.
200. Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Sevilla MJ, Conti S, Polonelli L, et al. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three *anti-C. albicans* activities. *Infect Immun.* 2003; 71(9):5273-5279.
201. Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology.* 2004; 150:3363-3382.
202. Moran G, Sullivan D, Morschhauser J, Coleman D. The *Candida dubliniensis* *CdCDR1* gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:2829-2841.
203. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic? *Int J Microbiol.* 2012; 2012:20592-20599.

204. Moran GP, Maccallum DM, Spiering MJ, Coleman DC, Sullivan DJ. Differential regulation of the transcriptional repressor *NRG1* accounts for altered host-cell interactions in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol.*2007; 66:915-929.
205. Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother.*1998; 42:1819-1830.
206. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.*1997; 41:617-623.
207. Morschhauser J. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol.* 2010; 199(3):165-172.
208. Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Pontón J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10(1):28,31; 25-28.
209. Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al MA, Coleman DC, Pontón J. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.*2003; 41:1259-1262.
210. Mrsa V, Klebl F, Tanner W. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo- β -1,3-glucanase. *J Bacteriol.* 1993; 175(7):2102-2106.
211. Mygind T, Birkelund S, Birkebaek NH, Ostergaard L, Jensen JS, Christiansen G. Determination of PCR efficiency in chelex-100 purified clinical samples and comparison of real-time quantitative PCR and conventional PCR for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *BMC Microbiol.* 2002;2:17.
212. Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsichlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology.*2008; 154:3266-3280.
213. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400-428.

214. Nickerson WJ. Reduction of inorganic substances by yeasts. I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *J Infect Dis.*1953; 93:43-56.
215. Nickerson WJ, Merkel JR. A Light Activation Phenomenon in the Enzymatic and Nonenzymatic Reduction of Tetrazolium Salts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*1953; 39:901-905.
216. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2001; 44(9-10):361-367.
217. Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology.*2003; 149:3629-3637.
218. O'Brien JR. Nickerson's medium in the diagnosis of vaginal moniliasis. *Can Med Assoc J.* 1964; 90:1073-1074.
219. O'Connor L, Caplice N, Coleman DC, Sullivan DJ, Moran GP. Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* is governed by nutrient regulation of *UME6* expression; *Candida dubliniensis*. *Eukaryot Cell.* 2010; 9(9):1383-1397.
220. Odds FC. *Candida* and candidosis. London: Baillière Tindall; 1988.
221. Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, Whyte JA, Kibbler CC, et al. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.*2006; 44:3647-3658.
222. Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 38(3):147-150.
223. Odds FC. *Candida* and *candidosis*. London: Bailliere Tindall; 1998.
224. Odds FC, Van NL, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol.*1998; 36:2869-2873.
225. Odds FC. *Candida* species and virulence. *SM news.* 1994; 60:313-318.
226. Odds FC. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32 (1):1-8.

227. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol.1994; 32:1923-1929.
228. Odds FC. *Candida* infections: An overview. Crit Rev Microbiol. 1987; 15:1-5.
229. Olsen I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. Acta Odontol Scand. 1974; 32(5):329-333.
230. Pagano J, Levin JD, Trejo W. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. Antibiot Annu.1957; 5:137-143.
231. Pal M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. Rev Iberoam Micol.1997; 14:181-183.
232. Palmer GE, Johnson KJ, Ghosh S, Sturtevant J. Mutant alleles of the essential 14-3-3 gene in *Candida albicans* distinguish between growth and filamentation. Microbiology. 2004; 150(6):1911-1924.
233. Park S, Wong M, Marras SA, Cross EW, Kiehn TE, Chaturvedi V, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. J Clin Microbiol. 2000; 38:2829-2836.
234. Park YN, Morschhauser J. Tetracycline-inducible gene expression and gene deletion in *Candida albicans*. Eukaryot Cell.2005; 4:1328-1342.
235. Pavia J, Aguado C, Mormeneo S, Sentandreu R. Secretion, interaction and assembly of two O-glycosylated cell wall antigens from *Candida albicans*. Microbiology. 2001; 147(7):1983-91.
236. Peltroche-Llacsahuanga H, Dohmen H, Haase G. Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients. Mycoses. 2002; 45(1-2):15-18.
237. Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Schmidt S, Tintelnot K, Lutticken R, Haase G. Phagocytosis, oxidative burst, and killing of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by human neutrophils. FEMS Microbiol Lett.2000; 191:151-155.
238. Pendland JC, Boucias DG. Characterization of monoclonal antibodies against cell wall epitopes of the insect pathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*: Differential binding to fungal surfaces and cross-reactivity with host hemocytes and basement membrane components. Eur J Cell Biol. 1998; 75(2):118-127.

239. Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.*2002; 46:1695-1703.
240. Pereiro M, Losada A, Toribio J. Adherence of *Candida albicans* strains isolated from AIDS patients. Comparison with pathogenic yeasts isolated from patients without HIV infection. *Br J Dermatol.*1997; 137:76-80.
241. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis.* 1996; 22(2):112-118.
242. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999; 20(18):3551-3567.
243. Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, et al. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics.* 2008; 8(9):1744-1749.
244. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*1992; 11:287-291.
245. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN. In vitro susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48(2):101-105.
246. Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan DJ, et al. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol.*1999; 37:870-872.
247. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis.*1996; 22(2):89-94.
248. Pfaller MA. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis.*1994; 19(1):8-13.
249. Phelan JA, Saltzman BR, Friedland GH, Klein RS. Oral findings in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*1987; 64:50-56.

250. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3533-3539.
251. Pinjon E, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Moran G, Coleman DC, et al. Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased *CdCDR1* and *CdCDR2* expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1312-1318.
252. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Coleman DC, et al. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8):2424-2437.
253. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:2093-2095.
254. Pitarch A, Nombela C, Gil C. Reliability of antibodies to *Candida* methionine synthase for diagnosis, prognosis and risk stratification in systemic candidiasis: A generic strategy for the prototype development phase of proteomic markers. *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1(10):1221-1242.
255. Pitarch A, Jimenez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics.* 2006; 5(1):79-96.
256. Pitarch A, Nombela C, Gil C. *Candida albicans* biology and pathogenicity: Insights from proteomics. *Methods Biochem Anal.* 2006; 49:285-330.
257. Pitarch A, Abian J, Carrascal M, Sanchez M, Nombela C, Gil C. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* 2004; 4(10):3084-106.
258. Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:170-174.
259. Polak A. Mode of action of 5-fluorocytosine and 5-fluorouracil in dematiaceous fungi. *Sabouraudia.* 1983; 21:15-25.

260. Pomes R, Gil C, Nombela C. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. J Gen Microbiol. 1985; 131:2107-2113.
261. Pontón J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, et al. Emerging pathogens. Med Mycol. 2000; 38(1):225-236.
262. Pontón J, Marot-Leblond A, Ezkurra PA, Barturen B, Robert R, Senet JM. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. Infect Immun. 1993; 61(11):4842-4847.
263. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol. 2008; 25:78-82.
264. Powderly WG. Mucosal candidiasis caused by *non-albicans* species of *Candida* in HIV-positive patients. AIDS. 1992; 6:604-605.
265. Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar Candida for presumptive identification of clinically important *Candida* species. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998; 32(3):201-4.
266. Pujol C, Daniels KJ, Lockhart SR, Srikantha T, Radke JB, Geiger J, et al. The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate. Eukaryot Cell. 2004; 3:1015-1027.
267. Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. Activity of micafungin against *Candida* biofilms. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(1):49-55.
268. Quindós G, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP, Salgado J, Alonso-Vargas R, Rodrigo JM, et al. In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. Chemotherapy. 2000; 46(6):395-401.
269. Ramos JP, Rosa CA, Carvalho EM, Leoncini O, Valente P. Heteroduplex mobility assay of the 26S rDNA D1/D2 region for differentiation of clinically relevant *Candida* species. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006; 89(1):39-44.
270. Raut SH, Varaiya A. Differentiation of *Candida dubliniensis* on CHROMagar and Pal's agar. Indian J Med Microbiol. 2009; 27(1):55-58.
271. Richard ML, Plaine A. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2007; 6:119-133.

272. Richardson MD, Warnock DW. Superficial candidosis: Fungal infection. In: Malden: Blackwell Publishing; 2003.
273. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using *HWPI* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62:230-233.
274. Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7):2590-2592.
275. Rubinstein ND, Mayrose I, Martz E, Pupko T. Epitopia: A web-server for predicting B-cell epitopes. *BMC Bioinformatics.* 2009; 14:10:287.
276. Rubio M, Gil-Tomás J, Benito-Ruesca R, Ramirez de Ocariz I, Navarro-Lucia M. Micosis más frecuentes en nuestro medio. In: Pemán J, Martín-Mazuleos E, Rubio MC, editors. *Guía Práctica de Identificación y Diagnostico en Micología Clínica.* Revista Iberoamericana de Micología. Bilbao. 2001; Cap. 2.
277. Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46:291-295.
278. Rustad TR, Stevens DA, Pfaller MA, White TC. Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology.* 2002; 148(4):1061-1072.
279. Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1990; 172(3):1276-1283.
280. Sahand IH, Maza JL, Eraso E, Montejo M, Moragues MD, Aguirre JM, et al. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity. *J Med Microbiol.* 2009; 58:1437-1442.
281. Sahand IH, Ortiz R, Peman J, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using the Bichro-Dubli test. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25(9):576-578.

282. Sahand IH, Moragues MD, Robert R, Quindós G, Pontón J. Evaluation of Bichro-Dubli Fumouze[®] to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55(2):165-167.
283. Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. Supplementation of CHROMagar Candida medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:5768-5770.
284. Salgado-Parreno FJ, Alcoba-Florez J, Arias A, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, et al. In vitro activities of voriconazole and five licensed antifungal agents against *Candida dubliniensis*: comparison of CLSI M27-A2, Sensititre YeastOne, disk diffusion, and Etest methods. *Microb Drug Resist*. 2006; 12:246-251.
285. Salkin IF, Pruitt WR, Padhye AA, Sullivan D, Coleman D, Pincus DH. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:1467.
286. Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 73:171-180.
287. Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med*. 1989; 18:554-564.
288. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning; A laboratory manual. In: New York: Cold Spring Harbor; 2001.
289. San Segundo P, Correa J, Vazquez de Aldana CR, del Rey F. *SSG1*, a gene encoding a sporulation-specific 1,3- β -glucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1993; 175(12):3823-3837.
290. Sancak B, Rex JH, Paetznick V, Chen E, Rodriguez J. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(1):489-491.
291. Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol*. 2005; 22(2):83-92.

292. Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):4159-4162.
293. Sano A, Vilela MM, Takahashi I, Fukushima K, Takizawa K, da Silva MT, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of an HIV-positive child in Brazil. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2000; 41(3):177-181.
294. Savolainen J, Kortekangas-Savolainen O, Nermes M, Viander M, Koivikko A, Kalimo K, et al. IgE, IgA, and IgG responses to common yeasts in atopic patients. *Allergy.* 1998; 53(5):506-512.
295. Savolainen J, Koivikko A, Kalimo K, Nieminen E, Viander M. IgE, IgA and IgG antibodies and delayed skin response towards *Candida albicans* antigens in atopics with and without saprophytic growth. *Clin Exp Allergy.* 1990; 20(5):549-554.
296. Schauer F, Hanschke R. Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses.*1999; 42(1):12-21.
297. Scheid LA, Nunes Mario DA, Soares IH, Loreto ES, Santurio JM, Alves SH. DRBC agar: A new tool for *Candida dubliniensis* identification. *Folia Microbiol (Praha).* 2010; 55(2):155-158.
298. Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*1988; 85:1452-1456.
299. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.*2008; 3:1101-1108.
300. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*1997; 16:296-300.
301. Sebti A, Kiehn TE, Perlin D, Chaturvedi V, Wong M, Doney A, et al. *Candida dubliniensis* at a cancer center. *Clin Infect Dis.*2001; 32:1034-1038.
302. Sendid B, Francois N, Standaert A, Dehecq E, Zerimech F, Camus D, et al. Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida* species. *J Med Microbiol.* 2007; 56:495-499.

303. Sharma G, Pai KM, Setty S, Ramapuram JT, Nagpal A. Oral manifestations as predictors of immune suppression in a HIV-/AIDS-infected population in south India. *Clin Oral Investig.* 2009; 13:141-188.
304. Shen HD, Choo KB, Lee HH, Hsieh JC, Lin WL, Lee WR, et al. The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy.* 1991; 21:675-681.
305. Shimizu C, Kuriyama T, Williams DW, Karasawa T, Inoue K, Nakagawa K, et al. Association of oral yeast carriage with specific host factors and altered mouth sensation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(4):445-451.
306. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:4626-4628.
307. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1987; 169:189-197.
308. Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science.* 1985; 230(4726):666-669.
309. Smail EH, Jones JM. Demonstration and solubilization of antigens expressed primarily on the surfaces of *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun.* 1984; 45:74-81.
310. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1992; 5(2):183-203.
311. Soll DR, Galask R, Isley S, Rao TV, Stone D, Hicks J, et al. Switching of *Candida albicans* during successive episodes of recurrent vaginitis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:681-90.
312. Soll DR, Langtimm CJ, McDowell J, Hicks J, Galask R. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol.* 1987; 25:1611-1622.
313. Sonneborn A, Bockmuhl DP, Ernst JF. Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun.* 1999; 67:5514-5517.
314. Sonneborn A, Tebarth B, Ernst JF. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun.* 1999; 67:4655-4660.

315. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*. 1999; 283(5407):1535-1538.
316. Staib P, Morschhauser J. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*-an enigmatic developmental programme. *Mycoses*. 2007; 50:1-12.
317. Staib P, Morschhauser J. Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamyospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol*. 2005; 55:637-652.
318. Staib P, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhauser J. Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*. *J Bacteriol*. 2001; 183(9):2859-2865.
319. Staib P, Morschhauser J. Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 1999; 42:521-524.
320. Ste-Marie L, Senechal S, Boushira M, Garzon S, Strykowski H, Pedneault L, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to cell wall antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 1990; 58(7):2105-2114.
321. Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 2007; 44:920-931.
322. Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J*. 1997; 16:1982-1991.
323. Strockbine NA, Largen MT, Zweibel SM, Buckley HR. Identification and molecular weight characterization of antigens from *Candida albicans* that are recognized by human sera. *Infect Immun*. 1984; 43:715-721.
324. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004; 12(7):317-324.
325. Suliman HS, Appling DR, Robertus JD. The gene for cobalamin-independent methionine synthase is essential in *Candida albicans*: a potential antifungal target. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 467:218-226.

326. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol.1998; 36:329-334.
327. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol.1997; 35:960-964.
328. Sullivan D, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, et al. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. J Clin Microbiol.1993; 31:2124-2133.
329. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. FEMS Microbiol Lett.2005; 253:9-17.
330. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res.2004; 4:369-376.
331. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis*: An update. Rev Iberoam Micol.1999; 16:72-76.
332. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology.1995; 141(7):1507-1521.
333. Sundstrom PM, Nichols EJ, Kenny GE. Antigenic differences between mannoproteins of germ tubes and blastospores of *Candida albicans*. Infect Immun.1987; 55:616-620.
334. Swoboda RK, Bertram G, Hollander H, Greenspan D, Greenspan JS, Gow NA, et al. Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. Infect Immun.1993; 61:4263-4271.
335. Szabo Z, Borbely A, Kardos G, Somogyvari F, Kemeny-Beke A, Asztalos L, et al. In vitro efficacy of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida dubliniensis* isolates using time-kill methodology. Mycoses. 2010; 53(3):196-199.

336. Taiwo OO, Okeke EN, Jalo PH, Danfillo IS. Oral manifestation of HIV/AIDS in Plateau state indigenes, Nigeria. *West Afr J Med.*2006; 25:32-37.
337. Tang CM, Cohen J. Diagnosing fungal infections in immunocompromised hosts. *J Clin Pathol.* 1992; 45(1):1-5.
338. Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5601-5613.
339. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA, et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol.*2005; 43:5593-5600.
340. Tavanti A, Gow NA, Senesi S, Maiden MC, Odds FC. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:3765-3776.
341. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapci I, Guven GS, Sahin GO, Uzun O. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. *Mycoses.* 2005; 48(3):197-201.
342. Thevelein JM, de Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 1999;33(5):904-918.
343. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1599-1608.
344. Torosantucci A, Gomez MJ, Bromuro C, Casalnuovo I, Cassone A. Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol.* 1991; 29(6):361-372.
345. Van Deventer AJ, van Vliet HJ, Hop WC, Goessens WH. Diagnostic value of anti-*Candida* enolase antibodies. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(1):17-23.
346. Van Deventer AJ, van Vliet HJ, Voogd L, Hop WC, Goessens WH. Increased specificity of antibody detection in surgical patients with invasive candidiasis with cytoplasmic antigens depleted of mannan residues. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(4):994-997.

347. Vargas-Roig LM, Fanelli MA, Lopez LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC, et al. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect Prev.* 1997; 21(5):441-451.
348. Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Ponton J, Quindos G, Aoki S, et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to bucal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol.*2003; 20:52-54.
349. Whelan WL, Kerridge D. Decreased activity of UMP pyrophosphorylase associated with resistance to 5-fluorocytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.*1984; 26:570-574.
350. White TC, Miyasaki SH, Agabian N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1993; 175(19):6126-6133.
351. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar Candida. *J Clin Microbiol.*2001; 39:3793-3795.
352. Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM, et al. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *J Oral Pathol Med.* 2000;29:86-90.
353. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004; 10:73-90.
354. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis.* 1995; 20(1):115-125.
355. Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhauser J. *MDR1*-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3416-3421.
356. Zordan RE, Miller MG, Galgoczy DJ, Tuch BB, Johnson AD. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol.* 2007; 5(10):2166-2176.
357. Zordan RE, Galgoczy DJ, Johnson AD. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006; 103:12807-12812.