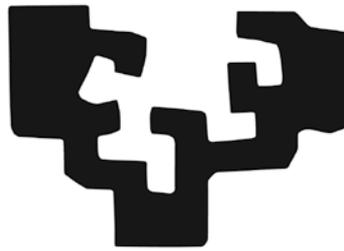


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Diagnóstico molecular de especies de *Candida* y otras levaduras.
Identificación de mutaciones en los genes *ERG11*, *TAC1* y
UPC2 en relación con la sensibilidad reducida a azoles, y
equinocandinas en el gen *FKS***

Inés Arrieta Aguirre

UPV/EHU

2018

AGRADECIMIENTOS

Contenido

1.	Introducción	1
1.1.	El género <i>Candida</i>	1
1.1.1.	<i>Candida albicans</i>	2
1.1.1.1.	Morfología de <i>Candida albicans</i>	2
1.1.1.2.	Genoma de <i>Candida albicans</i>	3
1.1.1.3.	Ciclo sexual de <i>Candida albicans</i>	4
1.1.1.4.	Especies de <i>Candida</i> no- <i>Candida albicans</i> (NCA).....	5
1.1.1.1.1.	<i>Candida parapsilosis</i>	5
1.1.1.1.2.	<i>Candida glabrata</i>	6
1.1.1.1.3.	<i>Candida tropicalis</i>	7
1.1.1.1.4.	<i>Candida krusei</i>	8
1.1.1.1.5.	Otras especies de <i>Candida</i>	8
1.2.	Candidiasis.....	9
1.2.1.	Candidiasis oral (CO)	9
1.2.1.1.	Manifestaciones clínicas.....	10
1.2.1.2.	Epidemiología y factores etiopatogénicos	10
1.2.2.	Vulvovaginitis candidiásica (VVC).....	11
1.2.2.1.	Epidemiología de la vulvovaginitis candidiásica.....	11
1.2.2.2.	Etiología de la vulvovaginitis candidiásica.....	12
1.2.2.3.	Patogénesis de la vulvovaginitis candidiásica	13
1.2.2.4.	Factores de riesgo asociados a la vulvovaginitis candidiásica.....	14
1.2.2.4.1.	Embarazo	14
1.2.2.4.2.	Antibióticos	15
1.2.2.4.3.	Diabetes.....	15
1.2.2.4.4.	Inmunosupresión	15
1.2.2.4.5.	Uso de anticonceptivos hormonales	15
1.2.2.4.6.	Predisposición genética	16
1.2.2.5.	Vulvovaginitis candidiásica recurrente (VVCR)	16
1.3.	Otras micosis	17
1.3.1.	<i>Saprochaete capitata</i>	18
1.4.	Fármacos antifúngicos	21
1.4.1.	Polienos.....	22

1.4.1.1.	Nistatina	22
1.4.1.2.	Anfotericina B.....	22
1.4.2.	5-Fluorocitosina.....	23
1.4.3.	Equinocandinas	24
1.4.3.1.	Anidulafungina	25
1.4.3.2.	Caspofungina.....	26
1.4.3.3.	Micafungina.....	26
1.4.4.	Azoles	26
1.4.4.1.	Clotrimazol	27
1.4.4.2.	Ketoconazol.....	28
1.4.4.3.	Fluconazol.....	28
1.4.4.4.	Itraconazol.....	29
1.4.4.5.	Voriconazol.....	29
1.4.4.6.	Posaconazol.....	30
1.5.	Resistencia a los fármacos antifúngicos.....	30
1.5.1.	Técnicas para el estudio de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos	32
1.5.2.	Mecanismos de resistencia a distintos fármacos antifúngicos	35
1.5.2.1.	Mecanismos de resistencia a la 5-fluorocitosina	35
1.5.2.2.	Mecanismos de resistencia a polienos.....	36
1.5.2.3.	Mecanismos de resistencia a las equinocandinas.....	37
1.5.2.4.	Mecanismos de resistencia a los azoles	38
1.5.2.4.1.	Alteraciones en la síntesis del ergosterol	38
1.5.2.4.2.	Mutaciones en ERG11.....	39
1.5.2.4.3.	Sobreexpresión de ERG11	41
1.5.2.4.4.	Sobreexpresión de genes codificantes de bombas de eyección.....	45
1.5.2.5.	Alteraciones genómicas asociadas al desarrollo de la resistencia	49
1.6.	Diagnóstico molecular.....	52
2.	Objetivos	57
3.	Materiales y métodos	61
3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....		61
3.1.1. Cepas utilizadas		61
3.1.2. Medios de cultivo		62
3.1.3. Condiciones de cultivo.....		63
3.2. Pacientes y muestras clínicas		64

3.2.1. Muestras orales.....	64
3.2.2. Muestras vulvovaginales.....	64
3.3. Obtención e identificación de aislamientos de muestras clínicas	66
3.3.1. Muestras orales.....	66
3.3.2. Muestras vulvovaginales.....	66
3.3.3. Identificación de los aislamientos obtenidos de las muestras clínicas	67
3.3.3.1. <i>Identificación mediante PCR convencional</i>	67
3.3.3.1.1. Separación y visualización de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa.....	68
3.3.3.2. <i>Identificación mediante test de asimilación de carbohidratos</i>	69
3.3.3.3. <i>Identificación mediante secuenciación de la región ribosómica</i>	69
3.3.3.3.1. Purificación de los productos de PCR	70
3.3.3.3.2. Secuenciación de los productos de PCR.....	70
3.3.3.3.3. Clonación de los productos de PCR en el vector pCR™ (Kit TA CLONING™).....	70
3.3.4. Extracción de ADN a partir de hisopos.....	71
3.3.4.1. <i>Extracción manual de ADN</i>	71
3.3.4.2. <i>Extracción automatizada de ADN</i>	71
3.3.4.3. <i>Medida de concentración y pureza de ADN</i>	73
3.4. PCR a tiempo real (qPCR) para la identificación de especies de <i>Candida</i>	73
3.4.1. Estudio de la región ITS para el diseño de PCR específicas.....	73
3.4.2. Diseño de cebadores	73
3.4.3. Diseño de sondas específicas	74
3.4.4. Control Interno (CI).....	74
3.4.5. Reacción de qPCR multiplex.....	74
3.5. Sensibilidad in vitro a compuestos antifúngicos	75
3.5.1. Método M27-A3 según CLSI	75
3.5.2. Método SENSITITRE YEASTONE10®	76
3.6. Caracterización de los genes <i>ERG11</i> , <i>TAC1</i> y <i>UPC2</i> en aislamientos de <i>Candida albicans</i>	77
3.6.1. Diseño de cebadores	79
3.6.2. Obtención de ADN a partir de cultivos de levaduras.....	80
3.6.3. Amplificación del gen <i>ERG11</i>	80
3.6.4. Amplificación del gen <i>TAC1</i> (<i>Transcription Activator 1</i>)	82
3.6.5. Amplificación del gen <i>UPC2</i> (<i>Uptake Control 2</i>)	82

3.7. Microevolución y resistencia a azoles en poblaciones experimentales de <i>Candida albicans</i>	83
3.7.1. Análisis de las secuencias de los clones y de las poblaciones seleccionadas	85
3.8. Identificación molecular de <i>Saprochaete capitata</i> en muestras de sangre y muestras clínicas incluidas en parafina	86
3.8.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre inoculadas artificialmente con células de <i>Saprochaete capitata</i>	86
3.8.2. Extracción de ADN a partir de muestras clínicas incluidas en parafina....	87
3.8.3. Diseño de cebadores y amplificación mediante PCR.....	87
3.9. Secuenciación del <i>Hot Spot 1</i> del gen <i>FKS</i> en <i>Saprochaete capitata</i>	88
3.9.1. Estudio de sensibilidad in vitro a los compuestos antifúngicos.....	88
3.9.2. Extracción de ADN	88
3.9.3. Diseño de cebadores degenerados.....	88
4. RESULTADOS	93
4.1 Aislamientos en muestras orales.....	93
4.2 Aislamientos de muestras vulvovaginales.....	95
4.2.1. Análisis de factores de riesgo de VVC/VVCR	96
4.2.2. Identificación de los aislamientos vulvovaginales mediante cultivo. Distribución de especies de <i>Candida</i>	97
4.2.2.1. Identificación de los aislamientos vulvovaginales en el laboratorio de referencia	97
4.3. Identificación de especies de <i>Candida</i> mediante PCR a tiempo real (qPCR)....	98
4.3.1. Estudio de la región del ARN ribosómico (ARNr) para el diseño de qPCR específicas. Diseño de cebadores	98
4.3.2. Diseño de sondas para la detección de especies de <i>Candida</i>	101
4.3.3. Desarrollo de un protocolo de qPCR para la detección de especies de <i>Candida</i>	102
4.3.3.1. Especificidad de las reacciones de qPCR.....	103
4.3.3.2. Determinación del límite de detección de la qPCR	106
4.3.3.3. Desarrollo de un protocolo de qPCR multiplex para la detección simultánea de especies de <i>Candida</i>	109
4.3.3.4. Diseño del control interno de amplificación para el ensayo de qPCR ..	111
4.3.4. Aplicación de la qPCR multiplex a muestras vulvovaginales humanas ...	112
4.4. Sensibilidad a antifúngicos	117
4.4.1. Aislamientos vulvovaginales.....	117
4.4.1.1. CLSI M27-A3.....	117

4.4.1.2. <i>Sensititre Yeast One</i> [®]	118
4.4.2. Cepas de la colección de la UPV/EHU.....	120
4.4.2.1. <i>CLSI M27-A3</i>	120
4.4.2.2. <i>Sensititre YeastOne</i> [®]	121
4.5. Análisis mediante secuenciación de mutaciones GOF de genes implicados en la resistencia a azoles	124
4.5.1. Diseño de cebadores	125
4.5.1.1. Cebadores para la amplificación del gen <i>ERG11</i>	125
4.5.1.2. Cebadores para la amplificación del gen <i>TAC1</i>	126
4.5.1.3. Cebadores para la amplificación del gen <i>UPC2</i>	129
4.5.2. Análisis de las secuencias de las cepas resistentes a azoles	129
4.5.2.1. Análisis de las secuencias de <i>ERG11</i>	131
4.5.2.2. Análisis de las secuencias de <i>TAC1</i>	134
4.5.2.3. Análisis de las secuencias de <i>UPC2</i>	136
4.5.3. Análisis de los factores de transcripción Tac1p y Upc2p y de Erg11p en las poblaciones experimentales BE-47 y SC5314 sometidas a la presión del fluconazol.....	137
5. Discusión	155
6. CONCLUSIONES	181
7. BIBLIOGRAFIA.....	185

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

En las últimas décadas se viene observando un incremento significativo de las infecciones fúngicas humanas (Lass-Flörl, 2009). Las terapias inmunosupresoras, el uso de antineoplásicos y antibióticos de amplio espectro, así como los procedimientos quirúrgicos extensos o los trasplantes tanto de órgano sólido como de médula ósea, son factores conocidos e implicados en este aumento (Holzheimer & Dralle, 2002). Los avances médico quirúrgicos han permitido la supervivencia de pacientes críticos que de por sí son vulnerables a las infecciones fúngicas. Las micosis pueden ser superficiales, afectando a la piel, pelo, uñas y mucosas, o sistémicas, implicando a órganos internos (Rüping, Vehreschild, & Cornely, 2008). Dentro de los hongos causantes de infección destaca el género *Candida* que es la cuarta causa de infección nosocomial, tras estafilococos y enterococos (Wisplinghoff et al., 2004), con una tasa asociada de mortalidad que oscila entre el 30% y el 60% (Aballéa et al., 2013; Bouza & Muñoz, 2008). El segundo lugar entre las infecciones fúngicas lo ocupan los hongos filamentosos, destacando las aspergilosis, causadas por hongos del género *Aspergillus*.

Las micosis invasoras causadas por *Candida* y *Aspergillus* son las más frecuentes en los pacientes con inmunodeficiencias importantes. Sin embargo, hay un número creciente de especies de hongos que aprovechándose de estas condiciones especiales causan infecciones menos comunes, pero muy graves y con una alta tasa de mortalidad. Destacan los géneros *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Saprochaete* entre otros (M. A. Pfaller & Diekema, 2004).

1.1. El género *Candida*

De los hongos considerados patógenos humanos, los miembros del género *Candida* están entre los más frecuentemente aislados. Este género comprende un grupo de levaduras descrito por primera vez por Berkhout en 1923 (Berkhout, 1923), y se incluye dentro del *Phylum Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales* (C. Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011). Aunque *Candida* incluye más de 150 especies, solamente una minoría ha sido relacionada con enfermedades humanas, de hecho, alrededor del 65% de las especies del género

Candida son incapaces de crecer a 37°C, condición indispensable para generar una infección en el ser humano (Schauer & Hanschke, 1999). La mayoría de las infecciones en humanos son generadas por *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, siendo *C. albicans* la especie más prevalente, aunque en los últimos años la frecuencia de aislamientos de especies de *Candida* no-*Candida albicans* (NCA) ha aumentado de manera reseñable. De todos modos, es importante resaltar que la prevalencia de cada especie varía en función del área geográfica y del tipo de paciente (Foxman, Muraglia, Dietz, Sobel, & Wagner, 2013; M. A. Pfaller & Diekema, 2007).

1.1.1. *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, y habitualmente está presente como comensal en las mucosas de la cavidad oral y tracto gastrointestinal y urogenital de los seres humanos, al igual que el resto de especies no-*albicans*. Sin embargo, son patógenos oportunistas, y bajo ciertas condiciones son capaces de desencadenar una infección, desde una candidiasis superficial o mucocutánea si afecta a la piel o a las mucosas, hasta una candidiasis sistémica o invasiva, cuando el hongo se disemina por el torrente sanguíneo invadiendo tejidos y órganos internos (Calderone & Clancy, 2012; Odds, 1988a).

1.1.1.4. *Morfología de Candida albicans*

Candida albicans crece en forma de levaduras o blastoconidios, que son células de aspecto ovoide con un tamaño de 3-9 x 2-8 µm, que se multiplican por gemación. Su crecimiento levaduriforme se ve favorecido a temperaturas inferiores a 33°C y pH ácido. Otras especies de *Candida* tienen también la capacidad de formar pseudohifas o pseudomicelios, formados por cadenas de blastoconidios alargados no separados. Sin embargo, únicamente *C. albicans* y *Candida dubliniensis* son capaces de formar verdaderas hifas, por lo que a estas dos especies se les considera dimórficas. Las hifas son estructuras alargadas y cilíndricas separadas por septos y cuyo crecimiento se ve favorecido por temperaturas superiores a 33°C y pH cercano a la neutralidad (Mayer, Wilson, & Hube, 2013). La transición entre estos dos tipos morfológicos está considerada como un factor crucial en la patogenicidad del hongo. Ambas morfologías son importantes para la virulencia de

C. albicans, ya que los mutantes a los que les faltan genes responsables de la producción de una u otra forma, son menos virulentos.

En condiciones adversas pueden aparecer en el ápice de las hifas unas células redondeadas de 6-20 μm de diámetro y pared gruesa denominadas clamidosporas o clamidioconidios, los cuales son formas de resistencia. Estas células tienen una actividad metabólica muy baja y pueden originar una nueva célula o bien degenerar (Miller & Finnerty, 1979).

1.1.1.2. Genoma de *Candida albicans*

Candida albicans es un diploide estricto y su genoma está compuesto por ocho pares de cromosomas homólogos, cuyo tamaño oscila entre 0,95 y 3 Mb. Los cromosomas están numerados de 1 a 7, siendo el 1 el más grande y el 7 el más pequeño. El último cromosoma, el cromosoma R, denominado así porque contiene el ARN ribosómico (ARNr) suele ser el más grande, aunque esto depende del número de repeticiones de ARNr (Magee, 2007). A pesar de ser un diploide estricto, se han detectado trisomías en cepas de laboratorio, y en otras se ha observado que son viables a pesar de tener un genoma no del todo diploide.

La publicación de la secuencia completa del genoma diploide de *C. albicans* fue realizada por el Stanford Genome Center a partir de la cepa de referencia SC5314 (Jones et al., 2004). La secuencia del genoma reveló un sorprendente nivel de heteroziguidad para un organismo con reproducción clonal. Se describieron más de 62.000 puntos heterocigotos, uno cada 237 pb, incluidos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e inserciones de varias kilobases (Braun et al., 2005). Se postula que la función de la heterociguidad puede ser la de proveer variación genética al hongo, de modo que distintos alelos codifiquen proteínas con distintas funciones (Uhl, Biery, Craig, & Johnson, 2003). La heterociguidad no está distribuida homogéneamente por todo el genoma, siendo los cromosomas 5 y 6 los de mayor grado, y los cromosomas 3 y 7 los de menor. Dentro de las regiones heterocigóticas del cromosoma 5 destaca el locus *MTL* (*Mating Type-Like*), que constituye la mayor región cromosómica conocida con elevada tasa de heterociguidad. El elevado grado de heterociguidad, junto con el hecho de ser un organismo diploide, sin ciclo sexual bien establecido y con un uso de codones diferente al de *Saccharomyces cerevisiae* (el codón CUG es traducido por serina en

lugar de leucina) ha dificultado los estudios a nivel molecular de *C. albicans* (Dégano-Blázquez, 2011)

El genoma de *C. albicans* tiene una elevada plasticidad, de hecho, aunque el cariotipo estándar corresponde al de 8 cromosomas, son muy frecuentes los aislamientos clínicos con cariotipos alternativos. Se sabe que muchos de estos cariotipos afectan el fenotipo, Legrand y colaboradores (2004) (Legrand et al., 2004) correlacionaron estos cambios fenotípicos con la resistencia a antifúngicos. Sin embargo, se desconoce el efecto de la mayoría de ellos.

La publicación de la secuencia completa del genoma ha supuesto un avance importantísimo en la investigación dirigida al diagnóstico, tratamiento y caracterización de resistencias de las diferentes formas de infección que puede generar este microorganismo, ya que el conocimiento a nivel molecular es un requisito indispensable para avanzar en esta área.

1.1.1.3. Ciclo sexual de *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo diploide con fase haploide no conocida, a diferencia de la mayoría de las levaduras. Durante mucho tiempo, este microorganismo fue considerado asexual, debido a la multiplicación clonal con baja frecuencia de recombinación. Sin embargo, este concepto cambió con el descubrimiento del locus de apareamiento *MTL* (*Mating Type Locus*), ortólogo del locus *MAT* de *S. cerevisiae* (Hull & Johnson, 1999; Hull, Raisner, & Johnson, 2000). Debido a la propia naturaleza diploide de *C. albicans* el locus *MTL* contiene dos alelos, el *MTLa* y el *MTL α* , y la mayoría de cepas son heterocigóticas para este locus. Slutsky y colaboradores (1987) describieron cómo *C. albicans* lleva a cabo un cambio fenotípico o *switching* reversible de blanco (forma levaduriforme normal) a opaco (célula elongada), que es la forma competente para llevar a cabo el apareamiento (Slutsky et al., 1987). Este cambio blanco-opaco es controlado por el locus *MTL* y se trata de un paso crítico en el ciclo sexual de *C. albicans* (Soll, 2014). Recientemente se le ha otorgado una nueva función al ciclo sexual de *C. albicans* en relación a la resistencia a fluconazol, este apareamiento podría suponer la combinación de distintos mecanismos de resistencia en una única célula, generando así variantes con una mejor adaptación al medio hostil (Morschhäuser, 2016).

1.1.1. Especies de *Candida* no-*Candida albicans* (NCA)

A pesar de que hay descritas más de 150 especies de *Candida*, el 90% de las candidiasis están causadas por cinco especies: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Otras especies, como *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida norvegensis* y *Candida rugosa*, pueden causar infecciones de manera esporádica. La frecuencia de las especies de *Candida* causantes de infecciones invasoras presenta importantes variaciones según la localización geográfica y el grupo concreto de enfermos.

1.1.1.1. *Candida parapsilosis*

Originalmente fue nombrada *Monilia parapsilosis*, y estuvo considerada el anamorfo de *Lodderomyces elongisporus*, no obstante, hoy en día estas dos especies se encuentran clasificadas en taxones diferentes (S. R. Lockhart, Messer, Pfaller, & Diekema, 2008). *Candida parapsilosis* puede crecer como levadura y puede también formar pseudohifas, sin embargo, al contrario que *C. albicans* y *C. dubliniensis*, no puede formar hifas verdaderas. Es un organismo diploide (Butler et al., 2009). Se puede aislar de piel y uñas, incluyendo las manos del personal sanitario, ya que forma parte de la microbiota habitual del ser humano. Más preocupante resultan los casos de aislamientos de *C. parapsilosis* de superficies de una gran variedad de instrumental médico, como pueden ser catéteres intravasculares, líneas de nutrición parenteral o de dispositivos prostéticos, lo que la hace única entre las especies de *Candida* (Trofa, Gacser, & Nosanchuk, 2008; van Asbeck, Clemons, & Stevens, 2009). Realmente *C. parapsilosis* es considerado un importante patógeno emergente (Trofa et al., 2008), y el hecho de ser aislada de superficies de hospital hace que esté involucrada frecuentemente en infecciones nosocomiales, destacando las infecciones en UCIs, neonatos y pacientes con nutrición parenteral (Cano et al., 2005; Levin et al., 1998; van Asbeck et al., 2009).

Candida parapsilosis presenta un menor grado de virulencia que *C. albicans*, probablemente debido a su incapacidad de formar hifas verdaderas y al menor grado de adhesión a células epiteliales que presenta (van Asbeck et al., 2009). Sin embargo, sí es capaz de adherirse fácilmente al instrumental médico formando biopelículas. La formación de biopelículas es un importante factor de virulencia y ocurre cuando hay un elevado nivel de glucosa en el medio, lo que explicaría el

aumento en la prevalencia de candidemia por *C. parapsilosis* en pacientes con nutrición parenteral (Nosek, Holesova, Kosa, Gacser, & Tomaska, 2009).

Candida parapsilosis fue inicialmente subdividida en tres grupos, denominados grupo I, grupo II y grupo III, predominando de manera clara en las muestras clínicas el grupo I. Posteriormente, tras varios análisis moleculares, estos tres grupos fueron clasificados como tres especies; el grupo I se designó como *C. parapsilosis sensu stricto*, el grupo II como *Candida orthopsilosis* y el grupo III como *Candida metapsilosis* (Tavanti, Davidson, Gow, Maiden, & Odds, 2005). Las tres especies se localizan en el clado CTG de los hemiascomicetos junto con otras levaduras patógenas de *Candida*, como *C. albicans* y *C. dubliniensis*, entre otras ([Figura 1](#)) (Diezmann, Cox, Schonian, Vilgalys, & Mitchell, 2004).

1.1.1.2. *Candida glabrata*

Candida glabrata, anteriormente denominada *Torulopsis glabrata*, crece como levadura de forma ovalada, y al contrario que muchas de las otras especies patógenas, no es dimórfica. Es haploide, y filogenéticamente se encuentra más cercana a *S. cerevisiae* que al resto de especies patógenas de *Candida* (C. P. Kurtzman & Robnett, 1997). En las dos últimas décadas la frecuencia de aislamientos de *C. glabrata* ha ido en aumento (Chakrabarti et al., 2009; Cuenca-Estrella et al., 2005; Diekema et al., 2002; Hachem, Hanna, Kontoyiannis, Jiang, & Raad, 2008; Leroy et al., 2009; Li, Redding, & Dongari-Bagtzoglou, 2007; Moran, Coleman, & Sullivan, 2012; Odds et al., 2007). Forma parte de la microbiota humana, y se aísla frecuentemente de la cavidad oral, principalmente en combinación con *C. albicans* (Li et al., 2007). La colonización oral por *C. glabrata* aumenta con la edad (S. Lockhart et al., 1999), es la segunda especie, por detrás de *C. albicans*, en pacientes diabéticos (Kadir et al., 2002; Moran et al., 2012), y también está presente de manera común en la cavidad oral de pacientes infectados con VIH (Moran et al., 2012).

Candida glabrata es un patógeno emergente, y los estudios realizados en distintas partes del mundo han corroborado este hecho (M. Pfaller & Diekema, 2004). Este aumento se ha relacionado con el uso profiláctico de fluconazol ya que *C. glabrata* presenta una sensibilidad reducida a este antifúngico, y es capaz de desarrollar resistencia cruzada a otros azoles tras una exposición a fluconazol (Khan et al.,

2008; I. Lee et al., 2009; vanden Bossche, Marichal, Odds, Le Jeune, & Coene, 1992). Por otro lado, se han detectado mutaciones en los genes *CgFKS1* y *CgFKS2*, que han sido asociadas a sensibilidad reducida a caspofungina (Garcia-Effron, Lee, Park, Cleary, & Perlin, 2009), y también se han reportado aislamientos clínicos de *C. glabrata* resistentes a polienos (Vandeputte et al., 2007; Vandeputte et al., 2008). Este rápido desarrollo de resistencia a los compuestos antifúngicos se debe a la naturaleza haploide del genoma de *C. glabrata*.

Actualmente *C. glabrata* es considerada un complejo de especies que incluye a *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis*, siendo *C. glabrata* la más virulenta y *C. nivariensis* la más sensible a equinocandinas y azoles. Hecho que pone de manifiesto la importancia de una correcta identificación de estas nuevas especies crípticas (Dudiuk, Theill, Gamarra, & Garcia-Effron, 2017).

1.1.1.3. *Candida tropicalis*

Candida tropicalis puede crecer como levadura y puede también formar pseudohifas. Es un organismo diploide y también pertenece al clado CTG de los hemiascomicetos, junto con otras especies patógenas de *Candida* (Diezmann et al., 2004). *Candida tropicalis* forma parte de la microbiota humana y puede causar candidiasis invasora en pacientes con patologías importantes de base, especialmente en pacientes con cáncer (Kofteridis, Lewis, & Kontoyiannis, 2009; Leung et al., 2002; Richardson & Lass-Flörl, 2008), de hecho, esta especie está relacionada con la desproporcionada cantidad de infecciones diseminadas en pacientes oncohematológicos (Wingard, 1995). Asimismo, estas infecciones diseminadas en este tipo de paciente están asociadas a altas tasas de mortalidad (Viscoli et al., 1999). La fuente de infección suele ser endógena, principalmente del tracto gastrointestinal, aunque también se han descrito infecciones de origen nosocomial (Richardson & Lass-Flörl, 2008; T. J. Walsh & Merz, 1986). En pocas ocasiones se relaciona *C. tropicalis* con candidiasis orofaríngea, aunque cuando aparece suele ser más virulenta que *C. albicans* (T. J. Walsh & Merz, 1986).

Candida parapsilosis, *C. glabrata* y *C. tropicalis* constituyen el grupo de especies aisladas con mayor frecuencia después de *C. albicans*, aunque existen diferencias en cuanto a su distribución dependiendo del país (Moran et al., 2012): *Candida parapsilosis* es la segunda especie aislada más frecuentemente en hemocultivo en

México, Sudamérica y en la región mediterránea. *C. glabrata*, por el contrario, aparece en segundo lugar en EEUU, Canadá y norte de Europa. Finalmente, *C. tropicalis* es la especie prevalente tras *C. albicans* en Venezuela, Colombia, Oriente Medio y en el este asiático (Quindós, Aguirre et al., 2015).

1.1.1.4. *Candida krusei*

Candida krusei, anamorfo *Issatchenkia orientalis*, crece como levadura y puede formar pseudohifas. A diferencia de las tres especies no-*albicans* anteriores, son relativamente raros los casos de aislamientos clínicos de esta especie, y están asociados generalmente a pacientes oncohematológicos (Abbas et al., 2000). Forma parte de la microbiota, con lo cual el foco de infección suele ser endógeno. El aislamiento de *C. krusei* es preocupante, ya que posee una resistencia intrínseca a fluconazol y a anfotericina B, dos compuestos usados muy comúnmente en la práctica clínica (M. A. Pfaller & Diekema, 2004), y también se han reportado casos de aislamientos con sensibilidad reducida a caspofungina (Kahn et al., 2007).

1.1.1.5. *Otras especies de Candida*

Candida dubliniensis, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* o *C. rugosa* son especies que raramente causan enfermedad en humanos, pero que pueden aparecer y pueden causar infección. *Candida dubliniensis* es una especie muy cercana a *C. albicans*, y se suele aislar principalmente de la cavidad oral de pacientes con VIH (Sullivan & Coleman, 1997). *Candida guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. rugosa* son especies que merecen atención, ya que a pesar de ser aisladas con una frecuencia realmente baja, son especies que muestran resistencia a distintos compuestos antifúngicos (Moran et al., 2012; M. A. Pfaller et al., 2006), lo que complica mucho su tratamiento.

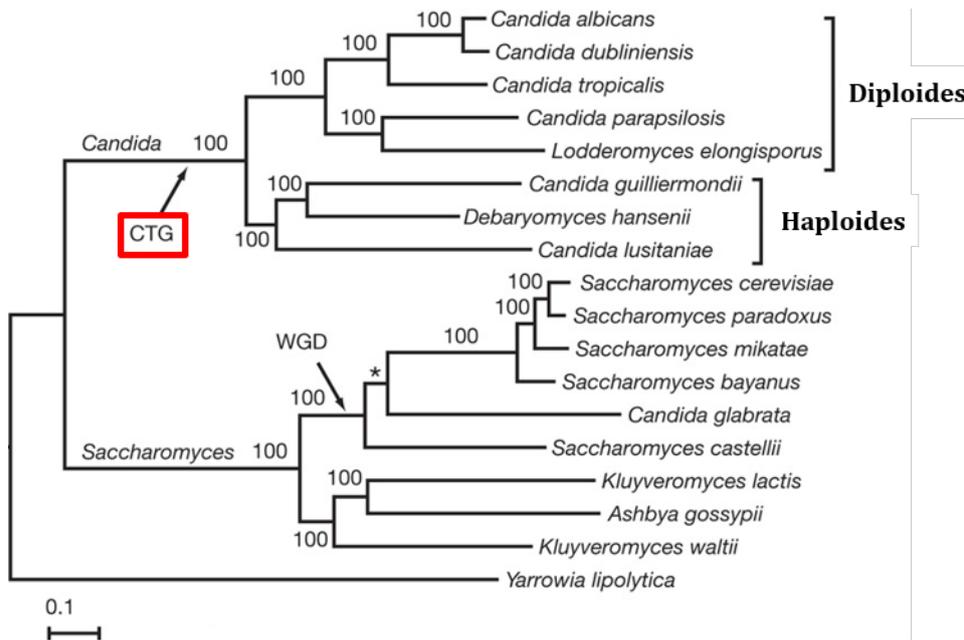


Figura 1. Árbol filogenético de las especies de *Candida* y *Saccharomyces* cuyos genomas han sido secuenciados. El clado CTG, señalado en rojo, incluye la mayoría de las especies patógenas de *Candida*; WGD: *Whole Genome Duplication*-Duplicación completa del genoma (Imagen modificada de (Butler et al., 2009)).

1.2. Candidiasis

Las candidiasis son las micosis oportunistas más frecuentes que padecen los seres humanos. Se manifiestan de forma habitual como enfermedades leves de las mucosas oral y genital, de la piel y de las uñas. En raras ocasiones pueden ser recalcitrantes al tratamiento o volverse recurrentes. Mucho más infrecuentes son las candidiasis invasoras, pero con una morbilidad y mortalidad muy altas, debido sobre todo a que las personas que las padecen sufren enfermedades subyacentes graves.

1.2.1. Candidiasis oral (CO)

La candidiasis oral (CO) es la infección micótica oral más frecuente. A pesar de estar asociada típicamente a la infancia y a la ancianidad, ha pasado a ser una manifestación común en otros grupos de pacientes con otras patologías, como los infectados por VIH o los sometidos a terapias inmunomoduladoras o antineoplásicas (Aguirre, 2002), de hecho, Hipócrates ya describió este tipo de patología oral en personas enfermas y muy débiles (Lynch, 1994).

1.2.1.1. Manifestaciones clínicas

En cuanto a las manifestaciones clínicas de la candidiasis oral, ésta puede clasificarse en: candidiasis pseudomembranosa (aguda-crónica), candidiasis eritematosa (aguda-crónica), candidiasis hiperplásica (leucoplásica), lesiones asociadas (estomatitis protética, queilitis angular, glositis rómbica, queilitis exfoliativa) y candidiasis mucocutánea (crónica) (Patil, Rao, Majumdar, & Anil, 2015).

1.2.1.2. Epidemiología y factores etiopatogénicos

La presencia de *Candida* en la cavidad oral es frecuente y oscila entre un 20% y un 70%, siendo *C. albicans* la especie prevalente. *Candida glabrata* o *C. tropicalis* se identifican hasta en un 7% de las personas, mientras que otras especies como *C. krusei* o *C. guilliermondii* raramente aparecen (Aguirre, 2002).

La patogénesis de la candidiasis oral es compleja y, a pesar de no conocerse completamente los mecanismos, se da por hecho que es un proceso multifactorial que implica diferentes factores tanto del hongo como del hospedador. La posibilidad de que *Candida* colonice las superficies orales depende tanto de la efectividad de los mecanismos defensivos del hospedador, como de la capacidad de adhesión del hongo y de su poder de crecimiento (Aguirre, 2002).

La mucosa oral protege la cavidad oral contra la invasión candidiásica, de modo que todas aquellas circunstancias que alteren la integridad de la misma favorecen la adhesión del hongo y la invasión. La saliva constituye un elemento antifúngico de primer orden ya que tiene una labor de barrido mecánico que dificulta la adhesión del hongo, por tanto, todas las situaciones que reducen la producción de saliva favorecen la aparición de la CO (Anil et al., 2016).

La mayor presencia de CO en las edades extremas de la vida se asocia a una serie de factores que inciden con más intensidad o mayor frecuencia en estos periodos (Meira et al., 2017). La inmadurez del sistema inmunitario, la aparición de infecciones que conllevan el uso de antibióticos de amplio espectro o el estrecho contacto con la madre y los cuidadores, favorecen el contagio en la infancia. En los adultos favorece su aparición la utilización de antibióticos de amplio espectro, la

xerostomía (Anil et al., 2016), la utilización de corticoides inhalados, el tabaquismo, o los tratamientos inmunosupresores y antineoplásicos, entre otros.

Por otro lado, muchas son las enfermedades que han sido asociadas a la CO, la infección por VIH, debido a la reducción de linfocitos T CD4⁺ que se encargan del control de las levaduras en la mucosa oral (Wu et al., 2012), el cáncer, la diabetes sin controlar y ciertas inmunodeficiencias como la candidiasis mucocutánea crónica (Kirkpatrick, 1994).

Finalmente, en lo referente a los factores de patogenicidad asociados al hongo, destacan la producción de biopelículas, la adhesión a la mucosa oral, el dimorfismo o la secreción de enzimas hidrolíticas (Naglik, Fidel Jr, & Odds, 2008).

1.2.2. Vulvovaginitis candidiásica (VVC)

1.2.2.1. Epidemiología de la vulvovaginitis candidiásica

La presencia de *Candida* en la vagina, en ausencia de inmunosupresión y sin que haya daño en las mucosas, no está asociada a ningún signo de enfermedad y se conoce como colonización. Se denomina candidiasis vulvovaginal o vulvovaginitis candidiásica (VVC) a los signos y síntomas de inflamación que ocurren en vagina y vulva en presencia de especies de *Candida* y en ausencia de ningún otro agente etiológico (Achkar & Fries, 2010). La VVC es la segunda causa de infección vaginal, por detrás de la vaginosis bacteriana (Ilkit & Guzel, 2011), y se estima que un 75% de mujeres en edad reproductiva experimentará por lo menos un episodio de VVC, y que de éstas la mitad experimentará una segunda infección (Hurley & De Louvois, 1979). Por otro lado, se estima que entre un 5% y un 8% de las mujeres adultas padecerán VVC de manera recurrente (VVCR), que se define como cuatro episodios o más de VVC por año (Foxman, Marsh, Gillespie, & Sobel, 1998). No obstante, estos datos epidemiológicos, frecuentemente citados en la literatura, son cuestionados por varios autores (Rathod & Buffler, 2014). El hecho de que no sea una infección de declaración obligatoria y la disponibilidad de los fármacos antifúngicos tópicos sin receta médica, hace que el diagnóstico correcto no se realice siempre y que, por lo tanto, los estudios epidemiológicos estén sesgados (J. D. Sobel, 2016).

El prurito vulvar es el síntoma más frecuente y aparece prácticamente en todos los casos. La leucorrea no siempre está presente, y habitualmente es poco abundante, incluso algunas pacientes refieren sensación de sequedad. Otras molestias vulvovaginales como dolor, irritación, ardor vulvar, dolor al orinar y dispareunia son casi constantes (J. D. Sobel, 2007a). Durante la exploración en la consulta médica, los signos clínicos más habituales son el eritema de la mucosa vaginal y vulvar, el edema vulvar y el exudado vaginal abundante de color blanco-amarillento, espeso, grumoso, adherente y sin olor característico. El cuadro de vulvitis eritematosa puede extenderse hacia las regiones perineales e inguinales y las excoriaciones y fisuras aparecen frecuentemente (Anderson, Klink, & Cohrsen, 2004). A pesar de que todos los signos y síntomas son muy frecuentes en la VVC, ninguno de ellos es patognomónico ni específico, por lo que el diagnóstico no debe basarse exclusivamente en la anamnesis y la exploración física, y debe recurrirse también al cultivo (Edwards, 2004).

1.2.2.2. Etiología de la vulvovaginitis candidiásica

Alrededor del 90% de las levaduras que se aíslan de la vagina pertenecen a la especie *C. albicans* (Odds, 1988b), aunque estudios más recientes revelan que este porcentaje es menor, y lo sitúan por debajo del 85% (Goncalves et al., 2016). El resto corresponden al grupo de especies no-*C. albicans*, entre las cuales destaca *C. glabrata*, aunque cualquiera de las especies patógenas de *Candida* ha sido relacionada con esta infección (Buscemi, Arechavala, & Negroni, 2004; Corsello et al., 2003; Nyirjesy, Alexander, & Weitz, 2005; Okungbowa, Isikhuemen, & Dede, 2003; Singh, Sobel, Bhargava, Boikov, & Vazquez, 2002).

La clínica de la VVC producida por especies NCA es exactamente igual a la producida por *C. albicans*, no obstante, estas especies suelen ser refractarias al tratamiento -especialmente *C. glabrata* y *C. krusei*- y por tanto causar recurrencias. En este sentido, durante los últimos años se han producido dos hechos probablemente interrelacionados: un aumento en la incidencia de VVC por especies NCA y una mayor tasa de recurrencias (Barrenetxea, 2002; J. D. Sobel, 2007a). Este fenómeno se achaca al uso inapropiado y generalizado de los antimicóticos, que ha dado lugar a una selección de especies NCA (Goncalves et al., 2016), que suelen ser más resistentes a los antifúngicos (J. D. Sobel et al., 1998). De

hecho, se aíslan más frecuentemente cepas no-*C. albicans* de pacientes con VVC recurrente que de pacientes con VVC esporádica (Amouri et al., 2011). Sin embargo, distintos estudios multicéntricos no han podido confirmar este cambio epidemiológico de las especies NCA (J. D. Sobel, 2007a).

1.2.2.3. Patogénesis de la vulvovaginitis candidiásica

Candida albicans es un comensal presente en el tracto gastrointestinal desde donde migra hasta llegar a la vagina. En este punto algunas levaduras, tras adherirse a las células epiteliales, consiguen colonizar la vagina, que es el primer paso para la VVC; las causas que la promueven pueden ser genéticas, biológicas y/o conductuales ([Figura 2](#)). En mujeres sanas, sin síntomas de infección, esta colonización puede persistir durante meses o incluso años, ya que las levaduras mantienen una relación simbiótica con el resto de la microbiota. El episodio de candidiasis se inicia porque hay una ruptura en esta relación simbiótica, que conlleva un sobrecrecimiento de la población de *Candida* o una alteración en los mecanismos de defensa del hospedador; estos últimos se encargan por un lado de mantener una carga fúngica baja, y por otro regulan la inmunidad de la mucosa con el fin de tolerar la presencia de una baja cantidad de levaduras. Además, las causas que promueven esta transición de colonización asintomática a candidiasis sintomática pueden diferir de aquellas que promueven la infección (J. D. Sobel, 2016).

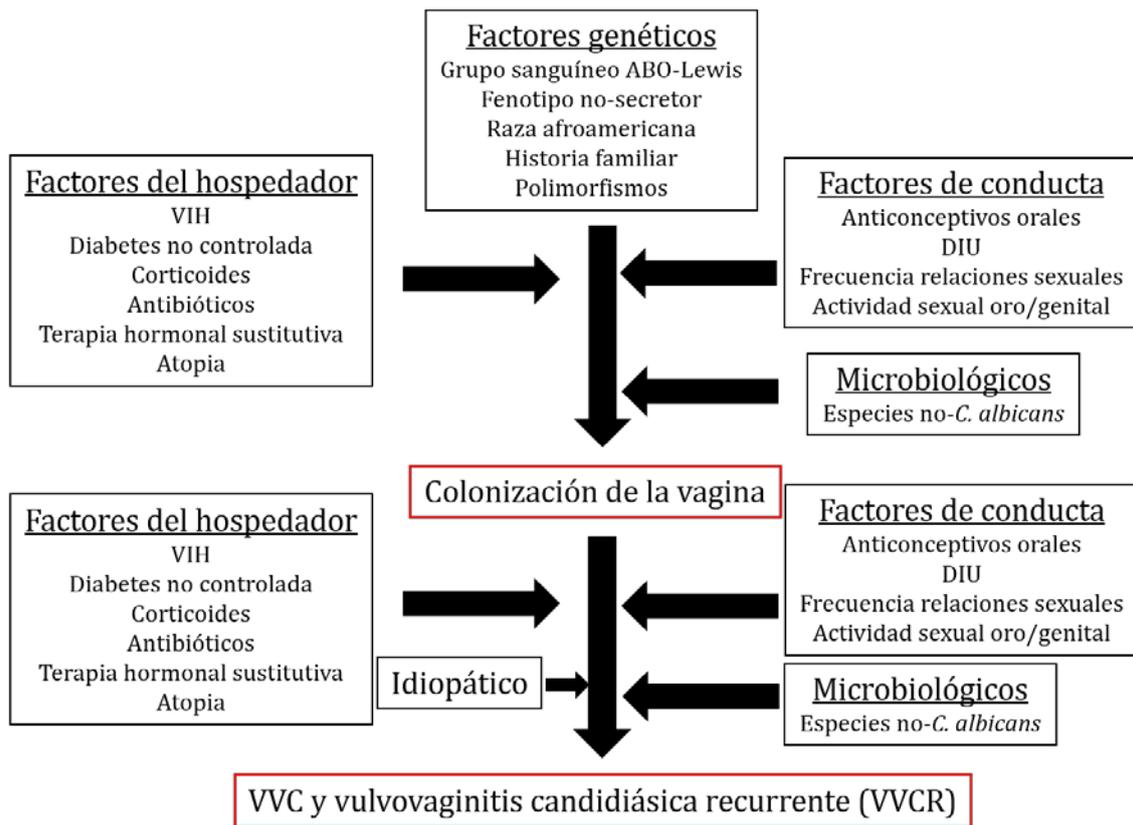


Figura 2. Factores de riesgo implicados en la colonización por *Candida*, y en la transformación de la misma en episodios de vaginitis sintomática, VVC o VVC recurrente (VVCR) (Modificado de (J. D. Sobel, 2016)).

1.2.2.4. Factores de riesgo asociados a la vulvovaginitis candidiásica

Entre la población de *Candida* colonizadora de la vagina y el hospedador existe un equilibrio que puede verse alterado y hacer que esta colonización evolucione a infección. Hay ciertos factores, tanto del hospedador como de su modo de vida, a los cuales se les ha atribuido el papel de factores de riesgo ya que promueven la aparición de la VVC.

1.2.2.4.1. Embarazo

El embarazo ha sido considerado un importante factor de riesgo para el desarrollo de VVC, y estudios epidemiológicos realizados durante las últimas dos décadas en Europa, África e India lo avalan de manera consensuada (Goncalves et al., 2016). Y no sólo la infección, sino que también la colonización aumenta la prevalencia de la candidiasis en mujeres embarazadas (Jabeen & Siddiqi, 2014). Como mecanismos se han descrito un incremento del nivel de estrógenos que da lugar a un aumento de contenido de glucógeno en el medio vaginal, una mayor capacidad de adhesión a

las células epiteliales y una potenciación de la formación de micelios (Cararach-Tur et al., 2013; Kalo & Segal, 1988).

1.2.2.4.2. Antibióticos

La utilización de antibióticos puede incrementar tanto la colonización como la infección por *Candida* (J. D. Sobel, 2007a), aunque diversos estudios caso-control no han resultado definitivos en ese sentido (Barrenetxea, 2002), los antibióticos eliminarían o disminuirían la microbiota bacteriana de la vagina, compuesta principalmente por especies de *Lactobacillus* (Cribby, Taylor, & Reig, 2008), la cual representa la primera línea de defensa contra *Candida* (Hamad et al., 2006).

1.2.2.4.3. Diabetes

Se ha observado un aumento de la colonización por *Candida* y de prevalencia de la VVC y VVCR en mujeres diabéticas, probablemente debido al aumento de los niveles de glucógeno disponible (D. Goswami et al., 2006; R. Goswami et al., 2000). Además, se ha observado que las mujeres con diabetes mellitus tipo 2 mal controlada son más tendentes a la colonización por especies NCA, sobre todo por *C. glabrata* (Fidel, Vazquez, & Sobel, 1999; Vermitsky et al., 2008a).

1.2.2.4.4. Inmunosupresión

Todas las infecciones causadas por las especies del género *Candida* son dependientes del hospedador, y por lo tanto, la respuesta inmune es crucial en esta interacción patógeno-hospedador (Richarson & Rautemaa, 2009). Es por ello, que en condiciones tales como infecciones por VIH, quimioterapia, terapia con glucocorticoides, trasplante de órganos, cáncer, diabetes mellitus, tuberculosis o cualquier enfermedad crónica que implique cierto grado de inmunosupresión, pueden aumentar las posibilidades de desarrollar VVC (Goncalves et al., 2016).

1.2.2.4.5. Uso de anticonceptivos hormonales

Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en torno a este factor de riesgo son contradictorios (Andrioli et al., 2009; Egbe, Onwufor, Omoregie, & Enabulele, 2011). Algunos autores proponen que los efectos de los anticonceptivos hormonales serían similares a los que ocurren durante el embarazo, y que detrás de este factor de riesgo está también el aumento del glucógeno y de la

disponibilidad de una fuente de carbono en la vagina (Reed, 1992). Sin embargo, otros autores discrepan respecto a esta asociación (Goncalves et al., 2016).

1.2.2.4.6. Predisposición genética

Muchas son las mujeres que sufren VVC sin que concurren ninguno de los factores de riesgo descritos anteriormente, con lo cual, muchos estudios se centran en intentar elucidar la posible predisposición genética de estas mujeres a padecer VVC. En este aspecto, se han observado asociaciones entre varios genes involucrados en la inmunidad innata y la susceptibilidad a padecer VVC y VVCR, incluyendo polimorfismos en los genes que codifican *MBL-Mannose-Binding Lectin*, *dectin-1*, *IL-4* o *NLRP3*, algunos de los cuales forma parte del inflammasoma (Gow et al., 2007; Rosentul et al., 2009).

1.2.2.5. *Vulvovaginitis candidiásica recurrente (VVCR)*

La vulvovaginitis candidiásica recurrente (VVCR) se define como la presencia de cuatro episodios o más de vulvovaginitis candidiásica en un año (J. D. Sobel et al., 1998; J. D. Sobel, 2007a), manteniéndose las pacientes totalmente asintomáticas entre episodio y episodio. Esta definición es arbitraria ya que ha sido imposible realizar estudios epidemiológicos y determinar la frecuencia de VVCR en mujeres (J. D. Sobel, 2016). Esto se debe principalmente a la disponibilidad y al uso indebido de los antimicóticos tópicos sin receta. Aunque esta disponibilidad ha supuesto una mejora en la calidad de la vida de las mujeres, también tiene aspectos negativos como son un diagnóstico poco fiable, basado en síntomas inespecíficos, y por lo tanto sobreestimado (Ferris et al., 2002). Asimismo, parece que este abuso en la utilización de los antimicóticos tópicos va acompañado de un aumento en la incidencia de especies no-*C. albicans* (Goncalves et al., 2016) y de la frecuencia de aislamientos vulvovaginales de *C. albicans* con una sensibilidad reducida a azoles (Gamarra et al., 2014).

Se estima que la VVCR afecta aproximadamente a 138 millones de mujeres al año en el mundo entero, y que 492 millones la sufrirán al menos una vez durante su vida (J. D. Sobel, 2016). El agente etiológico es *C. albicans* en el 90% de los casos, seguido de *C. glabrata*, al igual que en los episodios esporádicos de VVC. Del mismo modo que ocurre en la VVC, la inmunidad innata y los polimorfismos descritos en

varios genes del inflammasoma parecen jugar un papel importante en la VVCR (Rosentul et al., 2009).

Las manifestaciones clínicas de la VVCR son las mismas que las de un episodio aislado de VVC no complicada (J. D. Sobel, 2003). Sin embargo, la VVCR por su frecuencia de aparición y su cronicidad, tiene efectos negativos adicionales, como pueden ser depresión y ansiedad (Aballéa et al., 2013; Hurley, 1975).

La estrategia terapéutica debe ser distinta de la utilizada en episodios ocasionales. Debe basarse en la confirmación del diagnóstico mediante cultivo, la aplicación de un tratamiento específico inicial y de otro de mantenimiento, así como la actuación sobre los factores de riesgo. Los fármacos utilizados en la actualidad en nuestro ámbito son azoles, se emplean clotrimazol, sertaconazol o fenticonazol de manera tópica durante 2 semanas, y fluconazol o itraconazol por vía oral durante unos 10 días. El tratamiento de mantenimiento implica los mismos compuestos y se aumenta el tiempo a 6-12 meses (Cararach-Tur et al., 2013). En el caso de las especies no-*albicans* se pautan tratamientos con ácido bórico y nistatina durante 2 semanas (J. D. Sobel, 2016).

La prevención de la VVCR, aunque limitada, es claramente necesaria, y las principales vías de actuación van dirigidas a mantener o reequilibrar la microbiota vaginal y reducir el impacto de los factores de riesgo de la VVC. No obstante, exceptuando la eliminación del agente causal, lamentablemente no existen evidencias científicas de la eficacia de ninguna estrategia preventiva.

1.3. Otras micosis

La frecuencia de las micosis, tanto superficiales como invasoras, se ha incrementado de manera considerable en las últimas décadas (M. A. Pfaller & Diekema, 2004; T. Walsh et al., 2004). Las micosis invasoras conllevan una elevada tasa de morbi-mortalidad (Gudlaugsson et al., 2003) ya que están asociadas a poblaciones de alto riesgo; entre otras, destacan las personas sometidas a trasplante de órgano sólido o de médula ósea, pacientes con grandes cirugías, con SIDA, cáncer, terapia inmunosupresora, o personas de avanzada edad, así como bebés prematuros (T. Walsh et al., 2004). *Candida* y *Aspergillus* son los géneros que se asocian más frecuentemente a las micosis invasoras, sin embargo, otras

Introducción

levaduras como *Saprochaete capitata*, *Trichosporon* o *Rhodotorula*, hongos zigomicetos o distintas especies de mohos pertenecientes a los géneros tales como *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium* o *Paecilomyces* han emergido como agentes patógenos capaces de causar infecciones sistémicas (M. A. Pfaller & Diekema, 2004). Este hecho ha convertido al campo de la micología médica en un reto, ya que cualquier hongo puede causar una infección letal en un paciente inmunodeprimido, y por lo tanto nunca hay que desestimar su potencial como agente etiológico de infección.

1.3.1. *Saprochaete capitata*

Saprochaete capitata (teleomorfo: *Magnusiomyces capitatus*) ([Figura 3](#)) previamente conocido como *Trichosporon capitatum*, *Geotrichum capitatum*, *Dipodascus capitatus* o *Blastoschizomyces capitatus*, es un hongo levaduriforme perteneciente a la división *Ascomycota*, orden *Saccharomycetales*, capaz de causar infecciones sistémicas con una elevada tasa de mortalidad (García-Ruiz et al., 2013).



Figura 3. *Saprochaete capitata* (*Magnusiomyces capitatus*). A) Morfología macroscópica de *S. capitata* en medio agar cromogénico para *Candida* (CONDA). B) Aspecto microscópico con tinción azul lactofenol. C) Corte histológico de bazo obtenido de un paciente infectado con *S. capitata*, donde se aprecian estructuras filamentosas (en morado) con forma de “fuego artificial” (García-Ruiz et al., 2013).

Es un hongo ubicuo ampliamente distribuido en la naturaleza, habita en el suelo, agua, así como en plantas y productos lácteos. Asimismo, se ha informado en la literatura sobre aislamientos de *S. capitata* en lavavajillas (Gümral et al., 2016), un nicho creado por el ser humano que también puede albergar otras especies patógenas fúngicas oportunistas (Zalar, Novak, De Hoog, & Gunde-Cimerman, 2011). Su distribución es variable según la región geográfica, siendo mayor la

presencia en Europa (sobre todo en España, Italia y Francia) que, en América, probablemente debido a factores climáticos (Chagas-Neto, Chaves, & Colombo, 2008). Además de ser un colonizador de piel, bronquios y tracto gastrointestinal en personas sanas, *S. capitata* es capaz de causar infecciones oportunistas diseminadas en pacientes con cáncer hematológico, especialmente en aquellos con leucemia aguda (Bouza & Munoz, 2004; Martino et al., 2004). La infección fúngica invasora (IFI) causada por *S. capitata*, conocida como geotricosis, es difícil de diferenciar de otras IFIs debido a que los síntomas son similares; aparece fiebre, no hay respuesta al tratamiento con antibióticos durante los largos períodos de neutropenia profunda, es común la aparición de fungemia, y pueden aparecer con cierta frecuencia lesiones cutáneas. Además, los abscesos de hígado y bazo son indistinguibles de aquellos observados en candidiasis sistémicas o trichosporonosis (Garcia-Ruiz et al., 2013; Quindos, Garcia-Ruiz, & Sanz, 2009; Sanz et al., 1996). Por todo esto, es una infección muy grave, con una elevada tasa de mortalidad que oscila entre el 50% y el 80% (Garcia-Ruiz et al., 2013; Martino et al., 2004).

El diagnóstico de la geotricosis, tanto de la superficial como de la invasiva, ha de hacerse en colaboración con el laboratorio de microbiología (o micología), ya que los síntomas son compartidos con otras infecciones causadas por distintos hongos. El diagnóstico microbiológico se basa en el aislamiento del hongo de muestras estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo o tejido), el cual es de rápido crecimiento en los medios microbiológicos convencionales. La identificación fenotípica se basa en el aspecto de las colonias, la morfología mediante microscopía y en perfiles bioquímicos. Aunque se han obtenido buenos resultados en la identificación de especies de *Candida* mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS-*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), el éxito de esta técnica para otros hongos es bajo (Sendid et al., 2013). En lo referente al diagnóstico no basado en el cultivo, la detección del 1,3- β -glucano (BG) en suero puede ser de gran ayuda (Persat et al., 2008), aunque tiene el inconveniente de ser una prueba panfúngica. Por otro lado, *S. capitata* produce un antígeno que reacciona con la prueba de detección de galactomanano (GM) de *Aspergillus*, aunque se han reportado casos en la literatura en los que aislamientos de *S. capitata* dieron resultados negativos para esta prueba (Garcia-Ruiz et al., 2013). No

Introducción

existen a día de hoy ensayos serológicos estandarizados para el diagnóstico de las geotricosis invasoras.

En lo referente al diagnóstico mediante técnicas moleculares, tampoco existen pruebas estandarizadas, y son escasas las reseñas en la literatura sobre el uso de la PCR para la detección del ADN de muestras clínicas. En este sentido, en este trabajo se presenta el desarrollo de una PCR útil para la rápida identificación de *S. capitata* en sangre y en muestras de tejido en parafina, que ya ha sido publicado (Arrieta-Aguirre et al., 2017a).

El tratamiento de la geotricosis supone todo un reto, de hecho, la recomendación inicial sigue siendo minimizar los factores de riesgo conocidos, como la inmunosupresión o la neutropenia, en la medida de lo posible. No obstante, cuando la infección ya se ha desarrollado hay que emplear terapia antifúngica. *Saprochaete capitata* tiene una sensibilidad reducida in vitro a la mayoría de los antifúngicos, y se han reportado casos de infecciones de brecha en pacientes oncohematológicos tratados de forma empírica con caspofungina o micafungina (Chittick, Palavecino, Delashmitt, Evans, & Peacock, 2009), y en pacientes en profilaxis con fluconazol (D'Antonio et al., 1996). De hecho, la mayoría de los médicos consideran *S. capitata* una especie intrínsecamente resistente a equinocandinas, con lo cual no está recomendado el tratamiento empírico con caspofungina y/o fluconazol en pacientes neutropénicos localizados en regiones donde se producen aislamientos de este hongo.

1.4. Fármacos antifúngicos

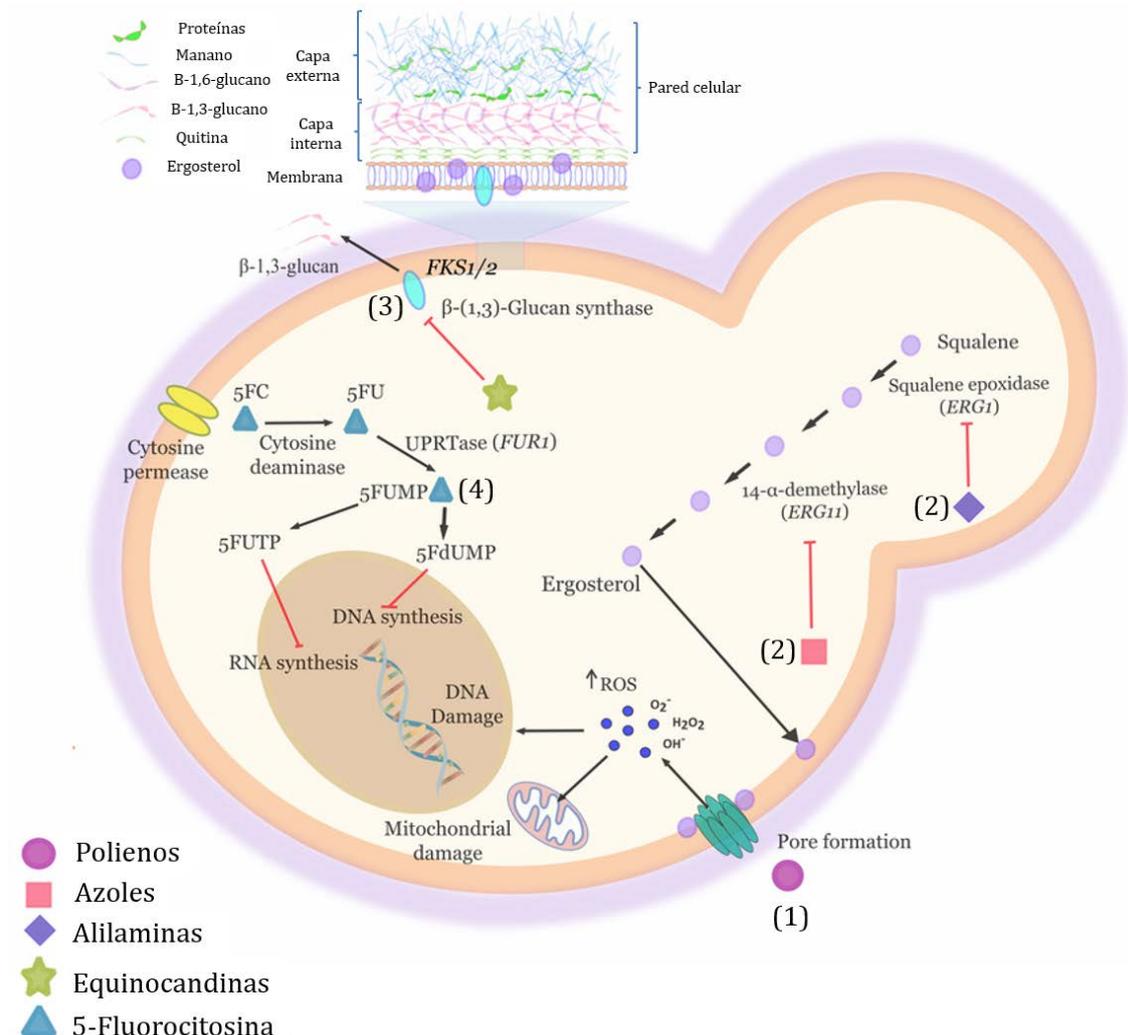


Figura 4. Mecanismos de acción de los fármacos antifúngicos. Cuatro son los mecanismos de acción de los principales fármacos antifúngicos. (1) Los polienos se unen al ergosterol, componente esencial de la membrana celular fúngica, y forma poros. Asimismo, aumentan el nivel de estrés oxidativo dentro de la célula, dañando las mitocondrias. (2) Los azoles y las alilaminas actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol. Los azoles inhiben el enzima *Erg11* y las alilaminas el enzima *Erg1*. De este modo se acumulan metabolitos tóxicos y se altera la estructura de la membrana, que se vuelve más permeable y vulnerable. (3) Las equinocandinas inhiben de manera no competitiva el enzima β-1,3-glucano sintetasa, lo que supone pérdida de integridad en la pared celular del hongo. (4) La 5-fluorocitosina penetra en el citosol donde sufre varias alteraciones enzimáticas para finalmente entrar en el núcleo celular e interrumpir la síntesis de ADN (Modificado de (Reales-Calderón, Molero, Gil, & Martínez, 2016)).

A diferencia de los antimicrobianos dirigidos a blancos bacterianos, los agentes antifúngicos son escasos debido a que muchas dianas terapéuticas potenciales son compartidas con las células de mamíferos. Por otro lado, los compuestos

antifúngicos se pueden clasificar de acuerdo a su modo de acción ([Figura 4](#)): (1) unión al ergosterol y ruptura de las membranas celulares fúngicas (polienos), (2) inhibición de la síntesis del ergosterol (azoles), (3) inhibición de la síntesis del 1,3- β -D-glucano (equinocandinas) y (4) alteración de la síntesis de ARN e interferencia con la replicación de ADN (5-fluorocitosina)

1.4.1. Polienos

Los polienos son sustancias antibióticas sintetizadas por los actinomicetos del género *Streptomyces* y fueron los primeros compuestos antifúngicos que se desarrollaron (Dismukes, 2000). Su mecanismo de acción se basa en la inducción de porosidad en la membrana celular mediante la unión al ergosterol de la membrana, con la consiguiente pérdida de contenido citoplasmático. Poseen una actividad fungicida de amplio espectro, siendo los compuestos más importantes la nistatina y la anfotericina B ([Figura 4](#)).

1.4.1.1. Nistatina

La nistatina ([Figura 5A](#)) es el compuesto antifúngico poliénico más empleado de forma tópica, de amplio espectro, resulta eficaz tanto contra las levaduras como contra los hongos filamentosos, incluyendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, y algunas especies de *Aspergillus*, *Histoplasma* y *Coccidioides* (Carrillo-Munoz et al., 1999). Entre los hongos menos sensibles se encuentran *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus lentulus* y *Trichosporon*. Por último, los aislamientos de *Lomentospora prolificans* y dermatofitos suelen ser resistentes a la nistatina.

Entre las formulaciones galénicas comercializadas se encuentran la suspensión oral, la pomada dermatológica y los comprimidos vaginales. Es el fármaco de primera elección para el tratamiento de las candidiasis orales y también se emplea como alternativa al tratamiento primario con azoles de la VVC, especialmente en las infecciones recurrentes o que están causadas por especies con sensibilidad reducida a azoles (Patil et al., 2015).

1.4.1.2. Anfotericina B

La anfotericina B ([Figura 5B](#)) se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento de las candidiasis orales, aunque en la actualidad es prácticamente

imposible encontrar preparaciones de uso tópico de este fármaco antifúngico. La principal vía de administración es intravenosa y debido a su alta nefrotoxicidad se han desarrollado formulaciones lipídicas como la anfotericina B liposómica y el complejo lipídico anfotericina B, las cuales reducen de manera significativa estos efectos adversos (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009).

La anfotericina B se considera el tratamiento de referencia de las micosis invasoras y el fármaco de referencia con el que se comparan todos los nuevos antifúngicos de uso sistémico. Entre las indicaciones primarias de la anfotericina B liposómica se encuentran el tratamiento de las candidiasis, las aspergilosis, las criptocosis, las fusariosis, las escedosporiasis o las mucormicosis. Además, puede ser de utilidad el uso combinado de anfotericina B con itraconazol, posaconazol o voriconazol en aquellas infecciones causadas por hongos multirresistentes, como *S. capitata* (García-Ruiz et al., 2013).

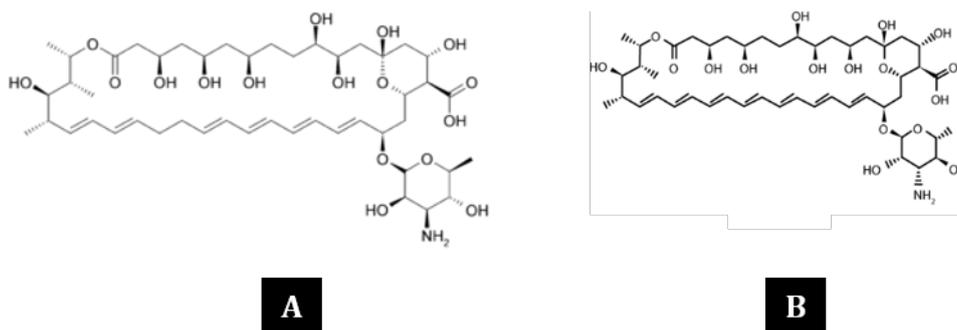


Figura 5. Estructura química de los polienos nistatina (A) y anfotericina B (B).

1.4.2. 5-Fluorocitosina

La 5-fluorocitosina ([Figura 6](#)) es una pirimidina fluorada que penetra en la célula fúngica con ayuda de una permeasa, en el citoplasma es alterada enzimáticamente por una citosina desaminasa dando como resultado el antimetabolito 5-fluorouridílico. Este antimetabolito se incorpora al ARN mediante una UMP-pirofosforilasa e interrumpe la síntesis proteica. La 5-fluorocitosina puede ser también convertida en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato y actuar como un inhibidor de la timidilato sintasa y, por consiguiente, de la síntesis de ADN y de la división nuclear. Hoy en día, su uso se encuentra limitado a la administración en combinación con Anfotericina B o itraconazol para el tratamiento de la meningitis

por *Cryptococcus* debido principalmente a la fácil aparición de resistencias (Sanglard, 2016).

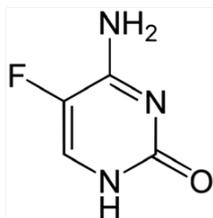


Figura 6. Estructura química de la 5-fluorocitosina.

1.4.3. Equinocandinas

Las equinocandinas ([Figura 7A](#)) son una familia de lipopéptidos semisintéticos que contienen un hexapéptido cíclico con una cadena lipídica como núcleo responsable de su actividad antifúngica. Inhiben de manera no competitiva la enzima 1,3-β-D-glucano sintasa ([Figura 7B](#)), responsable de la formación de 1,3-β-D-glucano (Denning, 2003), uno de los compuestos mayoritarios de la pared celular del hongo, lo que provoca una inestabilidad osmótica de la célula e impide su crecimiento y reproducción. Las equinocandinas suponen una opción terapéutica de primera elección debido a su seguridad, ya que poseen escasos efectos tóxicos debido a que las células eucariotas humanas no contienen el compuesto diana de las equinocandinas. En este grupo destacan la anidulafungina, la caspofungina y la micafungina (Sucher, Chahine, & Balcer, 2009)

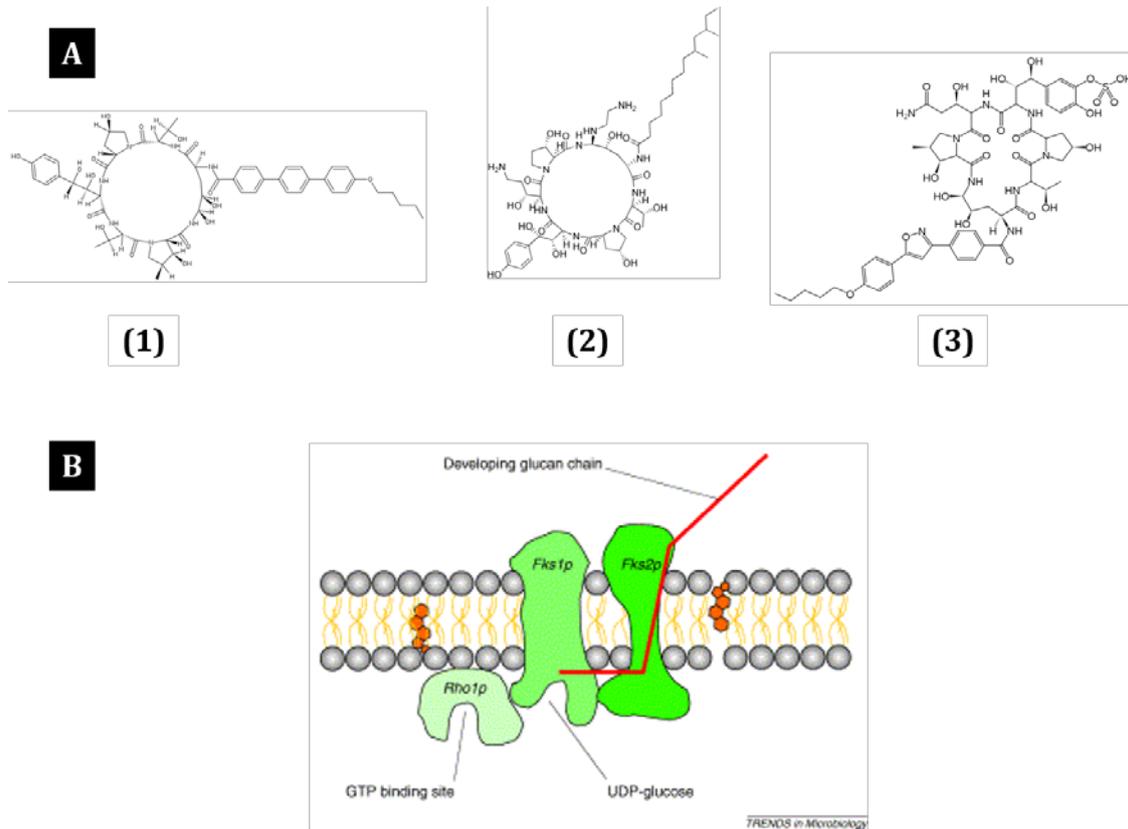


Figura 7. (A) Estructura química de la anidulafungina (1), caspofungina (2) y micafungina (3). (B) Complejo transmembrana de las proteínas Fks1p, diana de las equinocandinas, y Fks2p, encargadas de la síntesis del 1,3- β -D-Glucano. Este complejo está regulado por la proteína Rho1p, con el dominio de unión a GTP (modificado de (Odds, Brown, & Gow, 2003)).

Las equinocandinas son útiles bien como monoterapia o combinadas con otras clases de compuestos antifúngicos para el tratamiento de las micosis sistémicas. Recientemente se ha probado de manera experimental la nueva equinocandina CD101 en el tratamiento de la VVC (Boikov, Locke, James, Bartizal, & Sobel, 2017), aunque a día de hoy la única formulación disponible es la intravenosa (Chaturvedi et al., 2011).

1.4.3.1. *Anidulafungina*

La anidulafungina ([Figura 7A-1](#)) es una candina obtenida a partir del producto denominado equinocandina B del hongo *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus* (S. Katiyar & Edlind, 2015). La administración con otros antifúngicos, como anfotericina B, itraconazol, posaconazol o voriconazol, puede ser aditiva e incluso sinérgica frente a *Candida*, *Aspergillus* y otros hongos filamentosos. La anidulafungina está indicada para el tratamiento de la candidemia en pacientes con

o sin neutropenia, así como en el de la candidiasis esofágica (S. C. Chen, Slavin, & Sorrell, 2011).

1.4.3.2. *Caspofungina*

La caspofungina ([Figura 7A-2](#)), la primera equinocandina aprobada para su uso en seres humanos, es un derivado de la pneumocandina B₀ del hongo *Glarea lozoyensis* (S. Katiyar & Edlind, 2015) y se encuentra comercializada para uso hospitalario estando indicada para el tratamiento de candidiasis invasoras, candidiasis orofaríngeas y esofágicas refractarias a otros tratamientos antifúngicos e infecciones causadas por *Aspergillus* (Barchiesi, Spreghini, Tomassetti, Giannini, & Scalise, 2007).

1.4.3.3. *Micafungina*

La micafungina ([Figura 7A-3](#)) es una equinocandina obtenida a partir del hexapéptido FR901379 del hongo *Coleophoma empetri* (S. Katiyar & Edlind, 2015). Está indicada en el tratamiento de las candidiasis invasoras en todas sus presentaciones clínicas, en el de la esofagitis candidiásica y en el de aquellas candidiasis orofaríngeas recalcitrantes a otros tratamientos antifúngicos (Pappas et al., 2007).

1.4.4. *Azoles*

Uno de los tipos de antifúngicos más empleados son los azoles. Los azoles a su vez se pueden clasificar en imidazoles, que contienen anillos de cinco elementos con dos átomos de nitrógeno, tales como el clotrimazol de uso tópico o el ketoconazol de uso oral ([Figura 8](#)). Este grupo se empezó a usar de forma terapéutica a finales de la década de los 60 (Fromtling, 1988). A otra clase de azoles corresponden los triazoles que contienen anillos de cinco elementos con tres átomos de nitrógeno, tales como el fluconazol e itraconazol ([Figura 9](#)), o los pertenecientes a una segunda generación de triazoles; voriconazol y posaconazol ([Figura 10](#)). Destacan entre los azoles de última generación los compuestos triazólicos isavuconazol, albaconazol o ravuconazol (Carrillo Muñoz et al., 2015).

Los azoles interfieren con la síntesis del ergosterol, mediante la inhibición de la 14- α -desmetilasa del lanosterol, que es un enzima acoplado al citocromo P450, y que transforma el lanosterol en ergosterol por escisión de un grupo metilo del

lanosterol, produciendo a su vez un intermediario que es sustrato en un paso sucesivo de su síntesis (Chau, Mendrick, Sabatelli, Loebenberg, & McNicholas, 2004). El gen *ERG11* codifica el enzima 14- α -desmetilasa del lanosterol, y se encuentra localizado en el cromosoma 5, en el mismo brazo del cromosoma que el locus de apareamiento (*MTL*) (Morschhäuser, 2016). La inhibición ocurre a través de la unión del átomo de hierro del grupo hemo, presente en el sitio activo del enzima, con un átomo de nitrógeno de uno de los anillos del compuesto azólico. Esta inhibición de la síntesis del ergosterol produce una alteración en la fluidez de la membrana, aumentando su permeabilidad e inhibiendo el crecimiento celular y su multiplicación. Además, la acumulación de precursores tiene un efecto tóxico directo sobre las células fúngicas (Nozawa & Morita, 1986; Vande Bossche, Willemsens, & Marichal, 1987).

Las aplicaciones de los azoles van desde el tratamiento de las infecciones vaginales y de la piel en la población general hasta el de las micosis invasoras en pacientes inmunocomprometidos. En el caso de la vulvovaginitis candidiásica (VVC), los fármacos antifúngicos empleados mayormente son los imidazoles como el clotrimazol, que sigue siendo uno de los compuestos tópicos más utilizado para el tratamiento de la VVC (Wächtler, Wilson, & Hube, 2011), con una eficacia que sobrepasa el 85% (J. D. Sobel et al., 1998). En episodios recurrentes (VVCR) suele emplearse fluconazol por vía oral (Cararach-Tur et al., 2013).

1.4.4.1. *Clotrimazol*

El clotrimazol ([Figura 8A](#)) es un antimicótico de amplio espectro usado principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por *C. albicans* y otras infecciones fúngicas, el cual está ampliamente recomendado para el tratamiento de VVC (Pappas et al., 2004).

El clotrimazol se considera fungistático más que fungicida, aunque puede mostrar actividad fungicida en altas concentraciones. Como todos los azoles inhibe el citocromo P-450, y esta inhibición está considerada su característica principal, aunque se han descrito otras acciones farmacológicas que nada tienen que ver con su potencial antimicótico; es capaz de inhibir líneas celulares cancerosas in vitro, y también muestra actividad anti malaria in vitro. Además, el clotrimazol se usa en el tratamiento de tricomoniasis resistentes a metronidazol, y también muestra

actividad contra algunas bacterias Gram-positivas (Crowley & Gallagher, 2014). En la Unión Europea el clotrimazol está disponible sin receta médica y de forma tópica (Mendling, 2015).

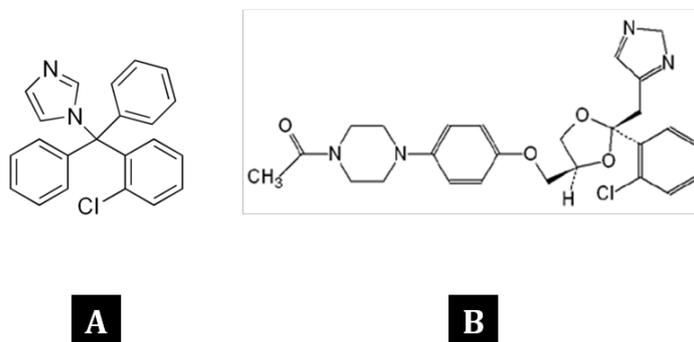


Figura 8. Estructura química de los imidazoles clotrimazol (A) y ketoconazol (B).

1.4.4.2. Ketoconazol

El ketoconazol ([Figura 8B](#)) posee una potente actividad antifúngica contra *Candida*, *Cryptococcus* y los dermatofitos. También es activo contra *Trichosporon* y los hongos causantes de micosis endémicas. Su actividad es menor contra *C. glabrata*, mientras que *C. krusei*, el género *Aspergillus*, el género *Scedosporium* y los mucorales son resistentes al ketoconazol. Aunque puede administrarse por vía oral, el uso mayoritario del ketoconazol es por vía tópica, como gel pomada o crema. Por vía tópica se emplea para el tratamiento de las candidiasis vaginales y las micosis mucocutáneas (Quindos et al., 2015).

1.4.4.3. Fluconazol

El fluconazol ([Figura 9A](#)) es un triazol fluorado que pertenece al grupo de los azoles de segunda generación con un anillo básico que posee tres átomos de nitrógeno en vez de dos. El fluconazol tiene actividad fungistática con un amplio espectro que incluye a la mayoría de cepas de *C. albicans*, pero es menos activo contra otras especies del género de *Candida*, en particular *C. glabrata* y *C. krusei*. Esta última especie es resistente a fluconazol de manera intrínseca (Samaranayake, 1997; T. C. White, Marr, & Bowden, 1998). Posee una excelente absorción gastrointestinal, con una vida media prolongada de 27-37 h. El fluconazol es metabolizado por las isoenzimas del citocromo P-450 en el hígado y se elimina principalmente por vía renal (Wingard & Leather, 2004). El fluconazol

tiene pocos efectos secundarios y es el antifúngico más usado tanto en el tratamiento de candidiasis (Darouiche, 1998), como en profilaxis antifúngica en pacientes neutropénicos. Es soluble en agua, con lo cual puede administrarse por vía intravenosa. Después de la administración oral, la absorción es casi completa y no le afecta el pH gástrico (Brammer, Farrow, & Faulkner, 1990).

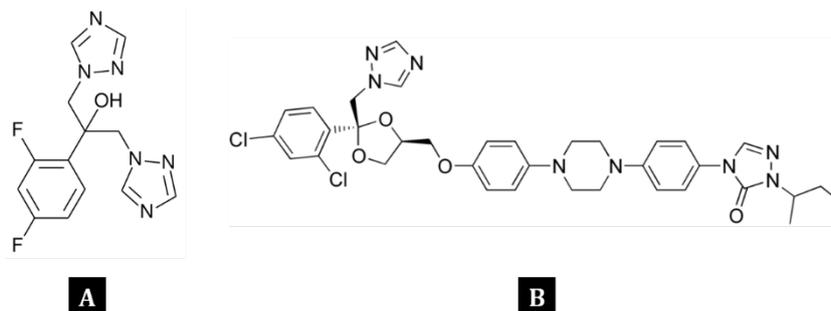


Figura 9. Estructura química de los triazoles fluconazol (A) e itraconazol (B).

1.4.4.4. Itraconazol

El itraconazol ([Figura 9B](#)) es un compuesto antifúngico lipófilo de administración oral y amplio espectro de actividad. Es una buena alternativa para el tratamiento de pacientes con *Candida* resistentes a fluconazol, aunque se ha observado resistencia cruzada (T. C. White, 1997a). De todos modos, es eficaz en el tratamiento de la VVC, siendo el fármaco de elección, junto con clotrimazol y ketoconazol, en los casos en los que aparece resistencia a fluconazol. Se emplea tanto en episodios puntuales como en tratamientos de mantenimiento en casos recurrentes de VVC en España (Cararach-Tur et al., 2013) y EEUU (J. D. Sobel, 2016).

1.4.4.5. Voriconazol

El voriconazol ([Figura 10A](#)) es un triazol de segunda generación derivado del fluconazol. Posee un amplio espectro y una mejor actividad in vitro contra especies fúngicas que muestran resistencia al fluconazol, como *C. glabrata* o *C. krusei* (Theuretzbacher, Ihle, & Derendorf, 2006), y con una potente acción fungicida frente a hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Fusarium*, aunque su acción contra la levadura es fungistática.

Introducción

El voriconazol tiene una actividad frente a la candidiasis orofaríngea similar al fluconazol (Valgus, 2003). Su empleo se limita a casos de VVC causados por *C. glabrata*, ya que posee una mejor actividad que el fluconazol (Danby, Boikov, Rautemaa-Richardson, & Sobel, 2012a), aunque esta regla no siempre se cumple, ya que se ha demostrado que la resistencia a fluconazol es un hecho altamente predictivo de resistencia a voriconazol (Lyon, Karatela, Sunay, Adiri, & Candida Surveillance Study Investigators, 2010).

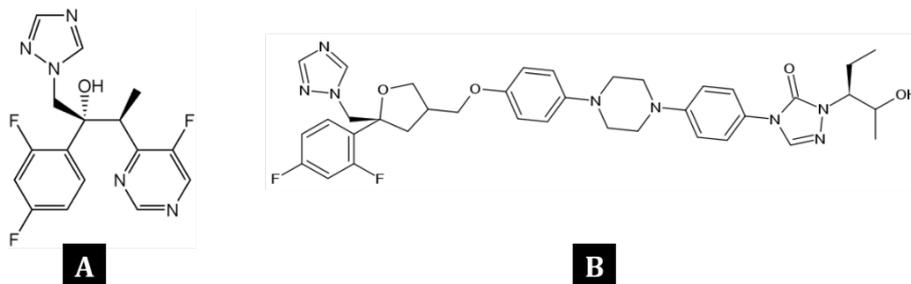


Figura 10. Estructura química de los triazoles de nueva generación voriconazol (A) y posaconazol (B).

1.4.4.6. Posaconazol

El posaconazol ([Figura 10B](#)) es un triazol lipófilo que exhibe una actividad antifúngica más potente y un espectro in vitro e in vivo más amplio que el fluconazol contra la mayoría de las especies fúngicas incluyendo *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, varios zigomicetos y otros hongos filamentosos (Valgus, 2003). Posee actividad fungistática contra *Candida* y fungicida contra *Aspergillus*. Se emplea del mismo modo que el voriconazol, en casos de VVC causados por *C. glabrata* (Danby et al., 2012a), y parece ser un antifúngico oral útil en el tratamiento de las infecciones fúngicas recalcitrantes (Pappas et al., 2016).

1.5. Resistencia a los fármacos antifúngicos

El número de fármacos antifúngicos disponibles hoy en día es limitado, además, en muchas ocasiones la utilización de los mismos queda restringida debido a su toxicidad, a la interacción con otros fármacos o a la resistencia que puede mostrar el hongo frente a ellos. En lo referente a la resistencia, éste no es un problema tan extendido como la resistencia observada frente a antibacterianos, sin embargo, el aumento de las infecciones fúngicas ha ido acompañado de un aumento en el uso de los antifúngicos, y esto ha supuesto que la aparición de especies resistentes de

Candida y de otras especies fúngicas con un menor grado de sensibilidad sea un problema cada vez mayor (Hof, 2008; M. A. Pfaller, 2012).

La resistencia a los fármacos antifúngicos se define como la combinación de la resistencia clínica y la resistencia microbiológica (Vale-Silva, 2015). Se considera que ocurre un fracaso terapéutico en la respuesta clínica cuando un paciente con una micosis recibe el tratamiento antifúngico más adecuado y no se cura ni mejora. Si la resistencia es debida a factores clínicos, el microorganismo presentará una susceptibilidad normal frente al antifúngico *in vitro*, mientras que la concentración necesaria para combatir la infección será mayor que la que se puede conseguir de forma segura mediante una dosis terapéutica normal. Este tipo de resistencia suele deberse a las complejas interacciones que se dan en el cuerpo humano entre el fármaco y el microorganismo diana (Sanglard, 2011a).

Por el contrario, si la resistencia es debida a factores propios del microorganismo, éste será capaz de crecer *in vitro* a mayores concentraciones de fármaco antifúngico que las necesarias para inhibir el crecimiento de cepas sensibles (Vale-Silva, 2015). Este término implica una comparación de los resultados obtenidos con un aislamiento clínico específico y los obtenidos con el mismo compuesto antifúngico con otros aislamientos clínicos y otras cepas de la misma especie (Quindós, Cantón et al., 2015). La resistencia microbiológica se detecta mediante métodos de susceptibilidad *in vitro* estandarizados, los cuales producen medidas cuantitativas o semi-cuantitativas de la concentración mínima de antifúngico requerida para inhibir el crecimiento microbiano, valor conocido como concentración mínima inhibitoria (CMI) (Vale-Silva, 2015).

Algunos hongos patógenos son resistentes a determinados fármacos antifúngicos de manera intrínseca, lo cual quiere decir que todos los aislamientos de dicha especie serán resistentes aun antes de haber sido expuestos a ningún antifúngico. A este tipo de resistencia se le denomina resistencia primaria. Un ejemplo de resistencia intrínseca o primaria es la que muestran *C. krusei* frente a fluconazol (Samaranayake, 1997), *S. capitata* frente a equinocandinas (García-Ruiz et al., 2013) o *L. prolificans* frente a la mayoría de fármacos antifúngicos empleados en la clínica (Pellón et al., 2016).

La resistencia microbiológica también puede ser adquirida, y en este caso se denomina resistencia secundaria. Así, los aislamientos previamente susceptibles, tras su exposición a un fármaco antifúngico, desarrollan mecanismos celulares específicos de resistencia. Estos mecanismos pueden darse tanto de manera transitoria como permanente, lo cual implica que el fenotipo resistente puede ser genéticamente estable o bien puede perderse en ausencia del fármaco antifúngico (Vale-Silva, 2015).

1.5.1. Técnicas para el estudio de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos

Para definir la resistencia o la sensibilidad a un fármaco antifúngico es necesario utilizar técnicas estandarizadas, ya que éstas permiten estudiar in vitro el espectro de acción de un fármaco y definir qué concentraciones son consideradas como puntos de corte clínico (CBP-*Clinical Break Points*), que son las que marcan la frontera entre los aislamientos sensibles y los resistentes. Estos puntos se han definido basándose en la distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja de fármaco que inhibe el crecimiento del hongo. Asimismo, existe otra manera de identificar la resistencia microbiológica: los puntos de corte epidemiológicos (EPV-*Epidemiological cutoff Values*) que son las concentraciones más altas de fármaco antifúngico que separan adecuadamente los aislamientos que forman la población salvaje de aquellos que presentan algún mecanismo de resistencia a dicho fármaco. Los ECV permiten detectar la aparición de aislamientos para los cuales la CMI del antifúngico es superior a las que se observan en la población salvaje, y junto con el CBP permite la identificación de aislamientos clínicos con mutaciones, distintos a aquellos que conforman la población salvaje (M. A. Pfaller, 2012).

Para todo ello el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) creó un subcomité para el estudio y estandarización de los métodos de determinación de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos. Para el estudio de la susceptibilidad in vitro a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida* se utiliza el método descrito en su documento M27-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). En este documento se incluyen los puntos de corte interpretativos para el fluconazol, itraconazol, voriconazol, 5-fluorocitosina y las equinocandinas, lo que permita clasificar a los aislamientos en sensibles,

resistentes, o sensibles-dependientes de la dosis. Recientemente se han propuesto modificaciones de los puntos de corte para equinocandinas, fluconazol y voriconazol para especies de *Candida* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Por otro lado, el *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (AFST/EUCAST) también desarrolló una metodología estandarizada para estudiar la sensibilidad a los antifúngicos. Está basada en el documento M27-A con modificaciones que pretenden conseguir datos más objetivos sobre los puntos de corte (Arendrup et al., 2017; Cuenca-Estrella et al., 2003).

Sin embargo, estos métodos de microdilución propuestos por el CLSI y EUCAST son bastante costosos y parecen más adecuados para laboratorios de referencia debido a la laboriosidad de esta metodología que hace más problemática su adaptación a un laboratorio clínico. Por ello, el CLSI ha estandarizado el método de difusión en disco en agar para levaduras (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009a; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009b) y hongos filamentosos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010), un método más sencillo y económico. Asimismo, existen otros métodos comerciales que permiten una lectura más fácil, así como la automatización de los mismos, entre los que destacan Sensititre YeastOne (Trek Diagnostics Systems, EE.UU.), Vitek-2 y ATB Fungus (Biomerieux, Francia) como métodos de microdilución, o Etest (Biomerieux, Francia) y Neo-Sensitabs (Rosco, Dinamarca), como métodos de difusión en agar ([Figura 11](#)).

Introducción

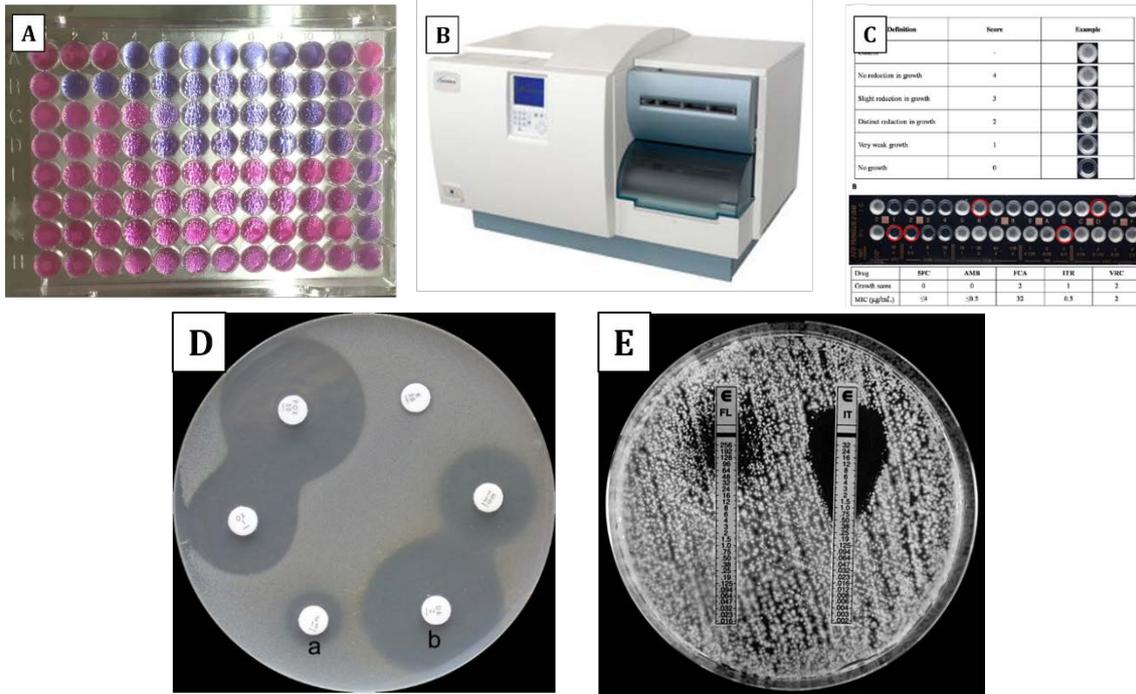


Figura 11. Métodos comerciales para el estudio de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos. A: SensititreYeastOne; B: Vitek-2; C: ATB Fungus; D: Neo-Sensitabs y E: Etest con tiras de fluconazol (FL) e itraconazol (IT).

1.5.2. Mecanismos de resistencia a distintos fármacos antifúngicos

Se han descrito resistencias para los cuatro tipos de antifúngicos. Los mecanismos de resistencia a los antifúngicos pueden clasificarse en tres grandes grupos: a) modificación en la diana de acción, bien por superproducción, alteración estructural o supresión; b) modificación de la ruta metabólica implicada en el mecanismo de acción del antifúngico, y c) disminución de la concentración intracelular de antifúngico, bien porque esté bloqueada la entrada del antifúngico al interior de la célula fúngica o porque sea expulsado activamente al exterior.

Sin embargo, en este capítulo se detallarán los mecanismos de resistencia basándonos en cada grupo de antifúngicos, de modo que podrán compartir estrategia, aunque diferirán en la diana, ruta o gen implicado ([Figura 12](#)).

1.5.2.1. Mecanismos de resistencia a la 5-fluorocitosina

La 5-fluorocitosina es introducida en la célula fúngica por una permeasa, una vez dentro sufre varias transformaciones metabólicas, desaminación y fosforilación entre otras, para poder ejercer su función tóxica. Se han descrito mecanismos de resistencia asociados a mutaciones en los genes *FCA1* y *FUR1*, que codifican las enzimas citosina desaminasa y uracilo fosforribosil transferasa, respectivamente. Estas mutaciones implican a nivel de fenotipo un descenso en la captación del fármaco y en la acumulación de antimetabolitos tóxicos (Sanglard, 2002). Se han aislado cepas de *C. albicans* y *C. neoformans* resistentes a 5-fluorocitosina.

La resistencia a la 5-fluorocitosina constituye un problema grave y limita de forma importante su uso terapéutico. Se recomienda, para neutralizar la aparición de resistencias, administrar la 5-fluorocitosina siempre en combinación con otro antifúngico.

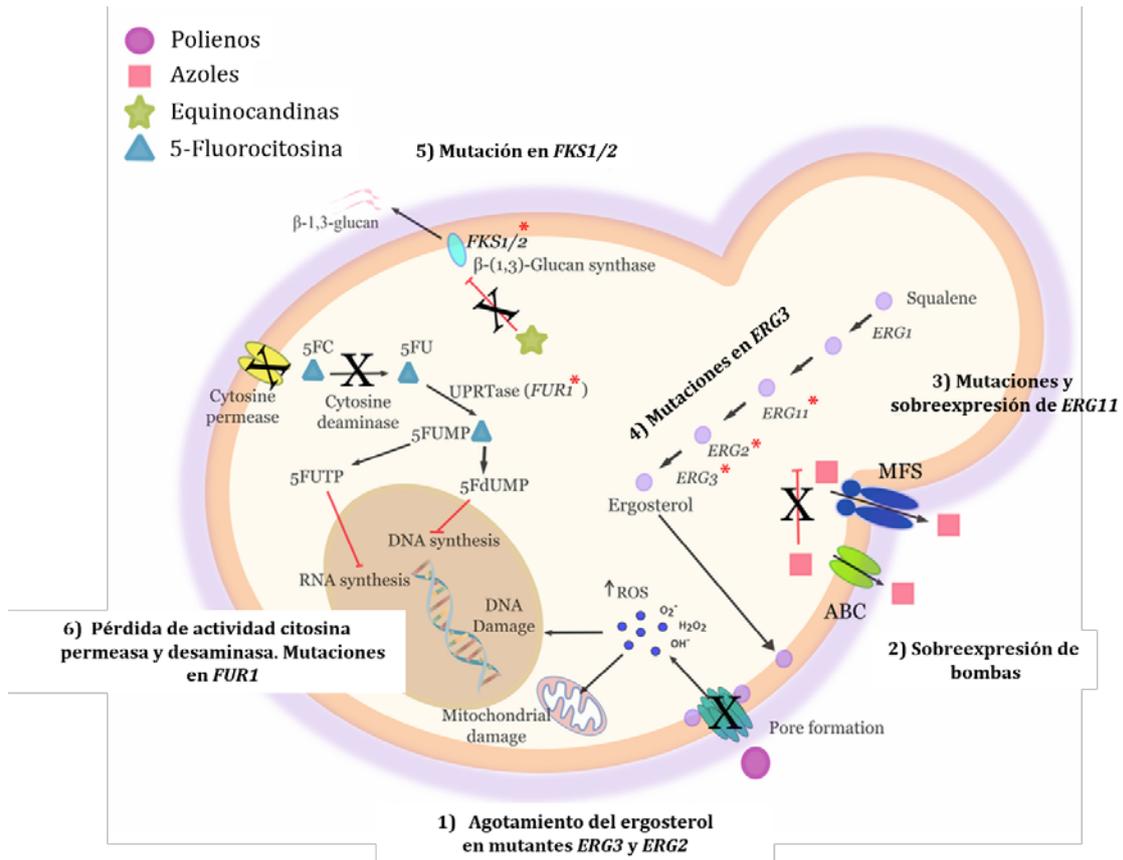


Figura 12. Mecanismos de resistencia a distintos compuestos antifúngicos. La célula fúngica logra la resistencia a polienos (1) alterando la composición lipídica (ergosterol) de la membrana, reduciendo así la afinidad de los polienos por la membrana celular. (2) La sobreexpresión de *CDR1* y *CDR2* que codifican bombas de eyección tipo ABC (*ATP Binding Cassette*-transportadores dependientes de ATP), y de *MDR1* que codifica el tipo MF, (*Major Facilitator*-facilitadores principales) supone el mecanismo más común de resistencia a azoles en hongos. (3) La sobreexpresión del gen *ERG11* que codifica el enzima 14- α -desmetilasa del lanosterol, o las mutaciones* en el dominio de unión a azoles, también confieren resistencia frente a los compuestos azólicos. (4) Las mutaciones en *ERG3* también confieren resistencia a azoles y de manera secundaria a polienos. (5) Las mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2*, que codifican las subunidades catalíticas del enzima β -1,3-glucano sintasa, suponen el mecanismo más común de resistencia frente a equinocandinas. (6) La pérdida del enzima de membrana citosina permeasa y las mutaciones en el gen *FUR1* confieren resistencia a distintas especies fúngicas (Modificado de (Reales-Calderón et al., 2016)).

1.5.2.2. Mecanismos de resistencia a polienos

La resistencia a la anfotericina B y a otros polienos es muy infrecuente, a pesar de que han sido fármacos de uso generalizado y continuado durante más de cuatro décadas. No obstante, se han descrito resistencias primarias a la anfotericina B, en algunos aislamientos de *C. lipolytica* (Belet et al., 2006) y *C. lusitaniae* (Blinkhorn, Adelstein, & Spagnuolo, 1989).

Se han aislado distintas especies fúngicas con resistencia adquirida a anfotericina B, que portaban mutaciones con pérdida de función en distintos genes de la ruta de

biosíntesis del ergosterol, por ejemplo, *ERG2*, *ERG3*, *ERG5* o *ERG6*. Todas las alteraciones moleculares responsables de la resistencia a polienos se basan en la sustitución del ergosterol de la membrana por otros esteroides con menor afinidad por los polienos (Vale-Silva, 2015).

Afortunadamente, la repercusión clínica de la resistencia a polienos no es importante, es excepcional en los pacientes sin inmunodeficiencias y es muy rara en los enfermos con neutropenia.

1.5.2.3. Mecanismos de resistencia a las equinocandinas

Hoy en día la resistencia a las equinocandinas es baja a pesar de su amplio uso, entre un 0,3% y un 1% de todos los aislamientos clínicos de *Candida* (Quindós et al., 2015), sin embargo, se han descrito fracasos terapéuticos por aislamientos de *Candida* con valores de CMI más altos de lo habitual.

El mecanismo principal de resistencia frente a equinocandinas es la modificación de la diana de acción, la subunidad Fks del enzima β -1,3-glucano sintetasa, debido a mutaciones en el gen *FKS1*, y sus parálogos *FKS2* y *FKS3*, que lo codifican (Park et al., 2005). Estas mutaciones se encuentran agrupadas en la región *Hot Spot 1* y, en menor medida, en la *Hot Spot 2* y *Hot Spot 3*, las cuales comparten una topología similar: se localizan en la cara exterior, o adyacente a ella, de la membrana plasmática, y además se encuentran cercanas al dominio catalítico del enzima (Figura 13) (S. Katiyar & Edlind, 2015).

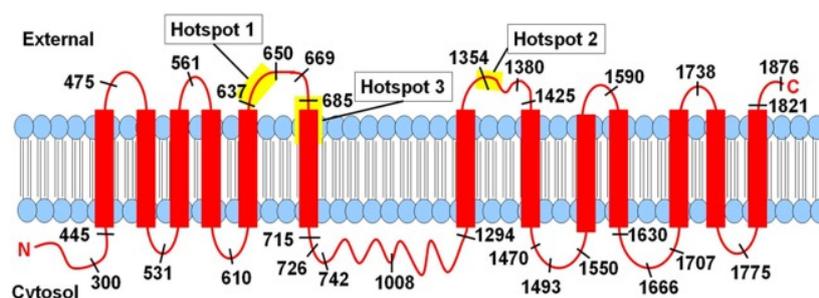


Figura 13. Topología del enzima Fks1 en la membrana en *S. cerevisiae*. En rojo, los dominios α hélice transmembrana. En amarillo, en la parte externa de la membrana, los tres *Hot Spot*. Los números hacen referencia a la posición de los aminoácidos en la secuencia de la proteína (Johnson & Edlind, 2012).

Una de las limitaciones principales del uso de las equinocandinas son las resistencias primarias que se han observado en un número importante de especies fúngicas, incluyendo *Fusarium*, *Lomentospora*, *Saprochaete*, los basidiomicetos,

entre ellos *Cryptococcus*, o los zigomicetos, entre ellos *Rhizopus oryzae* (Denning & Bromley, 2015; Johnson, Katiyar, & Edlind, 2011; Maligie & Selitrennikoff, 2005). Por otro lado, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* poseen una susceptibilidad intermedia a las cándidas, debido a una sustitución de varios aminoácidos en la región *Hot Spot1* (Dudiuk et al., 2017; Garcia-Effron, Katiyar, Park, Edlind, & Perlin, 2008), aunque el aumento del valor de la CMI no va unido necesariamente a fracaso terapéutico. Más preocupante resulta el caso de *C. glabrata*, especie que ha desarrollado resistencia secundaria a equinocandinas en muy poco tiempo, pasando de un 4,9% de aislamientos resistentes a un 12,3% en diez años (Alexander et al., 2013).

1.5.2.4. *Mecanismos de resistencia a los azoles*

La resistencia a los azoles es el mecanismo más común y el de mayor importancia clínica, ya que son los fármacos más ampliamente utilizados (Rogers & Barker, 2012). Hay descritos principalmente 4 mecanismos: alteraciones en la biosíntesis del ergosterol; mutaciones en el gen *ERG11*, el gen que codifica el enzima diana de los azoles; sobreexpresión del gen *ERG11* y sobreexpresión de genes que codifican bombas de expulsión, entre ellos *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* (Sanglard, 2011a).

1.5.2.4.1. Alteraciones en la síntesis del ergosterol

El primer mecanismo de resistencia a azoles consiste principalmente en mutaciones en el gen *ERG3* (Figura 14), que codifica el enzima $\Delta 5,6$ esterol desaturasa, cuya inactivación previene la transformación de esteroides 14α metilados en metabolitos tóxicos (S. Kelly et al., 1997). Otra consecuencia de este mecanismo es la resistencia cruzada a anfotericina B, cuya diana, el ergosterol, desaparece por el malfuncionamiento del enzima.

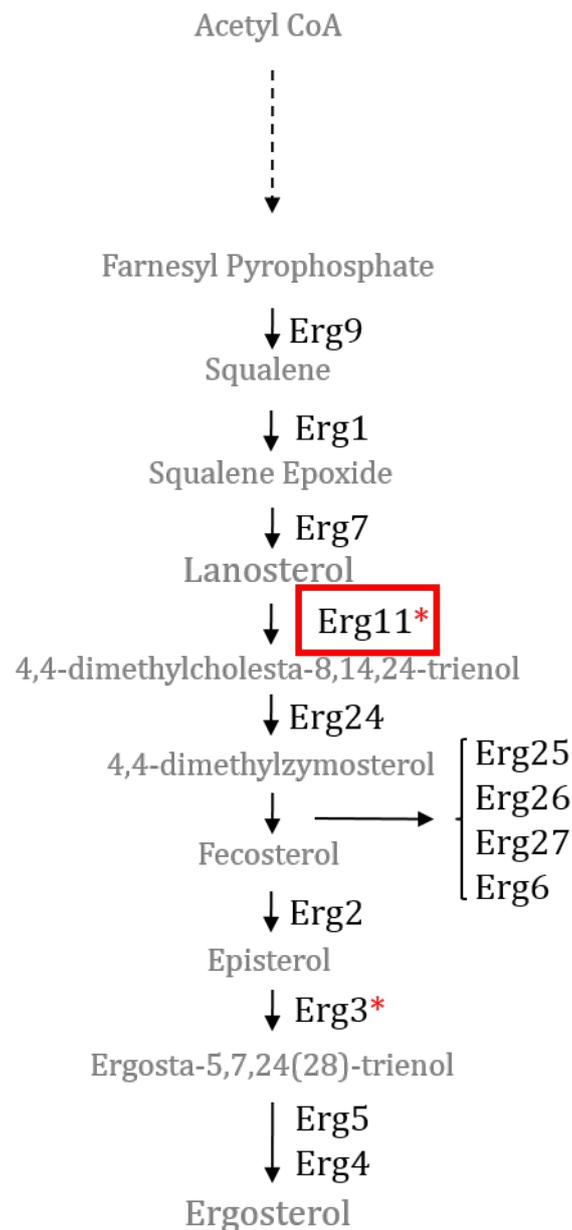


Figura 14. Esquema de la ruta de biosíntesis del ergosterol. La diana de los azoles (Erg11) aparece resaltada en rojo. Enzimas cuyas mutaciones están involucradas en la resistencia a los azoles* (Erg11, Erg3). Las mutaciones en Erg3 son responsables a su vez de la resistencia a polienos (modificado de (Onyewu, Blankenship, Del Poeta, & Heitman, 2003)).

1.5.2.4.2. Mutaciones en *ERG11*

Las mutaciones en *ERG11* (Figura 14) suponen un importante mecanismo de resistencia (Favre, Didmon, & Ryder, 1999), ampliamente documentado en la literatura, en la cual se recogen un gran número de polimorfismos nucleotídicos no sinónimos en alelos de *ERG11* originarios de aislamientos de *C. albicans* resistentes a azoles. Estos polimorfismos implican fenotípicamente un cambio en la

conformación del enzima, lo cual afecta a la unión entre los azoles y la 14- α -desmetilasa del lanosterol. No obstante, estos polimorfismos no parecen influir en la actividad enzimática de Erg11p (Rogers & Barker, 2012){{200 Rogers, P.D. 2012}}.

Se han definido tres regiones *Hot Spot* que son particularmente permisivas a las sustituciones: del aminoácido 105 al 165, del 266 al 287 y del 405 al 488 (Marichal et al., 1999), aunque también se han reportado mutaciones fuera de estas regiones (Morio, Loge, Besse, Hennequin, & Le Pape, 2010). Se han descrito más de 140 sustituciones (Arendrup & Patterson, 2017), sin embargo, sólo algunas han sido comprobadas empíricamente y asociadas directamente a la resistencia ([Tabla 1](#)) (Favre et al., 1999; Franz et al., 1998; Kakeya et al., 2000; S. L. Kelly, Lamb, Loeffler, Einsele, & Kelly, 1999; S. L. Kelly, Lamb, & Kelly, 1999; Lamb et al., 1997; Loeffler et al., 1997; Marichal et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard, Ischer, Koymans, & Bille, 1998; T. C. White, 1997c). Lo que sí parece claro es que *ERG11* posee un gran polimorfismo genético y una gran plasticidad estructural. La determinación de la influencia sobre la resistencia de cada mutación es difícil, ya que normalmente estas mutaciones aparecen en combinación de dos a cuatro de ellas en el mismo alelo. Además, los aislamientos de *C. albicans* resistentes suelen presentar más de un mecanismo de resistencia, lo cual supone un mayor grado de resistencia (Rogers & Barker, 2012), y hace que sea más complicado conocer el papel exacto de cada uno de los mecanismos.

Recientemente se ha publicado la estructura cristalográfica de la proteína Erg11 completa de *S. cerevisiae*, lo cual ha supuesto un gran avance en la comprensión del proceso de unión entre la enzima y el azol (Monk et al., 2014). Los datos de esta publicación han permitido elucidar cómo distintas mutaciones localizadas en distintas posiciones confieren distinto grado de resistencia.

Tabla 1. Mutaciones en *ERG11* identificadas en aislamientos clínicos de *C. albicans* e implicadas en la resistencia a fluconazol.

MUTACIÓN ¹	Evidencia de la contribución a la resistencia				Referencia
	A	B	C	D	
A114S			+		(M. Xiang et al., 2013)
F126L			+		(Perea et al., 2001)
G129A	+		+		(Sanglard et al., 1998)
Y132F			+		(Perea et al., 2001; M. Xiang et al., 2013)
Y132H	+		+	+	(Takeya et al., 2000; S. L. Kelly et al., 1999; Sanglard et al., 1998)
K143R			+		(M. Xiang et al., 2013)
K143Q			+		(M. Xiang et al., 2013)
T229A	+		+		(Perea et al., 2001)
Y257H			+		(M. Xiang et al., 2013)
G307S	+		+		(Perea et al., 2001)
I315A			+		(Lamb et al., 1997)
S405F	+		+		(Sanglard et al., 1998)
G448S			+		(M. Xiang et al., 2013)
F449S			+		(Perea et al., 2001)
G464S	+	+	+	+	(Franz et al., 1998; S. L. Kelly et al., 1999; Perea et al., 2001; Sanglard et al., 1998)
R467K	+	+	+	+	(Lamb, Kelly, White, & Kelly, 2000; Sanglard et al., 1998; T. C. White, 1997c)
I471T			+		(Takeya et al., 2000)

¹nomenclatura: aminoácido original-posición-aminoácido resultante de la mutación. **A:** mutaciones detectadas en una cepa resistente a fluconazol, pero no en otra cepa emparejada sensible y aislada del mismo paciente. **B:** ensayos de actividad enzimática realizados con extractos celulares, se necesitaba mayor concentración de fluconazol para inhibir el enzima portador de mutaciones que para inhibir el enzima sin mutaciones. **C:** la expresión heteróloga en *S. cerevisiae* de los alelos portadores de mutaciones demostró aumento de la resistencia comparándolo con los alelos sin mutaciones. **D:** análisis bioquímicos mostraron una menor afinidad del enzima mutado por el fluconazol que el enzima *wild-type*.

1.5.2.4.3. Sobreexpresión de *ERG11*

La sobreexpresión del gen *ERG11* puede deberse a dos causas: a la amplificación del gen *ERG11*, es decir, que haya más de una copia del gen en el genoma del microorganismo, o por una mayor expresión del gen. La primera puede ocurrir por una duplicación del cromosoma 5, o por la formación de un isocromosoma del brazo largo del mismo (Selmecki, Forche, & Berman, 2006). En el brazo largo del cromosoma

Introducción

5 se localiza el gen *ERG11*, así como el gen *TAC1*, otro gen implicado en la resistencia de *Candida* a azoles (A. T. Coste, Karababa, Ischer, Bille, & Sanglard, 2004), cuyo mecanismo se detalla más adelante. Se ha relacionado directamente la formación del isocromosoma del brazo largo del cromosoma 5 con la amplificación de los genes *ERG11* y *TAC1* y la consiguiente resistencia a los azoles (Selmecki, Gerami-Nejad, Paulson, Forche, & Berman, 2008).

La expresión del gen *ERG11* está regulada por *Upc2* (*Uptake control 2*) (Flowers et al., 2012), un factor de transcripción que se une a elementos reguladores del promotor de *ERG11* llamados SRE (*sterol regulatory element*) (Sanglard, 2011b). En *C. albicans* este factor de transcripción está codificado por el gen *UPC2* que pertenece a la familia de proteínas con motivos “grupos de zinc” (*zinc cluster proteins*) (Vik & Rine, 2001), una familia de proteínas exclusiva del reino *Fungi*, predominantemente de ascomicetos, y que posee el motivo altamente conservado $Zn(II)_2-Cis_6$. Estos factores de transcripción pertenecen a su vez a la gran familia de proteínas eucariotas con capacidad de unión a zinc, denominadas proteínas con “dedos de zinc”, y que se encargan en especial de funciones reguladoras ([Figura 15](#)) (MacPherson, Laroche, & Turcotte, 2006).

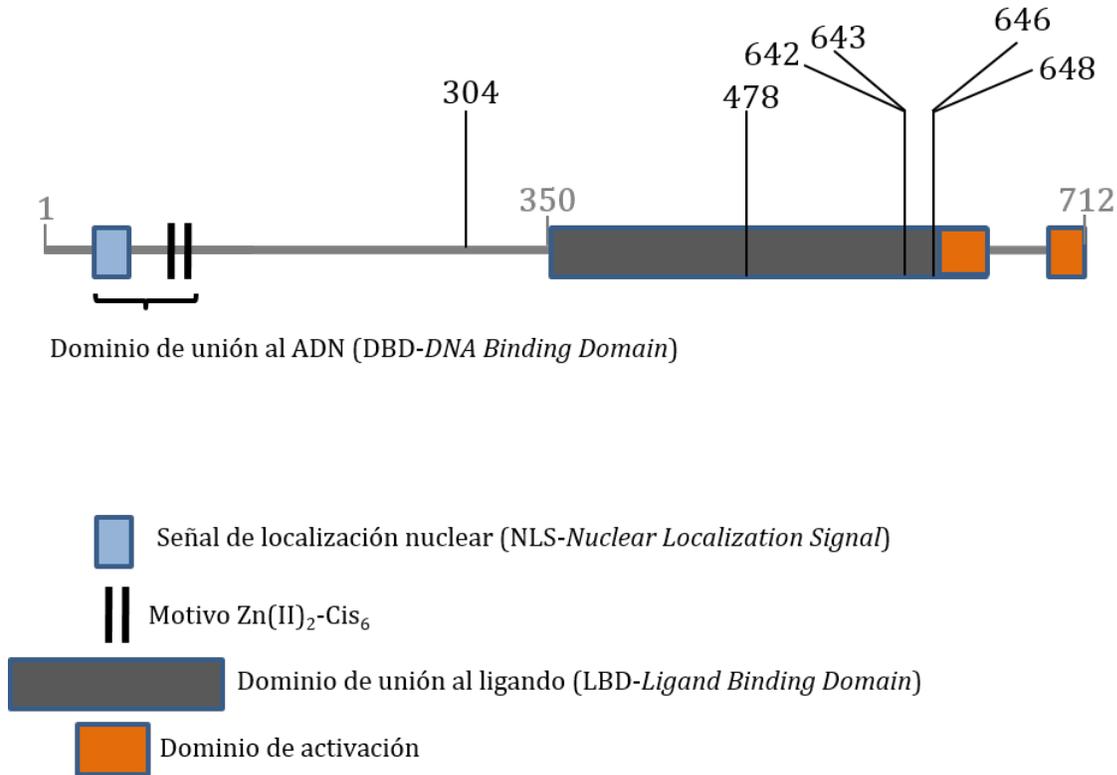


Figura 15. Representación esquemática del factor de transcripción Upc2 perteneciente a la familia de proteínas con motivos de zinc Zn(II)₂-Cis₆, y regulador de la expresión del gen *ERG11*, entre otros. Las líneas continuas representan la localización de las mutaciones GOF-*gain of function* descritas en Upc2, los números hacen referencia a la posición de los aminoácidos alterados en la secuencia proteica (Modificado de (Yang et al., 2015)).

Upc2 está implicado en la regulación de los niveles de ergosterol, ya que controla la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de ergosterol, como *ERG11* y parece ser que la de otros genes *ERG* (Vik & Rine, 2001), de genes implicados en la absorción de esteroides y, además, activa la transcripción en condiciones de ausencia de ergosterol, tal como ocurre en presencia de azoles (Silver, Oliver, & White, 2004).

Este factor de transcripción confiere resistencia a azoles aumentando la expresión de *ERG11*. En condiciones normales, cuando hay una cantidad suficiente de ergosterol, éste se une a Upc2 (al extremo carboxilo terminal) y se reprime su transcripción. Cuando hay un agotamiento de ergosterol, Upc2 abandona su posición en el citosol y migra al núcleo, donde se une al promotor de *ERG11*, activando la transcripción de la

ruta de biosíntesis del ergosterol y obteniendo así la resistencia (Figura 16) (Yang et al., 2015).

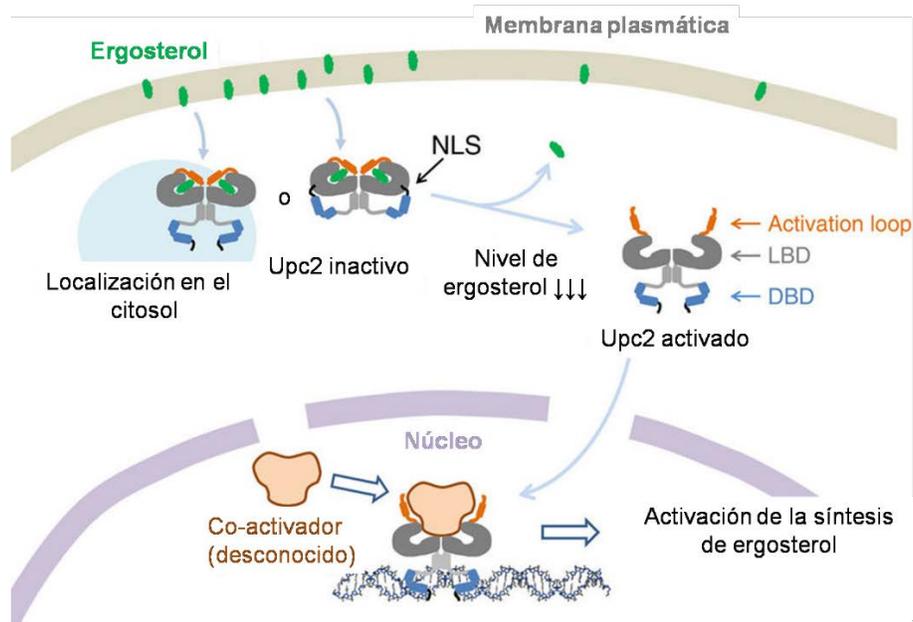


Figura 16. Esquema de la regulación de la transcripción mediante Upc2. En condiciones de abundancia de ergosterol, Upc2 se une al ergosterol y mantiene su localización en el citosol, probablemente debido a que la señal NLS-*Nuclear Localization Signal* se encuentra escondida, o a la unión a otra proteína citosólica que mantiene la posición del factor de transcripción. Cuando hay un agotamiento de ergosterol, el dominio de unión al ligando (LBD-*Ligand Binding Domain*), que está vacío, cambia de conformación y migra al núcleo, donde se activa la transcripción de genes involucrados en la ruta síntesis de ergosterol y de la absorción de esteroides (Modificado de (Yang et al., 2015)).

Por otro lado, se han descrito mutaciones en *UPC2* a partir de aislamientos clínicos de *C. albicans* resistentes. Concretamente, las mutaciones presentes en el dominio del extremo carboxilo, sitio de unión al ligando-LBD, resultan en una activación constitutiva del factor de transcripción, lo cual conlleva una sobrerregulación de la ruta de síntesis del ergosterol y de la absorción de esteroides, lo que a su vez resulta en una menor susceptibilidad a los azoles. Éstas son mutaciones de un único nucleótido que dan lugar a un cambio de aminoácido y que se definen como mutaciones con efecto de ganancia de función, o por sus siglas en inglés *GOF-gain of function*. Los alelos portadores de estas funciones se denominan alelos hiperactivos, y hasta la fecha

se han descrito siete mutaciones GOF en Upc2: W478C (nomenclatura: aminoácido original-posición-aminoácido resultante de la mutación), Y642F, A646V y G648S (Flowers et al., 2012); A643T (Heilmann, Schneider, Barker, Rogers, & Morschhauser, 2010); A643V (Hoot, Smith, Brown, & White, 2011) y G648D (Dunkel et al., 2008a).

Esta activación constitutiva de alelos hiperactivos causada por las mutaciones GOF, impone una carga metabólica por lo que, en condiciones no selectivas, es decir, en ausencia de antifúngico representa una desventaja. Más adelante se detallan los mecanismos evolutivos de las células fúngicas para hacer frente a la pérdida de aptitud biológica o *fitness*.

1.5.2.4.4. Sobreexpresión de genes codificantes de bombas de eyección

El mecanismo más habitual de resistencia a los azoles es la activación de un sistema de bombeo mediante el cual se expulsa el antifúngico al exterior de la célula fúngica. Es el mecanismo de resistencia más habitual en *C. albicans*, llegándose a detectar en un 80% de las cepas resistentes a fluconazol, aunque la mayoría de aislamientos clínicos resistentes presentan generalmente una combinación de dos o más mecanismos (Vale-Silva, 2015). La sobreexpresión de bombas de eyección es uno de los mecanismos más preocupantes ya que dichas bombas pueden transportar activamente al exterior de la célula diferentes tipos de fármacos no relacionados estructuralmente y con distintos modos de acción, fenómeno conocido como resistencia múltiple (MDR, *multidrug resistance*)(Morschhäuser, 2010).

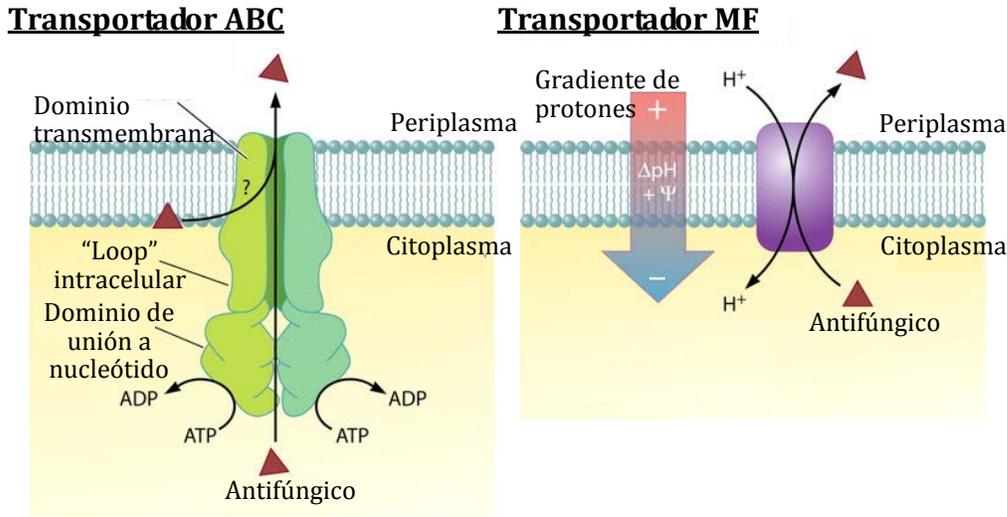


Figura 17. Disposición de los dominios de las bombas de eyección, transportadores dependientes de ATP (izquierda) y facilitadores principales (derecha) (modificado de (Cannon et al., 2009)).

En los hongos existen dos tipos de bombas de eyección que se encuentran localizadas en la membrana plasmática ([Figura 17](#)), los transportadores dependientes de ATP (ABC-ATP Binding Cassette), que utilizan este compuesto como fuente de energía para llevar a cabo el transporte, y los transportadores MF. Los primeros están codificados por los genes *CDR1* (*Candida Drug Resistance 1*) (Prasad, De Wergifosse, Goffeau, & Balzi, 1995; Yang et al., 2015) y *CDR2* (Sanglard, Ischer, Monod, & Bille, 1997). El segundo tipo de bombas de expulsión, que corresponde a la súperfamilia de facilitadores principales (MF-Major Facilitators), utiliza como fuente energética el gradiente de protones a través de la membrana plasmática. Los facilitadores principales están codificados por el gen *MDR1* (*Multidrug Resistance 1*, anteriormente conocido como *BEN-Benomyl Resistance*) (Fling et al., 1991). Ambos tipos transportan al exterior celular antifúngicos y otras sustancias tóxicas (xenobióticos) así como metabolitos endógenos (Morschhäuser, 2010). Los transportadores Cdr1 y Cdr2 tienen como sustrato varios azoles, mientras que los transportadores Mdr1 son específicos de fluconazol (Vale-Silva, 2015).

La resistencia a azoles basada en las bombas de eyección es debida al aumento en la expulsión de antifúngicos ([Figura 18](#)), evitando así la acumulación de los mismos

dentro de la célula fúngica. Esto se debe a la sobreexpresión de los genes *CDR1*, *CDR2* y *MDR1*, y varios son los trabajos en los cuales se han aislado cepas resistentes a azoles que sobreexpresaban dichos genes (Karababa, Coste, Rognon, Bille, & Sanglard, 2004; Kusch et al., 2004; Prasad & Kapoor, 2004; T. C. White, Holleman, Dy, Mirels, & Stevens, 2002a).



Figura 18. Esquema del mecanismo de resistencia basado en la sobreexpresión de bombas de expulsión. Las bombas de expulsión del tipo ABC aparecen en verde y los facilitadores principales MF en morado. En la célula sensible el azol penetra en la célula e inhibe la síntesis del ergosterol. En la célula resistente, aumenta el número de bombas de expulsión debido a la sobreexpresión de los genes *CDR1*, *CDR2* y *MDR1*, de este modo se consigue aumentar la expulsión del antifúngico, evitando que se una a su diana y obteniendo así la resistencia a distintos azoles (modificado de (T. C. White et al., 1998)).

La sobreexpresión de las bombas de expulsión puede ser transitoria, es decir, en presencia de azoles la expresión aumenta y cuando desaparece la presión del azol, vuelve a niveles normales. Sin embargo, en ciertas ocasiones esta sobreexpresión ocurre de manera constitutiva y se mantiene en ausencia de antifúngico. Esto es debido, al igual que en el caso de Upc2, a las mutaciones GOF en los factores de transcripción con motivos $Zn(II)_2$ -Cis₆, Tac1 (*Transcriptional Activator of CDR 1*) y Mrr1 (*Multidrug Resistance Regulator 1*), los cuales regulan la expresión de *CDR1/CDR2* y *MDR1*, respectivamente (A. Coste et al., 2006; A. Coste et al., 2007; A. T. Coste et al., 2004; A. T. Coste, Crittin, Bauser, Rohde, & Sanglard, 2009; Dunkel, Bläß, Rogers, & Morschhäuser, 2008b; Morschhäuser et al., 2007; Schubert, Rogers, & Morschhäuser, 2008; Znaidi et al., 2007).

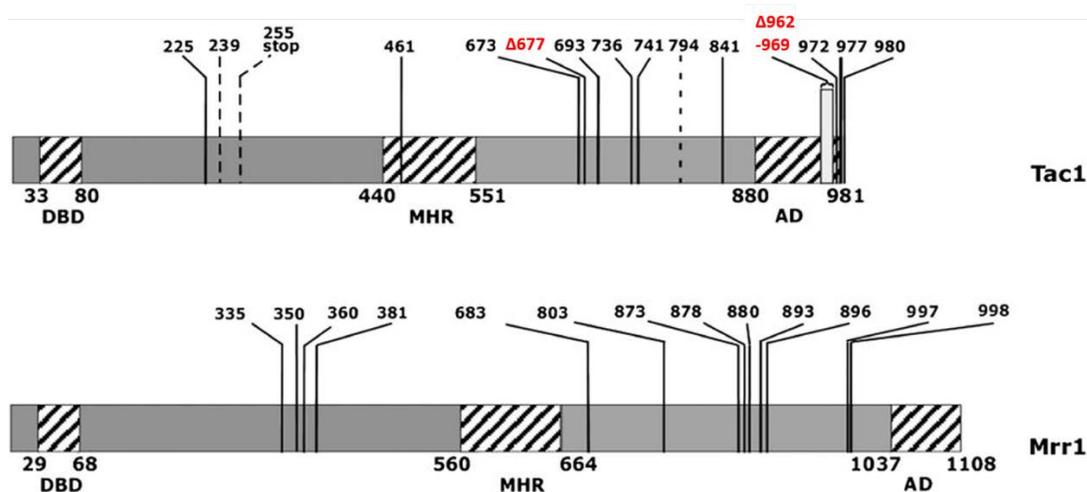


Figura 19. Esquema de los factores de transcripción con motivos $Zn(II)_2$ -Cis₆, Tac1 y Mrr1 en *C. albicans*, donde se señalan las posiciones de aminoácidos donde se han registrado mutaciones GOF. Las líneas continuas representan mutaciones detectadas en aislamientos clínicos resistentes, en rojo aparecen las deleciones, las líneas discontinuas representan mutaciones que se obtuvieron en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida. DBD: DNA Binding Domain; MHR: Middle Homology Region; AD: Activation Domain; Δ: deleción (Sanglard, 2011b).

Los alelos portadores de estas mutaciones GOF se denominan alelos hiperactivos. En el caso del gen *TAC1* de *C. albicans*, localizado en el cromosoma 5 a 14 kb del locus de apareamiento (MTL) (A. T. Coste et al., 2004), se han identificado 39 alelos hiperactivos (Sanglard, 2011b), que poseen 16 mutaciones GOF en 12 posiciones distintas dentro del gen, incluyendo dos deleciones en las posiciones 677 y de la 962 a la 969 (Figura 19). La mayoría de ellas se localizan en el extremo carboxilo terminal, el probable dominio de activación de Tac1, pero aún se desconoce cómo afectan a la actividad transcripcional de Tac1. En cuanto a Mrr1, se han identificado 14 mutaciones GOF en 13 posiciones del gen *MRR1* de *C. albicans*, que abarcan toda la región codificante (Figura 19).

Por otra parte, hay descritos otros factores de transcripción reguladores de los genes implicados en la resistencia a azoles; *NDT80* (C. G. Chen, Yang, Shih, Su, & Lo, 2004), *REP1* (C. Chen et al., 2009) o *MCM1* (Riggle & Kumamoto, 2006), los cuales regulan *CDR1*, y *CAP1* (Znaidi et al., 2009), o *FCR1* (Shen et al., 2007) que regula *MDR1*. Cabría pensar que si todos ellos fueran portadores de mutaciones GOF se lograría un mayor grado de resistencia frente a azoles. Sin embargo, en aislamientos clínicos de

C. albicans únicamente se han observado los siguientes factores de transcripción hiperactivos: Upc2, Tac1 y Mrr1 (Sanglard, 2011b) ([Tabla 2](#)).

Tabla 2. Factores de transcripción de *C. albicans* portadores de mutaciones GOF implicadas en resistencia a azoles y genes que regulan.

Factor de transcripción	Gen	Función del gen	Referencia
Upc2	<i>ERG11</i>	14- α -desmetilasa del lanosterol (biosíntesis del ergosterol)	(Flowers et al., 2012)
Tac1	<i>CDR1</i>	Bomba de eyección ABC	(A. Coste et al., 2006; A. Coste et al., 2007; A. T. Coste et al., 2004; A. T. Coste et al., 2009; Znaidi et al., 2007)
Tac1	<i>CDR2</i>	Bomba de eyección ABC	
Mrr1	<i>MDR1</i>	Bomba de eyección MF	(Dunkel et al., 2008b; Morschhäuser et al., 2007; Schubert et al., 2008)

ABC: *ATP Binding Cassette*-casete de unión a ATP; MF: *Major Facilitator*-facilitadores principales

1.5.2.5. Alteraciones genómicas asociadas al desarrollo de la resistencia

Dado que *C. albicans* es un organismo diploide, se ha especulado con la presencia de estas mutaciones en homocigosis o heterocigosis, varios autores defienden la hipótesis de que las mutaciones GOF han de estar en ambos alelos para obtener un fenotipo resistente (A. Coste et al., 2007; A. T. Coste et al., 2004; Dunkel et al., 2008b). Esto se debe a que se ha observado en aislamientos clínicos resistentes una elevada tasa de homocigosis para estos loci, como resultado de acontecimientos de pérdida de heterocigosis (LOH, en inglés *Loss of Heterozygosity*). No obstante, estos alelos hiperactivos parecen poseer un efecto acumulativo, ya que se ha observado que cepas portadoras de mutaciones en homocigosis muestran mayor resistencia que las mismas cepas, pero con mutaciones en heterocigosis (Sasse et al., 2012).

Los análisis genómicos realizados con aislamientos clínicos resistentes han revelado que esta pérdida de heterocigosis puede ocurrir a pequeña escala o bien implicar a todo el cromosoma (A. Coste et al., 2006; A. Coste et al., 2007; Dunkel et al., 2008b) ([Figura 20](#)). Puede suceder a nivel local, implicando únicamente al gen que confiere

Introducción

resistencia (Fig. 20A), por recombinación mitótica (Fig. 20B) o bien puede haber una pérdida y posterior duplicación del cromosoma (Fig. 20C) (Morschhäuser, 2016).

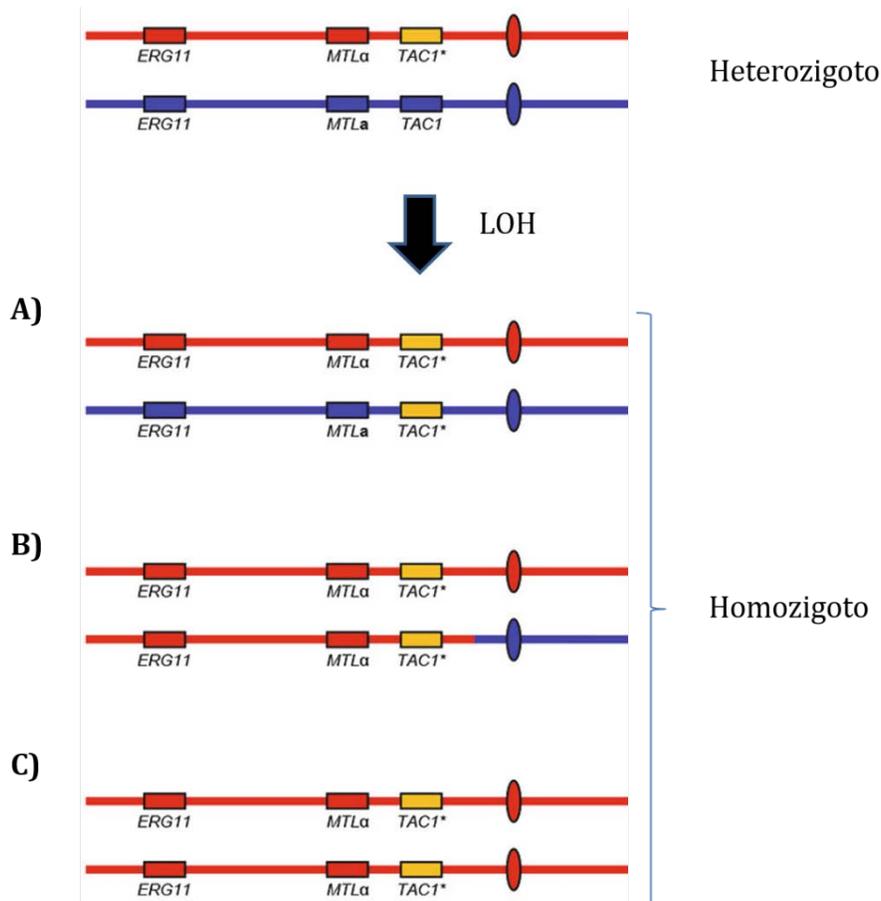


Figura 20. Alteraciones genómicas en el cromosoma 5 de *C. albicans* que dan lugar a una pérdida de heterocigotía (LOH). En este ejemplo la cepa parental (arriba, organismo heterocigoto) ha adquirido una mutación en *TAC1* (*TAC1**, en amarillo) en uno de los cromosomas (diferenciados por los colores rojo y azul). La pérdida de heterocigotía puede ocurrir (A) por una conversión genética, que implica sólo al gen *TAC1*, (B) por recombinación mitótica, en este caso entre el gen *TAC1* y el centrómero (óvalo) o (C) por una duplicación del cromosoma 5 completo. En los dos últimos casos la cepa se vuelve homocigota para el brazo izquierdo del cromosoma 5 (B), que incluye además de *TAC1* los genes *ERG11* y *MTL* o para el cromosoma completo (C) (Modificado de (Morschhäuser, 2016)).

Asimismo, la pérdida de heterocigotía para los genes implicados en la resistencia afecta en muchas ocasiones a genes que se localizan cerca de éstos, de este modo cepas que se han convertido en homocigotas para alelos hiperactivos de *TAC1* suelen ser homocigotas para el gen *ERG11*, localizado en el mismo brazo del cromosoma, o para el locus de apareamiento (*MTL*), el cual se localiza a 14 Kb (A. Coste et al., 2006;

A. Coste et al., 2007). Esta es la razón por la que habitualmente la homocigosidad en *MTL* ha aparecido ligada a eventos de resistencia a azoles (Rustad, Stevens, Pfaller, & White, 2002).

Otro mecanismo de resistencia a azoles implica la amplificación de la región cromosómica donde se localiza el alelo hiperactivo, o bien del cromosoma completo, dando lugar a aneuploidías parciales (isocromosomas) o totales (trisomías), respectivamente (Selmecki et al., 2006) (Figura 21). De hecho, el fluconazol puede causar por sí mismo defectos en la segregación de cromosomas, favoreciendo de este modo la posibilidad de desarrollar resistencia (Harrison et al., 2014).

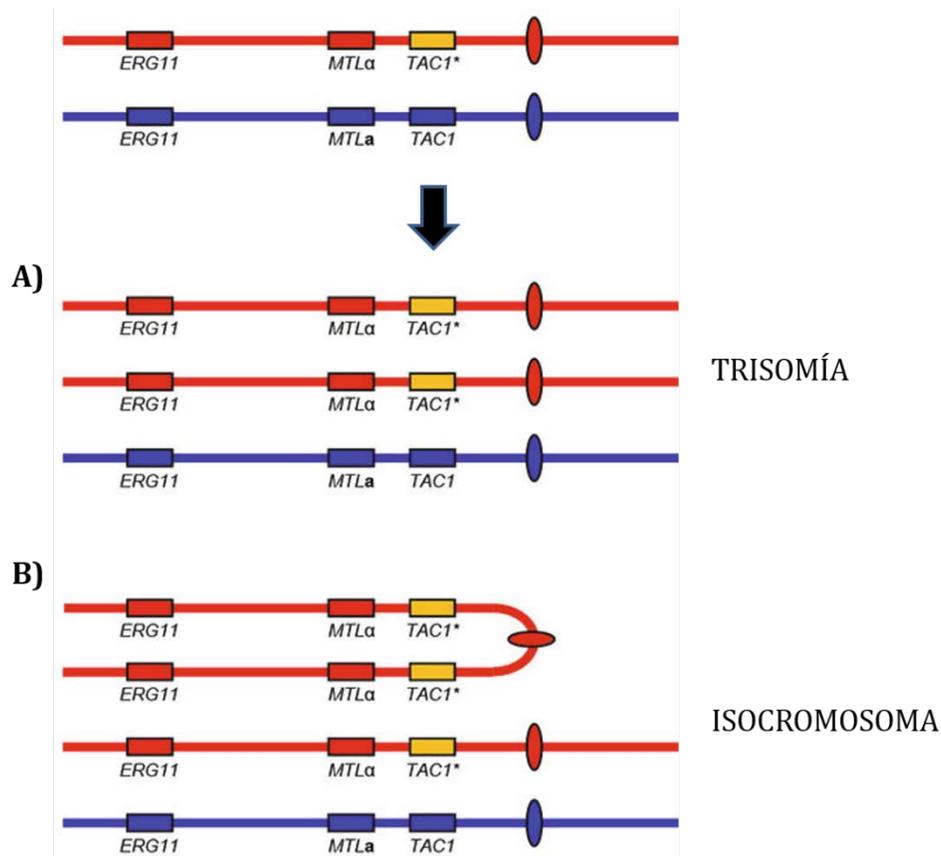


Figura 21. Duplicación total y parcial del cromosoma 5 de *C. albicans*. En este caso la cepa parental (arriba) tras adquirir el alelo hiperactivo de *TAC1** (en amarillo), aumenta su número de copias, junto con las del gen *ERG11* mediante A) la duplicación del cromosoma portador del alelo hiperactivo, lo que da lugar a una trisomía del cromosoma 5, o bien mediante (B) la formación de un isocromosoma del brazo izquierdo del cromosoma 5 (Modificado de (Morschhäuser, 2016)).

Al igual que ocurre con la pérdida de heterocigosidad, estas duplicaciones cromosómicas aumentan no sólo el número de copias del alelo hiperactivo, si no de genes que se localizan cercanos a éste. Tal es el caso del brazo izquierdo del cromosoma 5, al duplicarse el alelo hiperactivo de *TAC1*, también aumenta el número de copias del gen *ERG11*. El aumento de copias de ambos genes, *ERG11* y *TAC1*, conlleva un aumento de la expresión de ambos y por lo tanto un incremento de la resistencia (A. Coste et al., 2007; Selmecki et al., 2008).

Finalmente, tal y como se detalla en este capítulo observamos cómo bajo la presión selectiva que ejerce el fármaco las células fúngicas son capaces de salir hacia delante y superar la presencia de un agente que inhibe su crecimiento de distintas maneras. De hecho, se han observado subpoblaciones portadoras de distintos mecanismos de resistencia en episodios de candidiasis orofaríngea en enfermos de SIDA (Martínez et al., 2002). Estos mecanismos se obtienen de manera gradual, y cada uno de los individuos o células que conforman la población, puede desarrollar uno u otro, o varios en el caso de cepas altamente resistentes. Sin embargo, la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 5 podría implicar un escenario alternativo. Esta pérdida de heterocigosidad conlleva importantes consecuencias fenotípicas, ya que, junto con los genes implicados en la resistencia, *ERG11* y el alelo hiperactivo de *TAC1*, se consigue la homocigosidad del locus de apareamiento *MTL*. Esto implica que la célula fúngica pasa del fenotipo blanco (heterocigoto *MTLa/MTL α*) al opaco (homocigoto *MTLa/MTLa* o *MTL α /MTL α*), es decir se convierte en competente para el apareamiento (Ramírez-Zavala, Reuß, Park, Ohlsen, & Morschhäuser, 2008){540 Ramírez-Zavala, Bernardo 2008}. Por tanto, las células que han adquirido mecanismos genéticos de resistencia han obtenido a su vez la capacidad para aparearse, e intercambiar así sus mecanismos de resistencia a través de la recombinación sexual, lo que podría explicar la aparición de cepas altamente resistentes portadoras de múltiples mecanismos de resistencia (Morschhäuser, 2016).

1.6. Diagnóstico molecular

El diagnóstico rápido y certero de las infecciones fúngicas oportunistas, sobre todo en las sistémicas, es vital en el campo de la micología médica, ya que los síntomas suelen

ser inespecíficos, las técnicas basadas en el cultivo no poseen valores altos de sensibilidad (de hecho, la técnica *gold standard* para las infecciones fúngicas invasoras es el hemocultivo, cuya sensibilidad ronda el 50%) y los pacientes suelen presentar un mal estado general causado por su enfermedad de base.

La detección de ácidos nucleicos de los hongos se presenta como una técnica con gran potencial, sobre todo las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de cantidades muy pequeñas de ADN. La detección por ejemplo de los genes ribosomales, 18S o 28S, o de las regiones no codificantes, ITS1 e ITS2 facilitan la identificación precisa de distintas especies fúngicas, incluyendo especies de *Candida* (Perlin, 2009). Estas dianas de amplificación están presentes en el genoma de *Candida* en cientos o miles de copias, lo cual permite la detección de esta especie incluso en muestras clínicas con baja carga microbiana (<10 unidades formadoras de colonia). Por otro lado, la técnica de PCR a tiempo real junto con las sondas marcadas con fluoróforos permiten registrar la cinética de la reacción en tiempo real y obtener un resultado rápido y certero.

Del mismo modo, esta tecnología basada en sondas marcadas con fluoróforos resulta ideal para el diagnóstico de los mecanismos de resistencia a fármacos antifúngicos. La base genética que subyace tras estos mecanismos, entre otros, las mutaciones genéticas en los genes *ERG11*, *UPC2*, *TAC1* y *MRR1* para el caso de resistencia a azoles, o en los genes *FKS* en el caso de resistencia a equinocandinas (detalladas en capítulos anteriores), o la sobreexpresión de algunos de ellos puede ser fácilmente detectable con esta tecnología o con otras tecnologías de biología molecular basadas en la PCR, como puede ser la secuenciación (Wiederhold, Grabinski, Garcia-Effron, Perlin, & Lee, 2008), el análisis de curvas de melting (Loeffler et al., 2000) o la tecnología de microarrays de ADN (Yan et al., 2008).

Por lo tanto, el diagnóstico molecular permite detectar las resistencias primarias, es decir permite la rápida detección de especies intrínsecamente resistentes a los antifúngicos (como pueden ser *C. glabrata* y *C. krusei* frente a fluconazol, *S. capitata* frente a equinocandinas o *L. prolificans* frente a la mayoría de fármacos antifúngicos

Introducción

(García-Ruiz et al., 2013; Pellón et al., 2016; M. A. Pfaller & Diekema, 2004; Samaranayake, 1997)), que están apareciendo en los últimos años, debido sobre todo al uso generalizado de estos antifúngicos que ha forzado este cambio epidemiológico. Y por otro lado, también es una herramienta adecuada para el diagnóstico de las resistencias secundarias, ya que las alteraciones genómicas o cromosómicas asociadas a fenotipos resistentes están bien caracterizadas (A. Coste et al., 2006; A. T. Coste et al., 2004) y son varias las técnicas que permiten su identificación (Perlin, 2009).

OBJETIVOS

2. Objetivos

En las últimas décadas ha habido un incremento de las infecciones fúngicas en humanos debido a los avances médico quirúrgicos que han permitido la supervivencia de pacientes vulnerables. Los géneros *Candida* y *Aspergillus* ocupan el primer y segundo lugar, respectivamente, como causa de fungemia nosocomial. *Candida albicans* es la especie prevalente y, en combinación con *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* representa el 90% de las micosis invasoras. Además, hay un número creciente de especies fúngicas que, aprovechando las condiciones de inmunosupresión de los pacientes, causan infecciones menos comunes, pero con una alta tasa de mortalidad, destacando los géneros *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Saprochaete* entre otros. El aumento de estas especies menos comunes ha ido acompañado de un aumento de aislamientos con sensibilidad reducida a los fármacos antifúngicos, capaces de producir infecciones de brecha. El inicio temprano del tratamiento adecuado es fundamental para la supervivencia de estos pacientes, sin embargo, las técnicas de diagnóstico empleadas suelen ser laboriosas y lentas en proporcionar resultados. La biología molecular ofrece herramientas sencillas y rápidas para la identificación del patógeno fúngico y para la evaluación de la sensibilidad del microorganismo a los compuestos antifúngicos.

Por todo ello, en este trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. El desarrollo de un ensayo de PCR a tiempo real multiplex (qPCR) que permitiera la identificación simultánea de las principales especies de *Candida*.
2. La validación del ensayo de qPCR multiplex mediante el empleo de muestras orales y vulvovaginales.
3. La identificación de las mutaciones en los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* relacionadas con la resistencia a azoles en los aislamientos con sensibilidad reducida a azoles.
4. El desarrollo de un ensayo de PCR que permitiera la identificación específica de *Saprochaete capitata* en muestras clínicas.

Objetivos

5. La caracterización del gen *FKS* de *Saprochaete capitata* con el fin de establecer su implicación en la sensibilidad reducida a equinocandinas de esta especie.

MATERIAL Y METODOS

3. Materiales y métodos

3.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

3.1.1. Cepas utilizadas

Para realizar este trabajo se utilizaron 26 cepas del género *Candida* (Tabla 1), 7 especies de levaduras de otros géneros, 3 especies de hongos filamentosos y 8 especies bacterianas (Tabla 2)

Tabla 1. Cepas del género *Candida* utilizadas en este trabajo

ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3153	<i>Candida parapsilosis</i>	NCPF 3104
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3156	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida albicans</i>	ATCC 64124	<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC 96136
<i>Candida albicans</i>	ATCC 64550	<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC 96141
<i>Candida albicans</i>	ATCC MYA 2876*	<i>Candida metapsilosis</i>	ATCC 96143
<i>Candida dubliniensis</i>	NCPF 3949	<i>Candida metapsilosis</i>	ATCC 96144
<i>Candida dubliniensis</i>	NCPF 3108	<i>Candida metapsilosis</i>	UPV 13-078
<i>Candida dubliniensis</i>	CECT 11473	<i>Candida glabrata</i>	NCPF 3203
<i>Candida dubliniensis</i>	UPV 00-130	<i>Candida nivariensis</i>	CBS 9989
<i>Candida dubliniensis</i>	UPV 05-198	<i>Candida bracarensis</i>	NCYC 3133
<i>Candida dubliniensis</i>	UPV 05-199	<i>Candida guilliermondii</i>	NCPF 3099
<i>Candida dubliniensis</i>	UPV 05-200	<i>Candida tropicalis</i>	NCPF 3111
<i>Candida africana</i>	ATCC MYA 2669	<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258

*Cepa de *C. albicans* SC5314. ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; NCPF: National Collection of Pathogenic Fungi; NCYC: National Collection of Yeast Cultures; UPV: Colección de la UPV/EHU.

Tabla 2. Otras cepas de levaduras, hongos y bacterias utilizadas en este trabajo

ESPECIE	CEPA	ESPECIE	CEPA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 1678	<i>Streptococcus viridans</i>	CECT 804
<i>Candida lipolytica</i>	UPV 12-097	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CECT 985
<i>Saprochaete capitata</i>	IHEM 5665	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CECT 993
<i>Saprochaete capitata</i>	IHEM 5666	<i>Escherichia coli</i>	CECT 434
<i>Saprochaete capitata</i>	IHEM 6803	<i>Escherichia coli</i>	INV α F*

Materiales y métodos

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UPV 03-307	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 144
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 90113	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 108
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af-293	<i>Proteus mirabilis</i>	CECT 4168
<i>Lomentospora prolificans</i>	ATCC 64913	<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 435		

ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; IHEM: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms; UPV: Colección de la UPV/EHU.
*Invitrogen™.

3.1.2. Medios de cultivo

AGAR CROMOGENICO PARA CANDIDA (Conda)

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Cloranfenicol	0,5 g
Mezcla cromógena	0,4 g
Agar	15 g
Agua destilada hasta	1 l

Disolver completamente y llevar a ebullición durante 1 minuto.

AGAR CROMOGENICO PARA CANDIDA CON FLUCONAZOL

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Cloranfenicol	0,5 g
Mezcla cromógena	0,4 g
Agar	15 g
Agua destilada hasta	1 l

Disolver completamente y llevar a ebullición durante 1 minuto. Enfriar hasta 45 °C para después añadir el fluconazol.

AGAR GLUCOSADO DE SABOURAUD (Becton Dickinson)

D(+)-glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Agua destilada hasta	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

AGAR MUELLER-HINTON (Oxoid)

Caseína hidrolizada	17,5 g
Infusión de carne	300 g
Almidón	1,5 g
Agar	15 g
Agua destilada hasta	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CALDO DE SABOURAUD (Becton Dickinson)

D(+)-glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agua destilada hasta	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

RPMI 1640 (Sigma)

Es un medio sintético con glucosa al 2% y sin bicarbonato sódico. Para su uso, disolver 25 g de RPMI en 900 ml de agua destilada, tamponar con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (Sigma), ajustar a pH $7 \pm 0,1$, completar hasta 1 l y esterilizar por filtración.

RPMI AGAR

Se prepara RPMI 2X disolviendo 25 g de RPMI en 500 ml de agua destilada, tamponar con MOPS 0.164 M, ajustar a pH $7 \pm 0,1$, se esteriliza por filtración y se introduce en un baño a 45°C. Por otro lado, se disuelven 15 g de agar en 500 ml de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se enfría hasta 45°C para después mezclarlo con el RPMI 2X.

3.1.3. Condiciones de cultivo

Las levaduras se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 horas en agar glucosado de Sabouraud, o bien en caldo glucosado de Sabouraud a 140 rpm durante 18 horas. Para la conservación de las cepas tras ese período de crecimiento las placas se sellaron con Parafilm®, se mantuvieron a 4°C, y se realizaron resiembras mensuales en las mismas

condiciones. Para la conservación a largo plazo de nuestra colección de levaduras, se utilizaron crioviales (Microbank™) que se preservaron a -80°C.

Las especies bacterianas que utilizamos para este trabajo se crecieron en agar Mueller-Hinton a 37°C durante 18 horas para la obtención de células y su posterior extracción de ADN.

3.2. Pacientes y muestras clínicas

3.2.1. Muestras orales

Se estudiaron 291 muestras orales procedentes de la Clínica del Dr. J. L. Maza entre abril de 2010 y mayo de 2012. Todos los participantes del estudio fueron informados por su odontólogo de la finalidad del trabajo y firmaron el correspondiente consentimiento informado. La mucosa oral se muestreó con torunda estéril (con medio de transporte Stuart; Deltalab, España) y se envió al laboratorio para su estudio microbiológico.

3.2.2. Muestras vulvovaginales

Asimismo, se estudiaron 128 muestras de exudado vaginal de pacientes con sospecha de vulvovaginitis candidiásica (VVC) atendidas en la consulta de matronas del Centro de Salud de Bombero-Etxaniz de Bilbao entre febrero de 2013 y julio de 2015. Las muestras se tomaron por raspado de la mucosa vaginal con torunda estéril. A todas las participantes se les tomaron dos muestras vulvovaginales para su estudio microbiológico: una de las muestras se procesó con fines diagnósticos en el laboratorio de referencia del Centro de Salud y la otra muestra se procesó en el laboratorio de Micología Médica del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y Enfermería de la UPV/EHU.

Todas las participantes en el estudio fueron informadas de la finalidad de este trabajo de investigación, y firmaron la correspondiente hoja de consentimiento informado previo a la obtención de la muestra microbiológica para participar en este estudio ([Figura 1](#)). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) de Basurto, por el Comité de Ética para las Investigaciones relacionadas con

Seres Humanos (CEISH) de la Universidad del País Vasco UPV/EHU y por el Comité de Ética para la Investigación con Agentes Biológicos y Organismos modificados genéticamente (CEIAB) de la UPV/EHU.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Aislamiento y caracterización de especies fúngicas implicadas en patología humana (englobado en el Grupo de Estudio de la Infección Fúngica Invasora)

Yo.....,

mayor de edad, con DNI:

Declaro que:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con la matrona:
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 1. Cuando quiera
 2. Sin tener que dar explicaciones.
 3. Sin que esto suponga represalias de ningún tipo.
- Participo libremente en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

En Bilbao a de de 201..

(Firma de la paciente)

(Firma de la matrona que le atiende)

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: Grupo de Estudio de la Infección Fúngica Invasora (GEFI).
Línea de Investigación: Aislamiento y caracterización de especies fúngicas implicadas en patología humana.
Financiación: Grupos de Investigación del Sistema Universitario Vasco (Ref. IT788-13). Gobierno Vasco.
Investigadora Principal: Dra. M^a Dolores Moragues Tosantos (ldla.moragues@ehu.es)
Investigadora: Inés Arrieta Aguirre (Tf: 94 6015686. E-mail: ines.arrieta@ehu.es)
Duración del estudio: octubre 2014 – diciembre 2015.
Aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Basurto (CEIC-Basurto).

Versión 4 del 28 de octubre de 2014.

Figura 1. Hoja de consentimiento informado de las participantes en este estudio.

3.3. Obtención e identificación de aislamientos de muestras clínicas

3.3.1. Muestras orales

Para la obtención de los aislamientos orales se inocularon placas de agar cromogénico para *Candida* pasando el hisopo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones. Este medio cromógeno está diseñado para el aislamiento e identificación de algunas de las especies del género *Candida*. Las placas se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas y se procedió al recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por placa. Por medio del color que presentaron las colonias desarrolladas al reaccionar los sustratos cromógenos con enzimas secretadas por las distintas especies se puede determinar si se trata de un cultivo puro o mixto (Figura 2).

Se transfirió una colonia de cada color por placa a agar de Sabouraud para su posterior identificación y caracterización. Paralelamente, una colonia de cada aislamiento y color fue transferida a un tubo con agua destilada estéril para su conservación a temperatura ambiente.

Las torundas se guardaron a 4°C para su posterior extracción de ADN, que se detalla en los apartados 3.3.4.1 y 3.3.4.2.

3.3.2. Muestras vulvovaginales

PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

NaH ₂ PO ₄ (Panreac, España)	0,386 g
Na ₂ HPO ₄ (Panreac, España)	1,02 g
NaCl (Panreac, España)	8,5 g
Agua destilada hasta	1 l

Ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En el caso de las muestras vulvovaginales las muestras fueron recogidas del Centro de Salud de Bombero-Etxaniz, almacenadas a 4°C y procesadas en nuestro laboratorio en un plazo inferior a 48h. En este caso, el contenido microbiológico del hisopo se resuspendió en 400 μl de PBS estéril; para ello se cortó la punta del hisopo, se

introdujo en el PBS y se vortexeo con el fin de recuperar todas las células. El volumen se dividió en dos alícuotas, una de las cuales se guardó a -20°C para su posterior extracción de ADN, y la otra parte se sembró en agar cromogénico para *Candida* para la obtención de aislamientos de *Candida* del mismo modo que se realizó para las muestras orales.

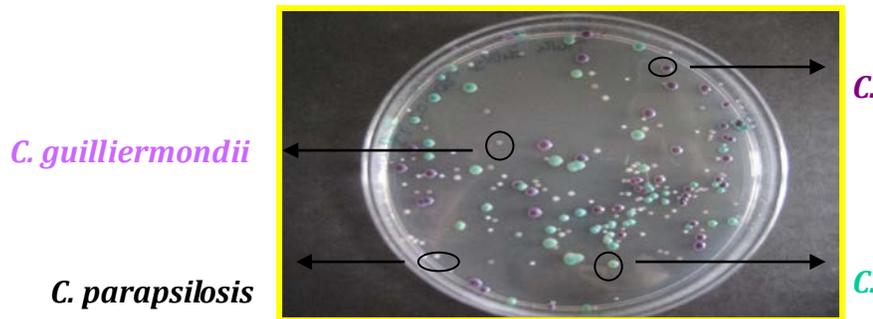


Figura 2. Aspecto de un cultivo mixto de una muestra en agar cromogénico para *Candida* (Conda). Las diferentes colonias fueron identificadas posteriormente como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*.

3.3.3. Identificación de los aislamientos obtenidos de las muestras clínicas

3.3.3.1. Identificación mediante PCR convencional

La identificación de los aislamientos con colonias de color verde en agar cromogénico para *Candida* se realizó mediante PCR siguiendo el protocolo descrito por Romeo y Criseo (Romeo & Criseo, 2008), el cual permite identificar 3 especies de *Candida* según el tamaño de los amplicones del gen *HWP1* obtenidos con los cebadores Cr-f y Cr-r (Tabla 3): 941 pb para *Candida albicans*, 569 pb para *Candida dubliniensis* y 700 pb para *Candida africana*.

Tabla 3. Cebadores empleados para la amplificación del gen *HWP1*.

CEBADORES	GEN	SECUENCIA 5'→3'
CR-f	<i>HWP1</i>	GCT ACC ACT TCA GAA TCA TCA TC
CR-r	<i>HWP1</i>	GCA CCT TCA GTC GTA GAG ACG

La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Reino Unido) en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 µl de

Materiales y métodos

una mezcla máster de Biomix DNA Polymerase (Bioline, Londres, Reino Unido) que incluye el tampón de reacción, dNTPs, cloruro de magnesio y la Taq ADN polimerasa, 0,8 µl de los cebadores Cr-f y Cr-r (25 µM), 2 µl de muestra (una colonia resuspendida en 200 µl de PBS con perlitras de vidrio estériles (Sigma, EEUU) y vortexeada) y agua destilada estéril hasta completar 20 µl de mezcla de reacción.

Las condiciones de la PCR consistieron en: fase de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 s, anillamiento a 58°C durante 40 s y extensión a 72°C durante 55 s, finalizando tras los ciclos con una fase terminal de extensión a 72°C durante 10 min.

3.3.3.1.1. Separación y visualización de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa

Tampón de electrodos TAE (50X):

Trizma base (Sigma, EEUU)	242 g
Ácido acético glacial (Sigma, EEUU)	57,1 ml
EDTA (Sigma, EEUU) 0.5 M (pH 8.0)	100 ml
Agua destilada hasta	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y diluir a la concentración de trabajo (1X) con agua destilada.

Tampón de carga (5X)

Tris-HCl pH 7.4	10 mM
Glicerol (Panreac, España)	50% (v/v)
Azul de bromofenol (BDH Chemicals, Reino Unido)	0.3% (p/v)

Diluir el tampón con la muestra amplificada por PCR hasta la concentración de trabajo (1X).

Los fragmentos amplificados por PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%-2% (peso/volumen), dependiendo del tamaño esperado del amplificado, suplementados con GelRed™ (Biotium, EEUU) en una cámara de electroforesis horizontal Sub-cell GT (Bio-Rad Laboratories, Californial EEUU). En

cada calle se añadieron 5 µl de muestra mezclada con tampón de carga. La electroforesis se realizó a 70V durante 50 minutos y las bandas se visualizaron con el transiluminador ChemiDoc (Bio-rad).

3.3.3.2. Identificación mediante test de asimilación de carbohidratos

La identificación de los aislamientos con colonias de colores distintos al verde se realizó mediante el test comercializado API ID 32C® (bioMérieux, Francia) de asimilación de fuentes de carbono que contiene los siguientes sustratos deshidratados: sorbitol, D-xilosa, ribosa, glicerol, ramnosa, palatinosa, eritritol, melibiosa, glucuronato, melezitosa, gluconato, levulinato, glucosa, sorbosa, glucosamina, esculina, galactosa, actidiona, sacarosa, N-acetil-glucosamina, DL-lactato, L-arabinosa, celobiosa, rafinosa, maltosa, trehalosa, 2-ceto-gluconato, α-metil-D-glucósido, manitol, lactosa e inositol.

La preparación del inóculo y la lectura de las galerías con el lector ATB 1550 (bioMérieux, Francia) se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

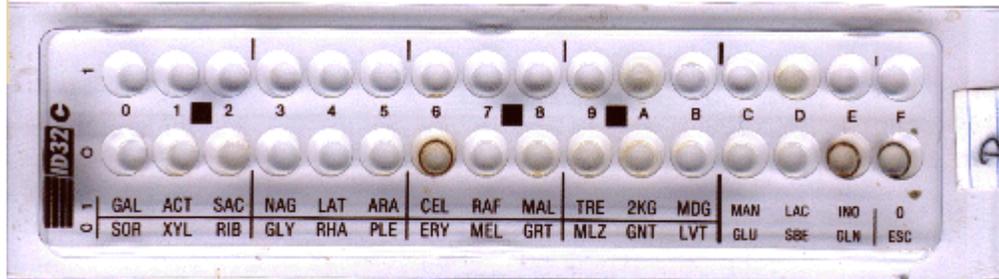


Figura 3. Galería API ID32C para la identificación de especies de levaduras (*Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Trichosporon* spp.).

3.3.3.3. Identificación mediante secuenciación de la región ribosómica

La identificación final de las especies de *Candida* cuyas pruebas no eran concluyentes se llevó a cabo mediante secuenciación de la región de ADN ribosómica (ADNr) utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (Tabla 4) según el protocolo descrito por White y colaboradores (T. J. White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).

Tabla 4. Cebadores empleados para la secuenciación de la región del ADN ribosómico fúngico.

CEBADORES	GEN	SECUENCIA 5'→3'
ITS-1	ADNr	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G

Se preparó la mezcla de PCR de la misma forma que la descrita en el apartado 3.3.3.1, sustituyendo los cebadores por la pareja ITS1-ITS4 aquí indicada y se amplificó el ADN en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, anillamiento de los cebadores a 56°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 minuto, seguidos por una extensión final a 72°C durante 7 min.

3.3.3.3.1. Purificación de los productos de PCR

Para la purificación de productos de PCR se utilizó el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este kit permite purificar moléculas de ADN de 0,1 kb a 10 kb, eliminando cebadores, nucleótidos, ADN polimerasa y sales procedentes de la PCR.

3.3.3.3.2. Secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación del ADN amplificado se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación y Genotipado de SGiker de la Universidad del País Vasco UPV/EHU. El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con los programas Chromas 2.5.1 (Technelysium) y BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.1 (Hall, 1999). Posteriormente, fueron chequeadas mediante el algoritmo bioinformático BLAST-*Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) perteneciente al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI de sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*). Esta herramienta está diseñada para buscar homologías entre secuencias de nucleótidos o proteínas.

3.3.3.3.3. Clonación de los productos de PCR en el vector pCRTM (Kit TA CLONINGTM)

Los productos de PCR se clonaron en el vector pCRTM 2.1 del kit TA Cloning (Invitrogen, EEUU), y se introdujeron en células competentes de *Escherichia coli*

Invitrogen™ One Shot™ INVαF' (Invitrogen, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.3.4. Extracción de ADN a partir de hisopos

Se siguieron distintos protocolos: uno manual y otro automatizado, este último implicaba el uso del equipo MagNA Pure Compact System (Roche, Alemania).

3.3.4.1. Extracción manual de ADN

Tampón de sorbitol

Sorbitol (Calbiochem, Alemania)	1,2M
CaCl (Panreac, España)	10 Mm
Tris pH 7	0,1 M

Tampón TRIS/EDTA (T/E)

Tris pH 7	10 mM
EDTA	1 mM

Este protocolo se siguió para los hisopos procedentes de muestras orales. Las puntas de los hisopos se introdujeron en 400 µl de tampón de sorbitol y se agitaron para soltar las células fúngicas. Para romper la pared celular se añadieron 50U de Liticasa (Sigma, EEUU) y se incubó 30 minutos a 30°C. Tras este paso se añadieron 40 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Roche, Alemania) y se incubó 10 min a 65°C. Para eliminar las proteínas y recuperar los ácidos nucleicos se añadieron 750 µl de Cloroformo:Isoamilalcohol (24:1) (Sigma, EEUU). Se recuperó la fase acuosa, donde se encuentra el ADN, el cual se precipitó con etanol (Panreac, Alemania) al 70% y acetato sódico (Sigma, EEUU) 0,3 M para después resuspenderlo en 50 µl de tampón T/E.

3.3.4.2. Extracción automatizada de ADN

La extracción automática de ADN se realizó partiendo de dos tipos de muestra: a) hisopos procedentes de muestras tanto orales como vulvovaginales y b) cultivos puros de levaduras. En ambos casos la extracción se realizó usando el sistema de extracción automática de ácidos nucleicos MagNA Pure Compact System, basado en la tecnología MGP- *Magnetic Glass Particle* (Partículas Magnéticas de Cristal) (Fig.4), y el

kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Alemania). La tecnología MGP se basa en la unión de las partículas MGPs y los ácidos nucleicos, los cuales son inmovilizados en la superficie de las mismas. Las proteínas, desechos celulares e inhibidores de la PCR son eliminados mediante sucesivos lavados. Por último, los ácidos nucleicos purificados son eluidos y separados de las MGPs.

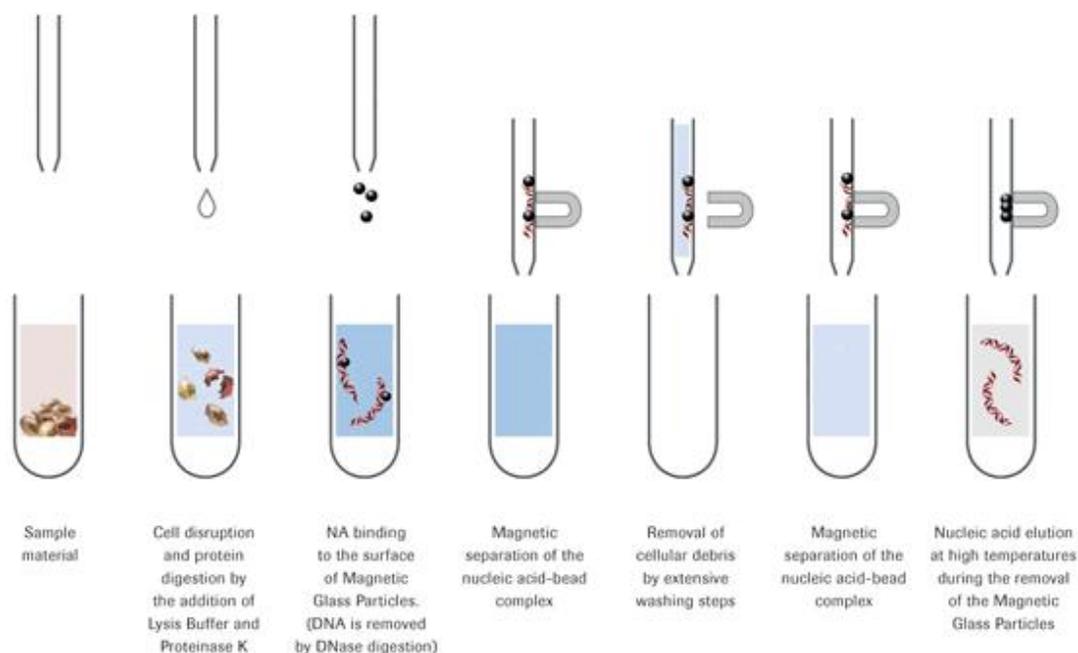


Figura 4. Esquema del proceso de aislamiento de ADN basado en la tecnología MGP-Magnetic Glass Particles del equipo MagNA Pure Compact de Roche.

En el caso de las muestras procedentes del raspado mediante torunda, y congeladas a -20°C , se realizó un protocolo de lisis celular previo al uso del equipo MagNA Pure Compact, recomendado por Roche. Las muestras se descongelaron y se añadieron 90 mg de perlitas de vidrio, se agitó durante 5 minutos, se recogió el sobrenadante, y se añadieron a este lisado 360 μl de MagNA Pure Bacterial Lysis Buffer (Roche, Alemania) y 40 μl de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se incubó 1 hora a 65°C y a continuación 10 minutos a 95°C . De este modo la muestra ya estaba lista para iniciar su procesamiento.

3.3.4.3. Medida de concentración y pureza de ADN

La concentración y pureza del ADN extraído, como producto de la extracción de ADN genómico, o producto de PCR, se determinaron midiendo las absorbancias a 230, 260 y 280 nm con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU). El valor de los cocientes A260/280 y A260/230 entre 1,6 y 2 indica un alto grado de pureza.

3.4. PCR a tiempo real (qPCR) para la identificación de especies de *Candida*

3.4.1. Estudio de la región ITS para el diseño de PCR específicas

De acuerdo con lo descrito por otros autores, la región del ADN ribosómico (ADNr) resulta ser un marcador universal para la identificación de hongos. Las regiones ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacers*), que flanquean el gen 5.8S, están recomendadas para discriminar tanto especies de *Candida* (Zhang et al., 2016) como de otros géneros fúngicos (Khot, Ko, & Fredricks, 2009). Dado que uno de los objetivos de este trabajo era la identificación de especies mediante PCR a tiempo real (qPCR) conviene que los amplificadores tengan una longitud de entre 50 y 150 pb con el fin de obtener la mayor eficacia posible en la reacción de amplificación.

Por todo ello se seleccionó la región ITS1 como diana para identificar seis especies de elevado interés clínico dentro del género *Candida*: *C. albicans*, cuya región ITS1 tiene una longitud de ~139 pb, *Candida parapsilosis*, con una longitud de ~149 pb, *Candida tropicalis*, con una longitud de ~149 pb, *Candida krusei* con una longitud de ~103 pb, *Candida guilliermondii* con una longitud de ~169 pb y *Candida glabrata* con una longitud de ~403 pb.

3.4.2. Diseño de cebadores

Se realizó una búsqueda de la región ITS1 y de sus secuencias flanqueantes, 18S y 5.8S, de las seis especies de *Candida* en la base de datos Nucleotide de NCBI. Se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo de MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by*

Log-Expectation) (Edgar, 2004) y, con ayuda del programa Primer Express (Applied Biosystems), se diseñó una pareja de cebadores que amplificaba las seis especies: Diamol-F y Diamol-R.

Además, se diseñó un cebador específico para *C. glabrata*, DiamolRglab, que se localiza dentro de la región ITS1, con el fin de conseguir un amplificado del tamaño óptimo para la qPCR para esta especie.

3.4.3. Diseño de sondas específicas

Dentro del fragmento amplificado se diseñaron 11 sondas de hidrólisis (o Taqman) diferentes para la identificación específica de las 6 especies de *Candida*.

Las sondas utilizadas en este trabajo fueron marcadas con distintos fluoróforos en el extremo 5', de manera que posteriormente fuera posible combinarlas en una misma reacción múltiple, las sondas para la detección de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* se marcaron con el fluoróforo FAM y las sondas para la detección de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis* se marcaron con HEX.

3.4.4. Control Interno (CI)

Se diseñó un control interno (CI) de amplificación para la detección de los casos falsos negativos (FN) que pudieran ocurrir debido a la inhibición de la qPCR. Adicionalmente, se diseñó otra sonda de hidrólisis para que hibridase con el CI. Dado el número de canales de fluorescencia que posee el termociclador de qPCR 7300 (Applied Biosystem, EEUU) empleado en este trabajo y, con el fin de poder combinarlo con las sondas diseñadas para la detección de especies de *Candida*, la sonda para la detección del CI se marcó con el fluoróforo ROX en su extremo 5'.

3.4.5. Reacción de qPCR multiplex

La qPCR multiplex fue diseñada para la detección por un lado de las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*, por otro lado *C. glabrata* y *C. guilliermondii* y finalmente *C. tropicalis* y *C. krusei*. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado en el termociclador 7300 de Applied Biosystem, en un volumen final de 25 μ l conteniendo 10 μ l de Premix Ex Taq™ (Takara, Japón), 0,65 μ M de cada cebador, 0,3

μM de cada una de las sondas y 2 μl de ADN molde (10 ng/ μl). Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 5 segundos para la desnaturalización y 60°C durante 31 segundos para el anillamiento de los cebadores y la extensión, con una lectura de la fluorescencia emitida en cada ciclo de extensión.

En cada programa de amplificación se incluyeron controles positivos a los que se les introdujo ADN extraído de las cepas utilizadas como estándar para la optimización del método y controles negativos sin ADN molde (NTC: *Non Template Control*).

Todos los protocolos de qPCR empleados en este estudio siguieron las recomendaciones dadas por MiQE (Bustin et al., 2009) y por Khot y Fredricks (Khot & Fredricks, 2009). Brevemente, la extracción de ADN, las mezclas de PCR, el desarrollo de la reacción y el análisis de los productos amplificados se llevaron a cabo en diferentes locales y se utilizó material de plástico desechable, estéril, libre de ARN, ADN, ARNasas, ADNasas, y puntas con filtro. La reacción de PCR se desarrolló siempre en el mismo sentido de flujo en localizaciones diferenciadas. En una cabina de flujo laminar de bioseguridad se añadían todos los reactivos excepto el ADN, y en otra cabina de flujo laminar, localizada en otra habitación, se añadía el ADN. La reacción de qPCR se realizaba en una tercera estancia separada. En caso de que fuese necesario abrir los productos de qPCR para migrarlos en el gel de agarosa, se realizaba en otro laboratorio y el día que se abrían los tubos con los amplificados de qPCR no se realizaba ningún ensayo más de PCR, con el fin de evitar contaminación con amplificados anteriores (*carryover contamination*).

Todos los ensayos y reacciones se realizaron por triplicado.

3.5. Sensibilidad in vitro a compuestos antifúngicos

3.5.1. Método M27-A3 según CLSI

La sensibilidad de los aislamientos a fluconazol (Sigma, EEUU) tanto de las cepas de *Candida* de la colección de la UPV/EHU, como de los aislamientos clínicos, se realizó

siguiendo el método estandarizado de microdilución en caldo RPMI propuesto por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) en su documento M27-A3 (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008*), comprendiendo un rango de concentraciones de 0,12-64 µg/ml.

Dado que la metodología para estudiar la actividad antifúngica del clotrimazol no está estandarizada, seguimos el protocolo propuesto por Pelletier y colaboradores que se basa en el documento M27-A3 del CLSI con algunas modificaciones (Pelletier et al., 2000). Se preparó una solución stock inicial de clotrimazol (Sigma, EEUU) 10000 µg/ml en DMSO (Sigma, EEUU). El stock inicial se diluyó hasta 1600 µg/ml con agua destilada estéril (16% de DMSO). A partir de esta solución se realizan las diluciones seriadas en agua destilada, quedando cada una de las concentraciones de antifúngico con una cantidad diferente de DMSO. El control de crecimiento se realizó usando la cantidad máxima de DMSO para descartar la inhibición de crecimiento fúngico por este reactivo. Las diluciones seriadas de clotrimazol comprendían las concentraciones 0,03-16 µg/ml. El punto de corte para establecer si un aislamiento es sensible o resistente se estableció en 0,5 µg/ml (Gamarra et al., 2014; Pelletier et al., 2000). Una vez preparadas las microplacas se sellaron con parafilm y se guardaron a -80°C durante un máximo de 6 meses envueltas en papel de aluminio.

Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.5.2. Método SENSITITRE YEASTONE10®

En aquellos aislamientos que mostraron una sensibilidad reducida a fluconazol y/o clotrimazol, se realizó la determinación complementaria de su sensibilidad a otros antifúngicos mediante el método comercial Sensititre YeastOne10® (Trek Diagnostic System, Reino Unido). Es un método de dilución colorimétrico que contiene un indicador de crecimiento basado en la oxidación 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 nueve antifúngicos deshidratados: anidulafungina (0,015-8 µg/ml), micafungina (0,008-8 µg/ml), caspofungina (0,008-8 µg/ml), 5-fluorocitosina (0,06-64 µg/ml), posaconazol (0,008-8 µg/ml), voriconazol (0,008-8 µg/ml),

itraconazol (0,015-16 µg/ml), fluconazol (0,12-256 µg/ml) y anfotericina-B (0,12-8 µg/ml). Este ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. Caracterización de los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* en aislamientos de *Candida albicans*

Dado que en la literatura se ha descrito la relación entre la capacidad de resistencia a los compuestos antifúngicos con la presencia de mutaciones puntuales en determinados genes, en este trabajo se han estudiado las secuencias de los factores de transcripción *TAC1* y *UPC2* y del gen *ERG11*, diana de los azoles, en cepas de *C. albicans* con sensibilidad reducida a azoles, obtenidas a partir de muestras vulvovaginales de este estudio, así como de otros aislamientos clínicos procedentes de la colección de la UPV/EHU y de otros centros. Los aislamientos fueron cedidos amablemente por los Dr. Ferran Sánchez Reus del Hospital de la Santa Creu i San Pau de Barcelona, la Dra. Emilia Cantón del Hospital Universitari i Politècnic la Fe de Valencia y la Dra. María Soledad Cuétara del Hospital Universitario Severo-Ochoa de Madrid (Tabla 5). Asimismo, también se analizaron los polimorfismos de varios aislamientos vulvovaginales sensibles y de la cepa *C. albicans* de referencia SC5314, sensible a los antifúngicos estudiados (Tabla 6).

Se les realizó un ensayo de sensibilidad in vitro a fluconazol y clotrimazol tanto a nuestros aislamientos clínicos como a las cepas procedentes de distintas colecciones, tal y como se detalla en los apartados 3.5.1. y 3.5.2. Algunas de las cepas anteriormente catalogadas como resistentes mostraron un patrón sensible en nuestros ensayos. Éstas fueron catalogadas como sensibles revertientes (Tabla 7).

Tabla 5. Aislamientos clínicos de *C. albicans* con sensibilidad reducida a azoles.

IDENTIFICACIÓN	ORIGEN/TIPO de		
	MUESTRA [§]	PROCEDENCIA	COMENTARIOS [§]
BE-113	Vulvovaginal	Este estudio	Paciente con historial de VVCR
BE-114	Vulvovaginal	Este estudio	Paciente con historial de VVCR. Participó en ensayo clínico de vacunación
15-154	Hemocultivo [§]	Dr. Sánchez Reus	Resistente a FLC, ITC, VRC*
15-156	Humor vítreo [§]	Dr. Sánchez Reus	Resistente a FLC, ITC, VRC*

Materiales y métodos

15-159	Herida [§]	Dr. Sánchez Reus	Resistente a FLC, ITC, VCR, POS*
15-176	Desconocido [§]	Dra. Cantón	Resistente a azoles*. Sobreexpresión de <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>ERG11</i> , <i>MDR1</i>
16-091	Exudado vaginal [§]	Dra. Cuétara	Resistente a azoles*. Paciente con historial de VVCR
16-123	Vaginal [§]	Dra. Cuétara	Resistente a azoles*. Paciente con historial de VVCR
16-092	Espujo [§]	Dra. Cuétara	Resistente a FLC, ITC, VRC, KTZ*
16-132	Faríngeo [§]	Dra. Cuétara	Resistente a FLC, ITC, VRC, KTZ*
16-138	Broncoaspirado [§]	Dra. Cuétara	Resistente a FLC, ITC, VRC, KTZ*
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	Oral	ATCC	Cepa de referencia. Resistente a FLC, ITC, VRC*
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	Piel	ATCC	Cepa de referencia. Resistente a FLC*

§: datos de los aislamientos de *C. albicans* proporcionados por otros autores. *patrones de sensibilidad a compuestos antifúngicos establecidos por otros autores. ATCC: American Type Culture Collection. FLC Fluconazol, ITC Itraconazol, KTZ ketoconazol, POS Posaconazol y VRC Voriconazol. VVCR: Vulvovaginitis Candidiásica Recurrente.

Tabla 6. Aislamientos de *C. albicans* sensibles a azoles.

IDENTIFICACIÓN	ORIGEN/ TIPO de MUESTRA	PROCEDENCIA	COMENTARIOS
BE-AZ	vulvovaginal	Este estudio	Sensible a azoles. Paciente con historial de VVCR
BE-32	vulvovaginal	Este estudio	Sensible a azoles
BE-48	Vulvovaginal	Este estudio	Sensible a azoles
BE-47	Vulvovaginal	Este estudio	Sensible a azoles
<i>C. albicans</i> ATCC MYA 2876	SC5314 -	ATCC	Cepa de referencia. Genoma secuenciado. Sensible a todos los compuestos antifúngicos

ATCC: American Type Culture Collection. VVCR: Vulvovaginitis Candidiásica Recurrente.

Tabla 7. Aislamientos clínicos de *C. albicans* catalogados como sensibles revertientes.

IDENTIFICACIÓN	ORIGEN/TIPO de MUESTRA§	PROCEDENCIA	COMENTARIOS§
06-100	Celulitis necrotizante§	Colección UPV/EHU	Resistente*
06-114	Oral§	Colección UPV/EHU	Resistente a VRC, POS*
06-116	Prótesis§	Colección UPV/EHU	Resistente a VRC, POS*
08-105	Oral§. Liquen plano oral	Colección UPV/EHU	Resistente a VRC, POS, MCZ*.
10-166	Desconocido	Colección UPV/EHU	Resistente a FLZ, ITC*
10-169	Desconocido	Colección UPV/EHU	Resistente a FLZ, ITC*
10-171	Desconocido	Colección UPV/EHU	Resistente a ITC*
10-280	Oral§	Colección UPV/EHU	Resistente a FLZ, ITC, POS. Sensible dosis dependiente a VRC*
15-153	Orina nefrostomía§	Dr. Sánchez Reus	Resistente a FLZ, ITC, VRC*
15-160	Desconocido§	Dr. Sánchez Reus	Resistente a FLZ, ITC, VRC, POS*

§: datos de los aislamientos de otras colecciones proporcionados por otros autores. * patrones de sensibilidad a compuestos antifúngicos establecidos por otros autores. FLC Fluconazol, ITC Itraconazol, MCZ Miconazol, POS Posaconazol y VRC Voriconazol.

3.6.1. Diseño de cebadores

Se procedió a la búsqueda y posterior alineamiento de las secuencias de los genes *TAC1*, *UPC2* y *ERG11*, tal y como se detalla en el apartado 3.4.2. Para el diseño de cebadores se evitaron regiones polimórficas, y se eligieron las más conservadas para asegurar el correcto anillamiento de los cebadores con su molde diana de ADN. Se tuvieron en cuenta además los criterios descritos por Sambrook y Russel (Sambrook & Russel, 2001): los cebadores debían tener una longitud de 18-25 bases, el contenido de guanina y citosina no debía de exceder el 60%, había que evitar que en las 5 últimas bases del extremo 3' hubiera tres o más guaninas o citosinas y debían tener, preferiblemente, una temperatura de fusión (T_m) entre 52-58°C.

Asimismo, se utilizó el programa Oligo Analyzer 3.1 de IDT-Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) para

comprobar que los cebadores diseñados no formaban horquillas, bucles, homodímeros ni heterodímeros.

3.6.2. Obtención de ADN a partir de cultivos de levaduras

Tampón de extracción con liticasa

Tris pH 8	50 mM
Na-EDTA (Sigma, EEUU)	25 mM
NaCl	75 mM
Liticasa	15 U

Para llevar a cabo la extracción de ADN se crecieron las cepas en agar glucosado de Sabouraud durante la noche a 37°C. Para romper las células, se resuspendieron 4-5 colonias del cultivo puro crecido en agar Sabouraud en 400 µl de PBS estéril, se añadieron 90 mg de perlitas de vidrio estériles y se agitaron en el vórtex durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante, se añadieron 300 µl del tampón de extracción con liticasa y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 4 µl de ARNasa (100 mg/ml) (Qiagen, Alemania) y se incubó a 30°C durante 20 minutos. Finalmente, se añadieron 100 µl de SDS al 10% (Bio-rad, EEUU) y 40 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Tras incubar a 55°C durante 20 min, se continuó a partir del paso 4 del kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La concentración y pureza del ADN extraído se determinó de la manera que se detalla en el apartado 3.3.4.3

3.6.3. Amplificación del gen *ERG11*

Hay descritas más de 140 sustituciones de aminoácidos en Erg11 distribuidas por toda la proteína (Morio et al., 2010), desde el aminoácido 33 (Cernicka & Subik, 2006), hasta el 523 (Sanglard & Bille, 2002). Para poder detectarlas todas se diseñaron cebadores que pudiesen amplificar prácticamente toda la región codificante del gen.

Para ello, se dividió el gen en dos regiones solapadas: la parte del extremo 5' a la que llamamos extremo N terminal y la parte del extremo 3', a la cual llamamos extremo C terminal. Con el fin de obtener el amplificado de mayor tamaño y con la mejor calidad

de secuencia posible y debido a la alta tasa de polimorfismos del cromosoma 5 (Magee, 2007), donde se localiza *ERG11*, se diseñaron y probaron distintas combinaciones de cebadores.

Asimismo, se emplearon dos polimerasas distintas: a) PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara, Japón); es una enzima de alta fidelidad, con un bajo error de copia (9 errores por 230.129 bases) (Tabla 8), y b) Platinun™ Superfi™ DNA Polymerase (Invitrogen, EEUU); también de alta fidelidad y con corrección de copia, lo cual nos aseguraba que las mutaciones detectadas en los amplicones eran debidas a sustituciones de nucleótidos y no a errores del enzima a la hora de copiar el fragmento diana (Tabla 9). Las reacciones se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Tabla 8. Mezcla de reacción de PCR con la polimerasa PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara).

Reactivos	[final]
PrimeSTAR Max Premix (2X)	1X
Cebador directo*	0,5 µM
Cebador reverso*	0,5 µM
ADN genómico	10 ng
H ₂ O	hasta 25 µl

*para ambos extremos de *ERG11*

La amplificación se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del enzima PrimeSTAR Max DNA Polymerase: 30 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15 segundos, anillamiento a 30°C durante 10 segundos y extensión a 72°C durante 5 segundos.

Tabla 9. Mezcla de reacción de PCR con la polimerasa Platinum SuperFI DNA Polymerase (Invitrogen).

Reactivos	Concentración final
SuperFI Buffer (5X)	1X
Cebador directo*	0,5 µM
Cebador reverso*	0,5 µM
dNTP mix	0.2 mM
MgCl ₂	1.5-3 mM
Platinum SuperFI DNA Polymerase	1 U
ADN genómico	10 ng
H ₂ O	hasta 25 µl

*para ambos extremos de *ERG11*

Las recomendaciones del fabricante del enzima Platinum SuperFi DNA Polymerase fueron: un primer paso de desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos, 30 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, anillamiento a 53°C durante 10 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos, y un paso final de 72°C durante 5 minutos.

3.6.4. Amplificación del gen *TAC1* (*Transcription Activator 1*)

La estrategia para caracterizar *TAC1* fue distinta; no se planteó la amplificación de toda la secuencia codificante (CDS) debido a su longitud (2946 pb). Se seleccionaron dos regiones del gen no-solapadas, codificantes para el segmento desde el aminoácido 225 hasta el 461 y la otra desde el aminoácido 673 hasta el último aminoácido, el 980. Se eligieron estas zonas por ser las zonas donde se localizan las mutaciones con efecto de ganancia de función, o GOF por sus siglas en inglés, descritas en la literatura (A. Coste et al., 2006; A. T. Coste et al., 2004; A. T. Coste et al., 2009; Znaidi et al., 2007)

TAC1 se localiza en el mismo cromosoma que *ERG11*, así que teniendo en cuenta la alta tasa de variabilidad del cromosoma 5, y con el fin de obtener el amplificado de mayor tamaño y con la mejor calidad de secuencia posible, se diseñaron y probaron distintas combinaciones de cebadores. Asimismo, se emplearon dos polimerasas distintas, las reacciones de PCR se prepararon del mismo modo que el descrito en las tablas 8 y 9, sustituyendo los cebadores por alguna de las combinaciones diseñadas para *TAC1*, y siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.6.3.

Los cebadores empleados para amplificar el segmento que incluye al aminoácido 980 se localizan fuera del CDS, y fueron diseñados a partir de una única secuencia, el contig Ctg19-10170 (número de acceso en Nucleotide: NW_139520), correspondiente a un fragmento del cromosoma 5, obtenido de la secuenciación del genoma completo de la cepa de *C. albicans* SC5314 (Jones et al., 2004).

3.6.5. Amplificación del gen *UPC2* (*Uptake Control 2*)

Este factor de transcripción está codificado por el gen *UPC2* de 2139 pb. Las mutaciones GOF descritas en él se localizan entre los aminoácidos 642 y 648 (Dunkel et al., 2008a; Flowers et al., 2012; Heilmann et al., 2010; Hoot et al., 2011). En este

caso se sintetizó una única pareja de cebadores para amplificar la región codificante para el segmento desde el aminoácido 642 hasta el 648.

Las reacciones de PCR se prepararon del mismo modo que el descrito en las tablas 8 y 9, sustituyendo los cebadores por la pareja diseñada para *UPC2*, y siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.6.3

3.7. Microevolución y resistencia a azoles en poblaciones experimentales de *Candida albicans*

Para poder estudiar el comportamiento y/o ocurrencia de microevolución en presencia de fluconazol, con el fin de forzar la aparición de mecanismos de resistencia basados en las mutaciones GOF, se seleccionaron dos cepas de *C. albicans* sensibles a azoles: 1) el aislamiento clínico BE-47, sensible a azoles y procedente de una paciente sin antecedentes de VVC y 2) la cepa de referencia SC5314, una cepa ampliamente estudiada, cuyo genoma está secuenciado, y que se utiliza como control tanto de caracterización de genes como de sensibilidad a antifúngicos (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas BE-47 y SC5314 a distintos azoles.

ANTIFÚNGICOS	AISLAMIENTOS (CMI 24h-48h)	
	BE-47	SC5314
FLC*	0,5-0,5	0,12-0,5
VRC*	0,008-0,008	<0,008-0,008
ITC*	0,03-0,06	0,03-0,06
POS*	0,015-0,03	0,008-0,06
CLT§	0,03-0,06	0,03-0,12

Los valores de CMI aparecen expresados en µg/ml. *datos obtenidos mediante Sensititre YeastOne®. § resultados obtenidos mediante el protocolo M27-A3 del CLSI. CLT clotrimazol, FLC fluconazol, ITC itraconazol, POS posaconazol y VRC voriconazol.

Basándonos en los ensayos realizados por Cowen y colaboradores (Cowen et al., 2000) ambas cepas fueron cultivadas de forma secuencial en medio RPMI con fluconazol en concentraciones crecientes en un rango desde 0,25 a 64 µg/ml (poblaciones experimentales), y paralelamente en medio RPMI sin antifúngico (poblaciones control). El inóculo inicial de 10⁶ células se tomó de una única colonia aislada de un cultivo en agar glucosado de Sabouraud. De esta forma asegurábamos que partíamos de un único clon, y que las posibles mutaciones detectadas serían

debidas a la presión ejercida por el antifúngico y no a una población heterogénea de partida.

Las células se cultivaron en medio RPMI a 37°C, con agitación a 140 rpm. En una primera parte del experimento las poblaciones experimentales se mantuvieron durante 5 días en medio RPMI con fluconazol 0,25 µg/ml, para que las células se habituaran a la presencia del antifúngico. Una vez superada esta fase inicial se procedió a la exposición de las células a concentraciones crecientes de antifúngico con el esquema mostrado en la figura 5.

Si se observaba crecimiento de la población experimental tras 24 horas en presencia de fluconazol, se consideraba que la población había superado esta concentración de antifúngico y se procedía a:

1. Medir la densidad óptica a 595 nm (OD_{595}) para realizar un pase de 10^6 células a medio RPMI nuevo con doble concentración de fluconazol.
2. Plaquear en agar cromogénico para *Candida* con fluconazol, a la concentración recientemente superada, con el fin de seleccionar clones que hubiesen desarrollado mecanismos de resistencia a esa concentración de antifúngico, y así poder secuenciar los genes *TAC1*, *UPC2* y *ERG11* en busca de las mutaciones GOF.
3. Guardar a -80°C, en glicerol al 50%, 1 ml de la población experimental y 1 ml de la población control, con el fin de analizar los mismos polimorfismos genéticos en toda la población.

En caso de no observarse crecimiento a las 24 horas, y para evitar la inactivación del fármaco antifúngico, se hacía un pase a medio RPMI fresco suplementado con la misma concentración de fluconazol, hasta que hubiese crecimiento.

Para finalizar el ensayo, las poblaciones experimentales se mantuvieron durante 5 días a una concentración de fluconazol 64 µg/ml. Y a continuación se mantuvieron 5 días en medio RPMI sin antifúngico, para tratar de elucidar si los mecanismos desarrollados por las células fúngicas para superar la presión del antifúngico se mantenían en ausencia de fluconazol.

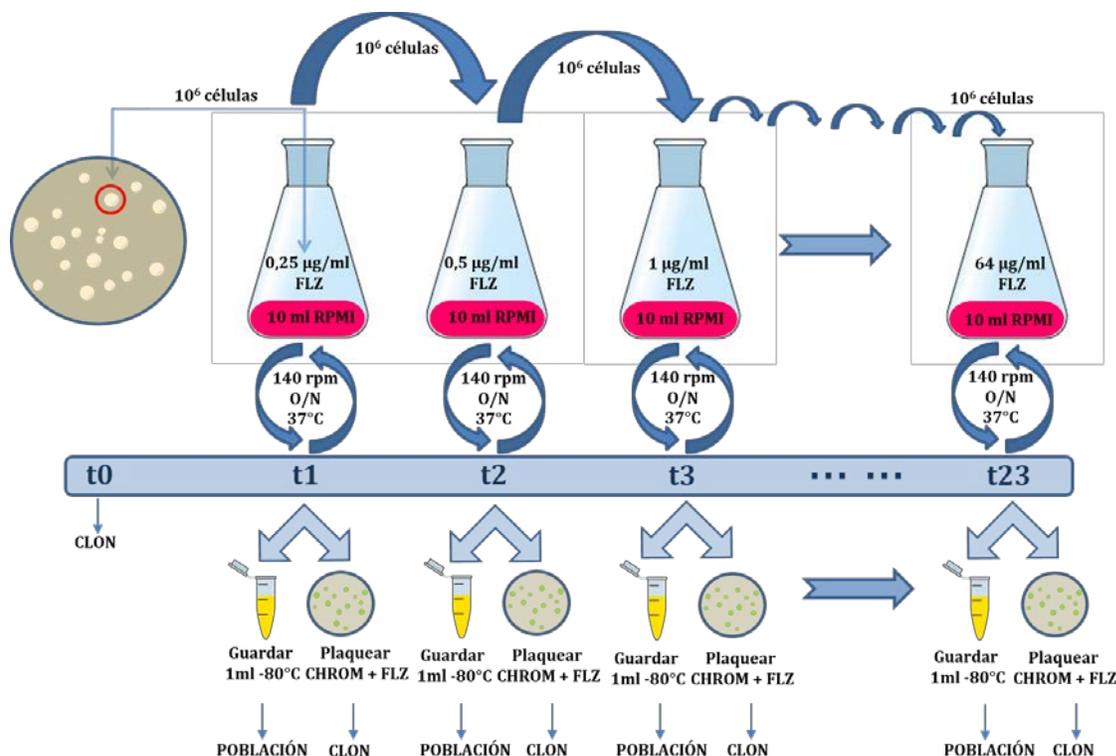


Figura 5. Esquema del ensayo de micro-evolución realizado en este trabajo.

Finalmente, junto con cada una de las poblaciones experimentales se guardó a -80°C otra alícuota de la población control sin antifúngico para comparar las secuencias genómicas en ambas poblaciones y descartar así las mutaciones no debidas a la presión ejercida por el fluconazol.

3.7.1. Análisis de las secuencias de los clones y de las poblaciones seleccionadas

Se seleccionaron para la determinación de la sensibilidad a compuestos azólicos y el análisis de las mutaciones GOF en los genes *TAC1*, *UPC2* y *ERG11* los aislamientos que aparecen detallados en la tabla 11.

Tabla 11. Aislamientos seleccionados para el análisis de las mutaciones GOF.

AISLAMIENTOS	DESCRIPCIÓN, se realizó el análisis
BE-47_t0	t ₀ : antes de la exposición a fluconazol
BE-47_t23_CONTROL	t ₂₃ : tras cultivar en RPMI sin antifúngico 23 días.
BE-47_t23_64 (población)	t ₂₃ : tras cultivar en RPMI a concentraciones crecientes de fluconazol durante 23 días.
BE-47_t23_64 (clon)	t ₂₃ : tras cultivar en RPMI a concentraciones crecientes de fluconazol durante 23 días, plaquear en SAB sin antifúngico y seleccionar

	una de las colonias
SC5314_t0	t_0: antes de la exposición a fluconazol
SC5314_t23_CONTROL	t_23: tras cultivar en RPMI sin antifúngico 23 días
SC5314_t23_64 (población)	t_23: tras cultivar en RPMI con concentraciones crecientes de fluconazol durante 23 días.
SC5314_t23_64 (clon)	t_23: tras cultivar en RPMI con concentraciones crecientes de fluconazol durante 23 días, plaquear en SAB sin antifúngico y seleccionar una de las colonias

El ADN de los aislamientos seleccionados se purificó tal y como se detalla en el apartado 3.6.2. La determinación de la CMI se llevó a cabo mediante CLSI y Sensititre YeastOne10®, tal y como se detalla en los apartados 3.5.1 y 3.5.2. Para la detección de mutaciones GOF en los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* se amplificaron las regiones descritas en los apartados 3.6.3, 3.6.4 y 3.6.5 (respectivamente). Los amplicones se enviaron al Servicio de Secuenciación y Genotipado de SGiker de la Universidad del País Vasco UPV/EHU, las secuencias obtenidas se analizaron tal y como se detalla en el apartado 3.3.3.3.2, y se compararon con las secuencias de referencia X13296 (*ERG11*), DQ393587(*TAC1*) y EU583451(*UPC2*).

3.8. Identificación molecular de *Saprochaete capitata* en muestras de sangre y muestras clínicas incluidas en parafina

3.8.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre inoculadas artificialmente con células de *Saprochaete capitata*

Se inoculó sangre humana de un donante anónimo con 10^6 UFC/ml de *S. capitata*, y se realizaron diluciones seriadas hasta 10 UFC/ml. Los eritrocitos y leucocitos se lisaron siguiendo las recomendaciones de Einsele y colaboradores (Einsele et al., 1997). Después, para la obtención de esferoblastos, las muestras se incubaron 20 min a 30°C en tampón de lisis con 15U de lítica (apartado 3.6.2 de materiales y métodos). Se continuó a partir del paso 4 del kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.8.2. Extracción de ADN a partir de muestras clínicas incluidas en parafina

Las muestras de tejido incluidas en parafina se desparafinizaron siguiendo las recomendaciones de Bialek y colaboradores (Bialek et al., 2005), con algunas modificaciones: las muestras se sumergieron en xileno a 45°C durante 15 min (dos veces), y se realizaron varios lavados en etanol al 100%, 90% y 70%. El tejido desparafinado se dejó secar y se resuspendió en MagNA Pure Bacterial Lysis Buffer con proteinasa K (20 mg/ml). Se añadieron perlitas de vidrio estériles, se vortexeó y tras centrifugar se recogió el sobrenadante. La muestra ya estaba lista para iniciar su procesamiento mediante el sistema de extracción automática de ácidos nucleicos de Roche, MagNA Pure Compact System.

3.8.3. Diseño de cebadores y amplificación mediante PCR

Se eligió la región del ADNr como diana de amplificación por ser considerada un marcador universal para la identificación de hongos. Se diseñó una pareja de cebadores Scap200-ScapR, específicos para *Saprochaete capitata*, con ayuda del programa OligoAnalyzer 3.1 de IDT para comprobar que los cebadores diseñados no formaban horquillas, bucles, homodímeros ni heterodímeros.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 µl de una mezcla máster de Biomix DNA Polymerase (Bioline, Londres, Reino Unido) que incluye el tampón de reacción, dNTPs, cloruro de magnesio y la Taq ADN polimerasa, 0,625 µM de cada uno de los cebadores, 10 ng de ADN molde y agua estéril destilada hasta completar el volumen final.

Las condiciones de la PCR consistieron en: fase de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, anillamiento a 60°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s, finalizando los ciclos con una fase terminal de extensión a 72°C durante 7 min. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Reino Unido). Posteriormente, se realizó una electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% (peso/vol), tal y como se detalla en el apartado 3.3.3.1.1 de materiales y métodos.

Con el fin de corroborar la amplificación específica del segmento comprendido entre la subunidad 18S y la región espaciadora ITS1 de *S. capitata*, se purificaron y se secuenciaron los productos de PCR tal y como se detalla en los apartados 3.3.3.3.1 y 3.3.3.3.2 de este capítulo.

3.9. Secuenciación del *Hot Spot 1* del gen *FKS* en *Saprochaete capitata*

3.9.1. Estudio de sensibilidad *in vitro* a los compuestos antifúngicos

La determinación de la sensibilidad de 12 aislamientos de *S. capitata* (Tabla 12) a distintos compuestos antifúngicos se realizó mediante el método comercial Sensititre YeastOne10® siguiendo las instrucciones del fabricante, tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos.

Tabla 12. Aislamientos de *S. capitata*.

Identificación	Origen/Tipo de muestra	Procedencia	Patología del paciente
17719	Hemocultivo	Colección UPV/EHU	Leucemia mieloide aguda
47451	Catéter central	Colección UPV/EHU	Leucemia mieloide aguda
69180	Catéter central	Colección UPV/EHU	Leucemia linfocítica aguda
74605	Hemocultivo	Colección UPV/EHU	Linfoma de Burkitt
99190	Necropsia pulmón	Colección UPV/EHU	Leucemia mieloide aguda
600	Bronco aspirado	Dra. Cuétara	-
648	Bronco aspirado	Dra. Cuétara	Paciente VIH y TBC
696	Herida quirúrgica	Dra. Cuétara	Peritonitis
1123	Bronco aspirado	Dra. Cuétara	Sepsis
IHEM 5665	Sangre	BCCM/IHEM	Geotricosis (leucemia)
IHEM 5666	Sangre	BCCM/IHEM	Geotricosis (leucemia)
IHEM 6803	LBA	BCCM/IHEM	-

VIH: Virus inmunodeficiencia humana, LBA: Lavado bronco alveolar. BCCM/IHEM: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms.

3.9.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los cultivos fúngicos se realizó siguiendo las recomendaciones de Turin y colaboradores (Turin, Riva, Galbiati, & Cainelli, 2000), tal y como se detalla en el apartado 3.6.2 de materiales y métodos.

3.9.3. Diseño de cebadores degenerados

Al no existir información sobre el gen *FKS* de *Saprochaete capitata* en GenBank se diseñaron unos cebadores degenerados para la amplificación de la región *Hot Spot 1*

(HS1) de este gen basándonos en las secuencias para la misma región de 12 especies fúngicas, incluyendo a *S. cerevisiae* (AY395693), *C. glabrata* (HM366440), *C. albicans* (D88815), *C. dubliniensis* (GQ342611), *C. tropicalis* (EU676168), *C. parapsilosis* (EU221325), *C. orthopsilosis* (EU350513), *Meyerozyma guilliermondii* (HQ288127), *Issatchenkia orientalis* (EF426563), *Yarrowia lipolytica* (AF198090), *Emericella nidulans* (U51272) y *A. fumigatus* (XM746025).

Para la reacción de PCR se utilizó el enzima Platinun™ Superfi™ DNA Polymerase, una polimerasa de alta fidelidad y con corrección de copia, y los cebadores degenerados FKS_HS1_Fdeg y FKS_HS1_Rdeg. Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, con las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 98°C durante 30 s, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 10 s, anillamiento a 51°C durante 10 s y extensión a 72°C durante 30 s, y un paso de extensión final a 72°C durante 5 min.

Los amplicones obtenidos se purificaron y se secuenciaron tal y como se detalla en los apartados 3.3.3.3.1 y 3.3.3.3.2 de este capítulo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Aislamientos en muestras orales

Se estudiaron 291 muestras orales procedentes de 260 pacientes que acudieron a una clínica privada en Bilbao durante 26 meses (abril 2010-mayo 2012). La mediana de edad de la población fue de 47 años, con un rango de edad comprendido entre 12 y 92 años. Ciento cincuenta y siete pacientes (53,95%) eran mujeres, con una mediana igual a la de toda la población, un rango de edad de entre 12 y 86 años. Por otro lado, 134 pacientes (46,05%) fueron hombres, con una mediana igual a la de toda la población y un rango de entre 14 y 92 años.

De las 291 muestras analizadas, 161 (55,3%) fueron negativas para especies fúngicas al no apreciarse crecimiento alguno en los medios de cultivo inoculados. El grupo con crecimiento positivo estaba constituido por 130 muestras (44,67%), y se realizaron 161 aislamientos fúngicos pertenecientes a los géneros *Candida*, *Saccharomyces* y *Aspergillus*. *Candida albicans* fue la especie prevalente, con 112 aislamientos (69,57%), seguida de *Candida glabrata* (11,18%) y *Candida parapsilosis* (9,94%). El 10% restante de los aislamientos pertenecían a las especies fúngicas que se detallan en la siguiente tabla ([Tabla 1](#)).

No se encontraron diferencias significativas en el número de cepas aisladas con respecto al género. *Candida albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia en ambos grupos, con 56 aislamientos cada uno, seguida de *C. glabrata* en el grupo de las mujeres, y de *C. parapsilosis* en el grupo de los hombres.

En cuanto a la edad, se obtuvieron aislamientos en todos los grupos, siendo el grupo de mayor edad el que presentaba un mayor número de ellos en proporción al número de pacientes, 29 aislamientos de 17 pacientes. En la mayoría de los grupos la distribución de las especies fue similar a la de la población, siendo *C. albicans* la especie aislada con mayor frecuencia en todos ellos. Destacar que, en el grupo de mayor edad, las especies de *Candida* no-*Candida albicans* (NCA) suponían el 51,72% de todos los aislamientos, con 15 aislamientos frente a 14 aislamientos de *C. albicans*.

Tabla 1. Aislamientos fúngicos en base a la edad y el género de los pacientes.

PACIENTES		DISTRIBUCIÓN ESPECIES (%) ¹									
		Especies de <i>Candida</i> NCA									
		N (%)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. rugosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. fumigatus</i>
TOTAL	291	161	112 (69,59)	18 (11,18)	16 (9,93)	8 (4,96)	2 (1,24)	2 (1,24)	1 (0,62)	1 (0,62)	1 (0,62)
Mujeres	157	87 (54,03)	56 (64,36)	13 (14,94)	9 (10,35)	5 (5,75%)	2 (2,3)	2 (2,3)	-	-	-
Hombres	134	74 (45,97)	56 (75,68)	5 (6,76)	7 (9,46)	3 (4,05)	-	-	1 (1,35)	1 (1,35)	1 (1,35)
EDAD											
<20	14	5	4 (80)	-	1 (20)	-	-	-	-	-	-
21-30	44	16	13 (81,25)	-	1 (6,25)	1 (6,25)	-	-	-	-	1 (6,25)
31-40	40	18	17 (94,44)	1 (5,56)	-	-	-	-	-	-	-
41-50	65	32	18 (56,25)	7 (21,87)	5 (15,63)	2 (6,25)	-	-	-	-	-
51-60	51	17	12 (70,59)	-	2 (11,76)	3 (17,65)	-	-	-	-	-
61-70	21	14	10 (71,43)	1 (7,14)	2 (14,29)	1 (7,14)	-	-	-	-	-
71-80	17	13	9 (69,23)	2 (15,39)	1 (7,69)	-	1 (7,69)	-	-	-	-
>80	17	29	14 (48,28)	7 (24,14)	2 (6,89)	1 (3,45)	1 (3,45)	2 (6,89)	1 (3,45)	1 (3,45)	-
ND	22	17	15	-	2	-	-	-	-	-	-

¹porcentaje calculado con respecto al total de aislamientos (N), tercera columna. NCA: Especies de *Candida* No-*C. albicans*. ND: No Datos.

Se observó colonización mixta en las muestras de 26 pacientes (Tabla 2), con una mediana y media de edad de 70 y 65,19 años, respectivamente, y un rango de 24 a 88 años. De las 26 muestras, en 22 había colonización por 2 especies distintas, en 3 muestras 3 especies distintas y una última muestra en la cual se identificaron 4 especies de *Candida*. La asociación de especies más común fue la de *C. albicans* con *C. glabrata*.

Tabla 2. Frecuencia de los aislamientos mixtos.

ESPECIES	N (%)
<i>C. albicans-C. glabrata</i>	11 (42,31)
<i>C. albicans-C. parapsilosis</i>	6 (23,08)
<i>C. albicans-C. guilliermondii</i>	3 (11,54)
<i>C. albicans-S. cerevisiae</i>	1 (3,85)
<i>C. parapsilosis-C. guilliermondii</i>	1 (3,85)
<i>C. albicans-C. glabrata-C. dubliniensis</i>	1 (3,85)
<i>C. albicans-C. glabrata-C. tropicalis</i>	1 (3,85)
<i>C. albicans-C. parapsilosis-C. rugosa</i>	1 (3,85)
<i>C. albicans-C. glabrata-C. tropicalis-C. dubliniensis</i>	1 (3,85)

De las 26 muestras mixtas, en 25 *C. albicans* era una de las especies aisladas, *C. parapsilosis-C. guilliermondii* supuso la única excepción. Cabe mencionar que la muestra con colonización mixta con las especies *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* y la muestra con 4 especies distintas, se obtuvieron de una misma paciente perteneciente al grupo de mayor edad. Ambas muestras se tomaron con un año de diferencia, observándose crecimiento con un número elevado de unidades formadoras de colonia (UFC) en ambas ocasiones.

4.2 Aislamientos de muestras vulvovaginales

Durante el periodo del estudio, a lo largo de 30 meses (febrero 2013-julio 2015), se analizaron 128 muestras de exudado vaginal procedentes de 114 mujeres que acudieron a la consulta de matronas del Centro de Salud de Bombero-Etxaniz de Bilbao con signos de vulvovaginitis candidiásica (VVC). La mediana de edad de la población estudiada fue de 32 años, con un rango entre 17-57 años. Ochenta y cuatro de ellas (65,63%) dieron positivo en el cultivo de *Candida* y fueron diagnosticadas de vulvovaginitis candidiásica aguda (VVC) o recurrente (VVCR). Las mujeres con cultivo

Resultados

positivo presentaron una mediana de edad menor que la de la población total, 30 años con un rango entre 17-51 años.

4.2.1. Análisis de factores de riesgo de VVC/VVCR

En lo referente a los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de VVC o VVCR, los datos aparecen recogidos en la [tabla 3](#).

Tabla 3. Factores de riesgo de la vulvovaginitis candidiásica aguda (VVC) y recurrente (VVCR).

Factores predisponentes	Mujeres (N)	No-VVC (%)	VVC (%)	VALOR P	VVCR (%) ¹
Embarazo	54	8 (14,82)	46 (85,18)	0,0001	3 (6,52)
Anticonceptivos hormonales ^a	17	6 (35,3)	11 (64,7)	0,87	2 (18,18)
Tratamiento con antibióticos ^b	25	8 (32)	17 (68)	0,85	4 (23,53)
Pareja con candidiasis	4	1 (25)	3 (75)	0,7	0
Procesos alérgicos ^c	20	7 (35)	13 (65)	0,88	4 (30,77)
Diabetes	3	2 (66,66)	1 (33,33)	-	0
Otros ^d	9	6 (66,67)	3 (33,33)	0,078	0
Tratamiento previo con azoles	17	4 (23,53)	13 (76,47)	0,006	3 (23,08)

^aorales/vaginales; ^btratamiento en el último mes; ^cRinitis alérgica, asma, sinusitis; ^dhipotiroidismo, quimioterapia, chagas, virus papiloma humano, fibromialgia. ¹porcentaje calculado con respecto al total de mujeres con VVC, cuarta columna.

Cincuenta y cuatro de las mujeres que acudieron a la consulta de las matronas estaban embarazadas, y de ellas en 46 casos (85,18%) se obtuvo una muestra positiva para *Candida*. El embarazo está considerado como un importante factor de riesgo (Goncalves et al., 2016), y resultó estar estadísticamente ligado al desarrollo de VVC (p 0,0001).

Por el contrario, no se observó asociación estadísticamente significativa con otros factores de riesgo descritos en la literatura. El 64,7% de las mujeres que hacía uso de los anticonceptivos hormonales, el 68% de las que habían tomado antibiótico durante el mes anterior a la toma de la muestra y el 65% de las mujeres con alguna alteración alérgica dio positivo en el cultivo de *Candida*, sin embargo, no se observó una asociación estadísticamente significativa con ninguno de estos factores de riesgo.

4.2.2. Identificación de los aislamientos vulvovaginales mediante cultivo. Distribución de especies de *Candida*

En este estudio se realizaron un total de 85 aislamientos ([Tabla 4](#)), la mayoría de ellos, 80 (94,11%), fueron identificados como *C. albicans*. En lo referente a especies NCA se obtuvieron 2 aislamientos de *C. parapsilosis* (2,35%), 2 aislamientos de *C. glabrata* (2,35%), uno de las cuales se obtuvo en un cultivo mixto junto con *C. albicans*, y un único aislamiento de *C. tropicalis* (1,2%).

Tabla 4. Distribución de los aislamientos de *Candida* en muestras vulvovaginales en relación con el embarazo y grupos de edad.

PACIENTES	N	DISTRIBUCIÓN ESPECIES (%) ¹				
		N (%)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	Especies NCA	
					<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
TOTAL	128	85	80 (94,11)	2 (2,35)	2 (2,35)	1 (1,19)
Embarazadas	54	46 (54,12)	44 (95,65)	1 (2,175)	-	1 (2,175)
No-embarazadas	74	39 (45,88)	36 (92,3)	1 (2,57)	2 (5,13)	-
EDAD						
<20	7	3	3 (100)	-	-	-
21-30	48	37	35 (94,6)	-	1 (2,7)	1 (2,7)
31-40	51	34	31 (91,18)	2 (5,88)	1 (2,94)	-
41-51	13	7	7 (100)	-	-	-
>51	4	1	1 (100)	-	-	-

ND: No Datos
 1. Porcentaje calculado en base al total de 85 aislamientos, tercera columna. NCA: Especies de *Candida* No-*C. albicans*. ND: No Datos

Candida albicans fue la especie prevalente tanto en mujeres embarazadas (95,65%) como no-embarazadas (92,1%). Con respecto a la edad, tampoco se observó un cambio en la frecuencia de distribución de las especies, siendo *C. albicans* la especie prevalente en los distintos grupos de edad. Cabe destacar que el 83,53% de los aislamientos (71) se obtuvieron de mujeres en un rango de edad comprendido entre los 21 y 40 años, que era el grupo más numeroso, con 99 mujeres.

4.2.2.1. Identificación de los aislamientos vulvovaginales en el laboratorio de referencia

Los resultados obtenidos en este trabajo se pudieron comparar con los obtenidos en el laboratorio de referencia del Centro de Salud ([Tabla 5](#)). La concordancia entre ambos centros fue del 83,6%, sin embargo, en 13 ocasiones los resultados no fueron

Resultados

concordantes, y en 8 ocasiones no se pudo conseguir el resultado del laboratorio de referencia.

Cabe destacar el caso de la paciente BE-24, cuyo aislamiento se identificó como *C. tropicalis* en el laboratorio de la UPV/EHU, y *C. albicans* en el laboratorio de referencia. No obstante, en el historial de la paciente constaban aislamientos previos de *C. tropicalis* y de *C. glabrata* en los dos meses anteriores a la participación en nuestro estudio.

Tabla 5. Aislamientos con resultados discrepantes entre el laboratorio de la UPV/EHU y el laboratorio de referencia.

Aislamiento	UPV/EHU		Lab. referencia
	Especie	UFC	Especie
BE-017	<i>C. albicans</i>	182	Neg
BE-022	<i>C. albicans</i>	9	Neg
BE-047	<i>C. albicans</i>	5	Neg
BE-118	<i>C. albicans</i>	1	Neg
BE-025	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-026	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-028	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-040	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-047	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-077	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-091	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-102	Neg	-	<i>C. albicans</i>
BE-024	<i>C. tropicalis</i>	10 ⁴	<i>C. albicans</i>

UFC: recuento de Unidades Formadoras de Colonia.

4.3. Identificación de especies de *Candida* mediante PCR a tiempo real (qPCR)

De acuerdo con lo descrito por otros autores, la región de ADN que codifica el complejo del ARN ribosómico (ARNr) resulta ser una región de referencia universal para la identificación de distintas especies de hongos (Khot et al., 2009; Zhang et al., 2016).

4.3.1. Estudio de la región del ARN ribosómico (ARNr) para el diseño de qPCR específicas. Diseño de cebadores

La región del ADNr contiene secuencias conservadas comunes a todos los hongos, que suponen una zona adecuada para el diseño de cebadores comunes a distintas especies, y regiones espaciadoras internas (ITS1 e ITS2) altamente variables, que suponen a su

vez una opción ideal para el diseño de sondas específicas de especie ([Figura 1](#)). La pareja de cebadores diseñada en este estudio, DiamolF y DiamolR ([Tabla 6](#)), se localiza en los genes 18S y 5.8S, respectivamente, y dentro del producto de amplificación generado se encuentra la zona de divergencia ITS1 utilizada para el posterior diseño de sondas de hidrólisis específicas para cada una de las 6 especies de *Candida* más frecuentes en las muestras estudiadas.



Figura 1. Representación esquemática del ARN ribosómico (ARNr) fúngico. Las flechas verdes indican la zona de hibridación de la pareja de cebadores DiamolF y DiamolR en los genes 18S y 5.8S, respectivamente.

Tabla 6. Cebadores empleados para la qPCR.

CEBADORES	GEN	SECUENCIA 5'→3'	T _m (C°)
Diamol-F	18S	TAG GTG AAC CTG CGG AAG GA	58.1
Diamol-R	5.8S	TCG CTG CGT TCT TCA TCG AT	56.9

Por otro lado, con el fin de conseguir la mayor eficacia posible en la reacción de amplificación el tamaño óptimo de los amplicones de la PCR a tiempo real debe oscilar entre 50 y 150 pb. La zona elegida se ajustaba a esta premisa ya que la región ITS1 de *C. albicans* tiene una longitud de ~139 pb, la de *C. parapsilosis* una longitud de ~149 pb, la de *C. guilliermondii* una longitud de ~169 pb, la de *C. tropicalis* una longitud de ~149 pb y la de *C. krusei* una longitud de ~103 pb. Sin embargo, la región ITS1 de *C. glabrata* tiene una longitud de ~403 pb, por lo que con el fin de generar un amplicón del tamaño recomendado se diseñó un cebador específico, DiamolRglab, dentro de la región ITS1. En la [figura 2](#) se muestran las secuencias alineadas de la región 18S-ITS1-5.8S de estas especies, indicando la localización de los cebadores seleccionados.

Resultados



Figura 2. Alineamiento múltiple de las secuencias 18S-ITS1-5.8S obtenido mediante el programa MUSCLE para las especies: *C. glabrata*, *Pichia guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. albicans*. Zonas en las que se sitúan los cebadores DiamolF, y DiamolR (recuadros azules), DiamolRglab (recuadro verde) y zona de divergencia entre secuencias utilizada para el diseño de las sondas de hidrólisis específicas para la discriminación entre las 6 especies de *Candida* (recuadro rosa).

Para comprobar el correcto funcionamiento de la pareja de cebadores DiamolF y DiamolR, se realizó una PCR utilizando 20 ng de ADN de cada una de las 6 especies de *Candida*. En la [figura 3](#) se muestran los productos de amplificación del tamaño esperado para cada una de las especies.

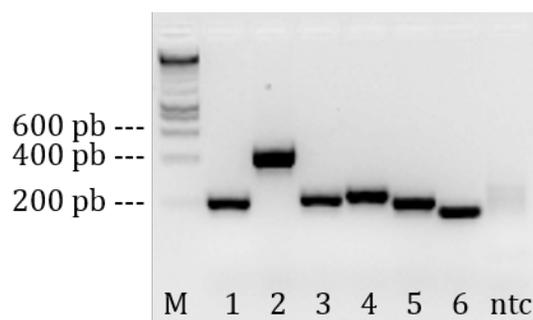


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1,8% de amplificaciones realizadas con la pareja de cebadores DiamolF-DiamolR utilizando ADN extraído a partir de: 1, *C. albicans* NCPF 3153; 2, *C. glabrata* NCPF 3203; 3, *C. parapsilosis* NCPF 3104; 4, *C. guilliermondii* NCPF 3099; 5, *C. tropicalis* NCPF 3111; 6, *C. krusei* ATCC 6258; NTC: *non-template control* (control negativo); M: Marcador de tamaño molecular HyperLadder I (Bioline); pb: pares de bases.

Para confirmar si se trataba de la diana seleccionada, los productos de secuenciación obtenidos con la pareja de cebadores DiamolF-DiamolR se clonaron en el vector TA Cloning™ (Invitrogen, EEUU). La secuencia de todos los fragmentos mostró en todos los casos coincidencia con las secuencias esperadas según la base de datos de Nucleotide de NCBI.

4.3.2. Diseño de sondas para la detección de especies de *Candida*

Dentro de la región de discrepancia entre las diferentes especies estudiadas amplificada por la pareja de cebadores DiamolF-DiamolR, se diseñaron 11 sondas de hidrólisis para detectar y discriminar específicamente *C. albicans* (Calb y Calb2), *C. glabrata* (Cgla), *C. parapsilosis* (Cpar2 y Cpar3), *C. guilliermondii* (Cgui3 y Cgui4), *C. tropicalis* (Ctro y Ctro2) y *C. krusei* (Ckru y Ckru2) ([Tabla 7](#)), utilizando el programa Primer Express. Se comprobó, por un lado, que todas las secuencias depositadas en la base de datos de Nucleotide para una misma especie contuvieran la secuencia de la sonda correspondiente y, por otro lado, mediante el algoritmo bioinformático BLAST,

Resultados

se comprobó la especificidad de las secuencias de las sondas. De este modo, se obtuvo un resultado positivo de homología únicamente con la especie correspondiente. Finalmente, las sondas diseñadas se marcaron con distintos fluoróforos para posibilitar su detección conjunta en una reacción de qPCR multiplex.

Tabla 7. Sondas de hidrólisis.

DIANA	SONDA	ESPECIFICIDAD	SECUENCIA 5'→3' y FLUORÓFOROS
ITS1	Calb	<i>C. albicans</i>	FAM -CGG TGG GCC CAG CCT GCC- BHQ1
	Calb2	<i>C. albicans</i>	FAM -ATC AA[+C] TTG TCA CA[+C] [+C]AG A-ZNA4- BHQ1
	Cpar2	<i>C. parapsilosis</i>	JOE -AGG CC[+]C CAT A[+T]A GAA GG[+C] CTA- BHQ1
	Cpar3	<i>C. parapsilosis</i>	HEX -TGG CAG GCC CCA TAT AGA AGG CCT AC - BHQ1
	Cgla	<i>C. glabrata</i>	FAM -ATT TCT CCT GCC TGC GCT TAA GTG CG- BHQ1
	Cgui3	<i>C. guilliermondii</i>	JOE -AA[+C] CTA [+T]CT [+C]TA [+G]GC [+C]AA A
	Cgui4	<i>C. guilliermondii</i>	HEX -CAG CGC TTA ACT GCG CGG CGA- BHQ1
	Ctro	<i>C. tropicalis</i>	HEX -CGG TAG GAT TGC TCC CGC CA- BHQ1
	Ctro2	<i>C. tropicalis</i>	HEX -CGG TAG GAT TGC TCC CGC CAC C- BHQ1
	Ckru	<i>C. krusei</i>	FAM -TTT AGG TGT TGT TGT TTT CGT TCC GCT C- BHQ1
Ckru2	<i>C. krusei</i>	FAM -CTA CAC TGC GTG AGC GGA ACG AAA AC- BHQ1	

4.3.3. Desarrollo de un protocolo de qPCR para la detección de especies de *Candida*

El rendimiento de la qPCR se evaluó utilizando ADN extraído a partir de las cepas de referencia de las distintas especies de *Candida* y sus correspondientes sondas. En la [figura 4](#) se muestran los resultados con las 6 sondas seleccionadas por su mejor rendimiento: Calb, Cpar3, Cgla, Cgui4, Ctro2 y Ckru2.

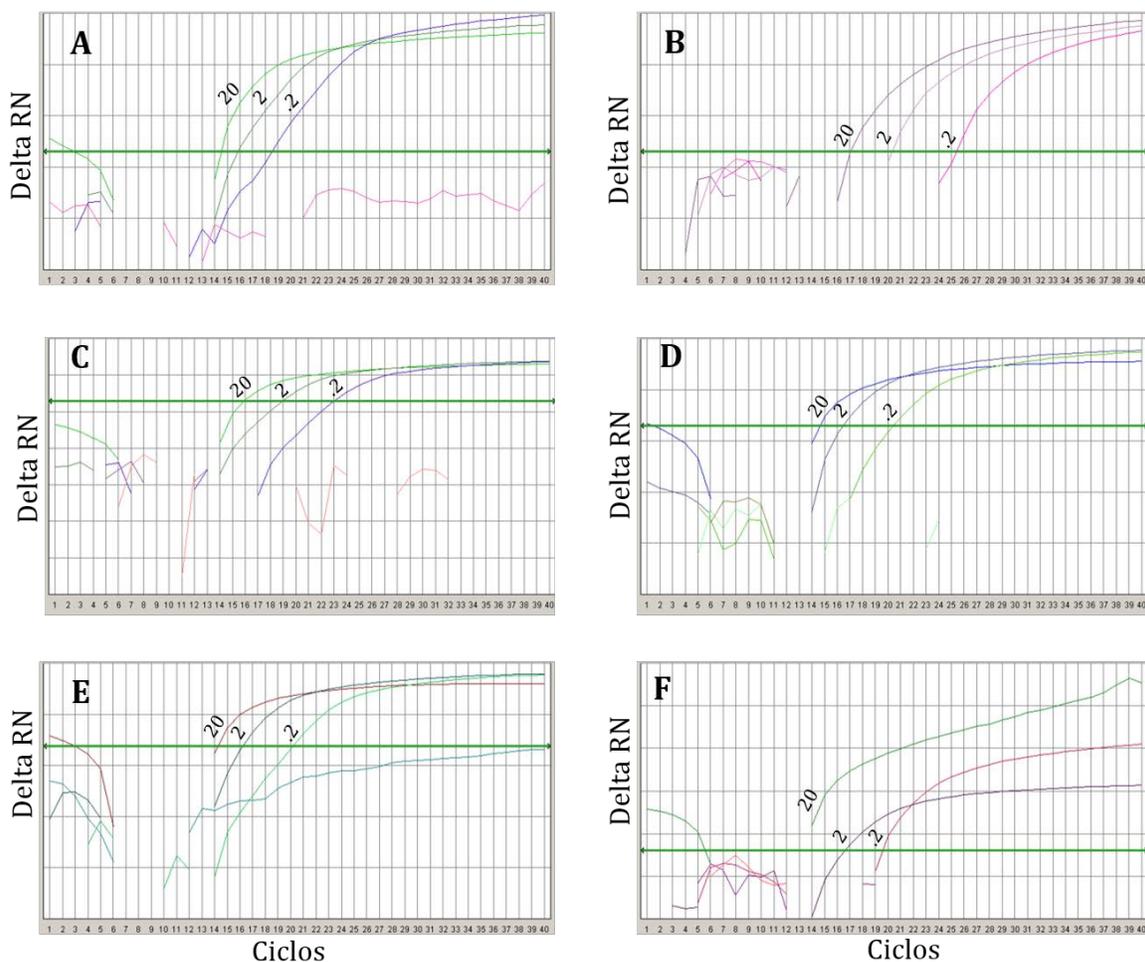


Figura 4. Representación logarítmica de la fluorescencia detectada frente al número de ciclos. A) Sonda Calb y ADN de *C. albicans* NCPF 3153, B) Sonda Cgla y ADN de *C. glabrata* NCPF 3203, C) Sonda Cpar3 y ADN de *C. parapsilosis* NCPF 3104, D) Sonda Cgui4 y ADN de *C. guilliermondii* NCPF 3099, E) Sonda Ctro2 y ADN de *C. tropicalis* NCPF 3099, F) Sonda Ckru2 y ADN de *C. krusei*. Se utilizaron 3 cantidades de ADN molde, 20 ng, 2 ng y 0,2 ng, en cada reacción y agua como control negativo.

4.3.3.1. Especificidad de las reacciones de qPCR

Para comprobar la especificidad del método desarrollado, se ensayó cada una de las sondas de forma independiente en una reacción de qPCR simple, utilizando con cada sonda el ADN de su especie correspondiente más ADN de las 5 especies restantes. De esta manera, la especie *C. albicans* mostró resultado positivo con la sonda Calb con valores del ciclo umbral (Ct) medios de 14,26 para 20 ng de ADN molde, no detectándose fluorescencia en las 5 especies de *Candida* restantes. En la [tabla 8](#) se

Resultados

puede observar que el resultado fue similar para las otras 5 especies de *Candida* y sus respectivas sondas, y con valores Ct en el mismo rango.

Tabla 8. Valor medio del ciclo umbral de detección (Ct) y desviación estándar (DE) con las sondas Calb, Cgla, Cpar3, Cgui4, Ctro2, y Ckru2 aplicadas a muestras con 20 ng de ADN de las 6 especies de *Candida*.

ESPECIE	SONDA (Ct ± DE)					
	Calb	Cgla	Cpar3	Cgui4	Ctro2	Ckru2
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	14,26 ± 0,056	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> NCPF 3203	-	13,34 ± 0,056	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> NCPF 3104	-	-	14,4 ± 0,106	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> NCPF 3099	-	-	-	14,33 ± 0,891	-	-
<i>C. tropicalis</i> NCPF 3111	-	-	-	-	14,31 ± 0,993	-
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	-	-	-	-	13,64 ± 0,007

ATCC: American Type Culture Collection; NCPF: National Collection of Pathogenic Fungi.. (-) No detección.

También se ensayó la especificidad de la qPCR diseñada en este trabajo con una colección de microorganismos presentes en la microbiota humana, y con ADN humano (Promega, EEUU) (Tabla 9). El resultado fue negativo para todas las especies con la excepción de la sonda Cgla, para la cual se obtuvo un resultado positivo con la muestra de *S. cerevisiae*, aunque con un valor Ct más elevado (Ct 18,73 10 ng de ADN).

Tabla 9. Valores del ciclo umbral de detección (Ct) con las sondas Calb, Cgla, Cpar3, Cgui4, Ctro2 y Ckru2 aplicadas a muestras de 20 ng de ADN obtenidos de una colección de microorganismos y a 10 ng de ADN humano.

ESPECIE	CEPAS	SONDAS (Ct)					
		Calb	Cgla	Cpar3	Cgui4	Ctro2	Ckru2
OTRAS LEVADURAS							
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1678	-	18,73	-	-	-	-
<i>Saprochaete capitata</i>	IHEM 5666	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lipolytica</i>	UPV 12-097	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CECT 11016	-	-	-	-	-	-
OTROS HONGOS							
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af-293	-	-	-	-	-	-
<i>Lomentospora prolificans</i>	ATCC 64913	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 90113	-	-	-	-	-	-
BACTERIAS							
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 435	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CECT 985	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus viridans</i>	CECT 804	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CECT 993	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	CECT 434	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 144	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 108	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	CECT 4168	-	-	-	-	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018	-	-	-	-	-	-
ADN HUMANO							
Human Genomic DNA (Promega)	G304A	-	-	-	-	-	-

ATCC: American Type Culture Collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; IHEM: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms; NCPF: National Collection of Pathogenic Fungi; UPV: University of the Basque Country (UPV/EHU). (-) No detección.

Finalmente, se comprobó la especificidad de las sondas Calb, Cgla y Cpar3 con los complejos de especies crípticas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. La sonda Cpar3, diseñada para la detección de la especie *C. parapsilosis*, dio resultados negativos cuando se probó con las especies crípticas *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* ([Tabla 10](#)).

Resultados

Tabla 10. Valor medio del ciclo de umbral de detección (Ct) y desviación estándar (DE) para las especies crípticas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* con sus sondas respectivas Calb, Cgla y Cpar3.

ESPECIE	SONDAS (Ct ± DE)				
	Calb	Cgla	Cpar3	Calb2	Cgla2
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	14,66 ± 0,021	-	-	14,21 ± 0,007	-
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3949	17,28 ± 0,024	-	-	-	-
<i>C. africana</i> ATCC MYA 2669	15,49 ± 0,25	-	-	15,61 ± 0,31	-
<i>C. glabrata</i> NCPF 3203	-	13,36 ± 0,0022	-	-	12,92 ± 0,004
<i>C. nivariensis</i> CBS 9989	-	14,85 ± 0,042	-	-	18,23 ± 7,05
<i>C. bracarensis</i> NCYC 3133	-	18,78 ± 0,2	-	-	18,35 ± 1,28
<i>C. parapsilosis</i> NCPF 3104	-	-	15,27 ± 0,27	-	-
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96141	-	-	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96144	-	-	-	-	-

ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; NCPF: National Collection of Pathogenic Fungi; NCYC: National Collection of Yeast Cultures. Se utilizó una cantidad de 20 ng de ADN genómico como molde en cada reacción.

Por el contrario, se observaron reacciones cruzadas con las sondas Calb y Cgla cuando se probaron con las especies crípticas de *C. albicans* (*Candida dubliniensis* y *Candida africana*), y de *C. glabrata* (*Candida nivariensis* y *Candida bracarensis*), respectivamente. Ambas sondas dieron señal con todas las especies, aunque los valores de Ct obtenidos para las especies crípticas para la misma cantidad de ADN molde eran siempre superiores a los observados para *C. albicans* y *C. glabrata*.

Se diseñaron nuevas sondas para la detección específica de *C. albicans* y *C. glabrata*, Calb2 y Cgla2, respectivamente, y se comprobó nuevamente la especificidad de ambas con los complejos de especies crípticas. Cgla2 emitió señal con todas las especies del complejo de *C. glabrata*, en este también con valores de Ct más elevados para la misma cantidad de ADN. Por otro lado, Calb2 dio resultados negativos con distintas cepas de *C. dubliniensis*, aunque sí emitió señal con *C. africana*.

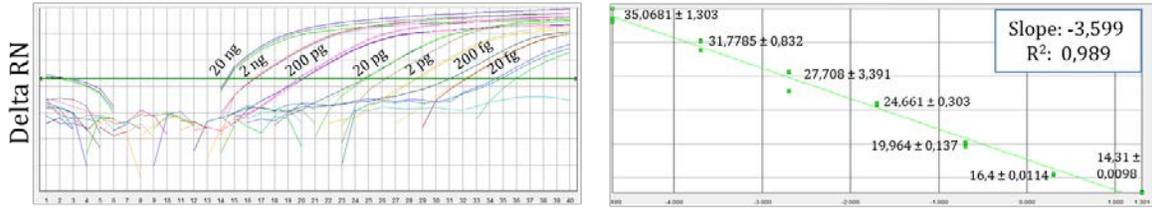
4.3.3.2. Determinación del límite de detección de la qPCR

Para determinar la eficiencia, límite de detección de ADN y reproducibilidad de la qPCR diseñada para la discriminación de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*,

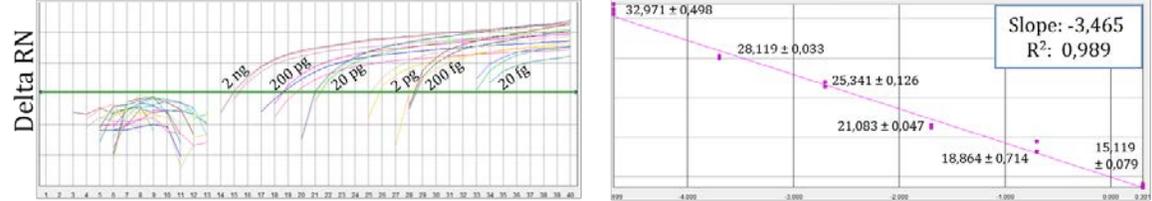
C. guilliermondii, *C. tropicalis* y *C. krusei*, se realizaron tres ensayos independientes usando ADN extraído de las cepas *C. albicans* NCPF 3153, *C. glabrata* NCPF 3203, *C. parapsilosis* NCPF 3104, *C. guilliermondii* NCPF 3099, *C. tropicalis* NCPF 3111 y *C. krusei* ATCC 6258. Cada recta de regresión se obtuvo utilizando 7 concentraciones cubriendo un rango desde 20 fg hasta 20 ng de ADN genómico, con tres réplicas cada uno de ellos. Los resultados mostraron un límite de detección de 20 fg de ADN genómico para las seis sondas ensayadas ([Figura 5](#)).

Resultados

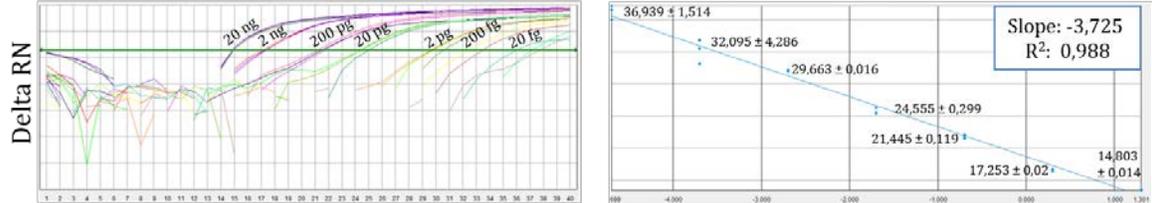
C. albicans (Calb)



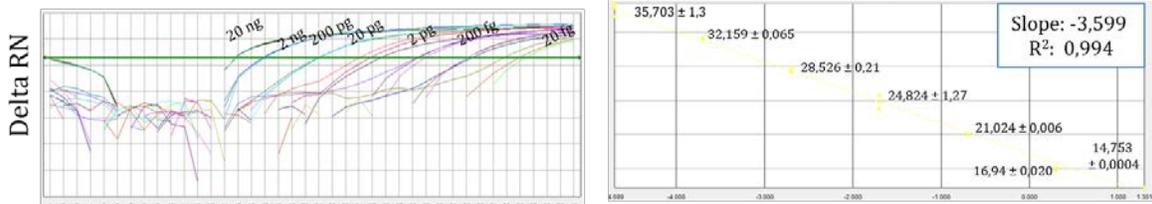
C. glabrata (Cgla)



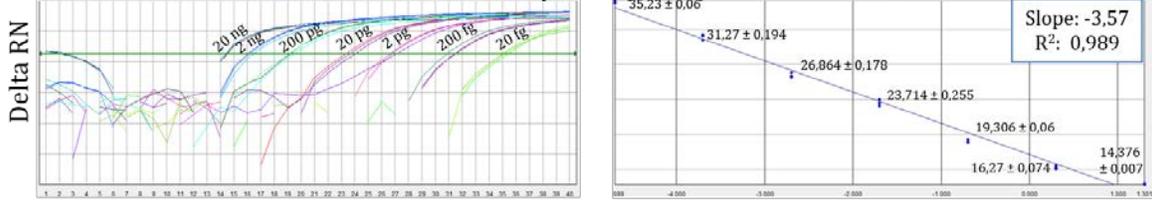
C. parapsilosis (Cpar3)



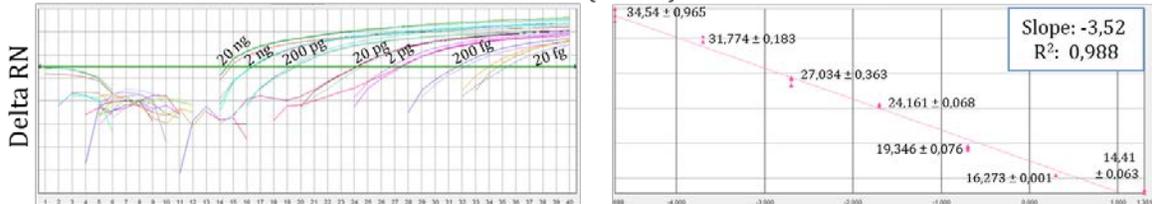
C. guilliermondii (Cgui4)



C. tropicalis (Ctro2)



C. krusei (Ckru2)



Ciclos

Log concentración inicial ADN

Figura 5. Resultados de la prueba de qPCR con distintas cantidades de ADN genómico (rango de 20 fg a 20 ng) de las distintas especies de *Candida*, con sus sondas correspondientes. Panel izquierdo: representación logarítmica de la fluorescencia detectada frente al número de ciclos. Panel derecho: representación del ciclo umbral de detección (Ct) frente al logaritmo de la concentración inicial de ADN genómico. Se muestra la recta de regresión, el coeficiente de regresión (R^2), la pendiente (Slope) y los valores medios de Ct \pm DE obtenidos de 3 réplicas independientes.

4.3.3.3. Desarrollo de un protocolo de qPCR multiplex para la detección simultánea de especies de Candida

Una vez comprobada la especificidad y el límite de detección de las sondas Calb, Cgla, Cpar3, Cgui4, Ctro2 y Ckru2 por separado, se procedió al desarrollo de una qPCR multiplex, en la cual se pudieran detectar distintas especies de *Candida* en una única reacción. Debido a que el equipo de PCR a tiempo real empleado en este trabajo posee únicamente 3 canales para la detección de fluoróforos, las sondas tuvieron que combinarse de dos en dos y se dejó el último canal libre para la referencia pasiva (ROX) Tras comprobar *in silico* con el programa Oligo Analyzer de IDT la formación de heterodímeros se decidió realizar las combinaciones de sondas del siguiente modo: Calb-Cpar3, para la detección conjunta de las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*; Cgla-Cgui4, para la detección conjunta de las especies *C. glabrata* y *C. guilliermondii*; y finalmente Ctro2-Ckru2, para la detección conjunta de las especies *C. tropicalis* y *C. krusei*.

En la [figura 6](#) se muestran los resultados obtenidos para la qPCR multiplex con las tres combinaciones de sondas. Cada una de las sondas diseñadas fue capaz de detectar específicamente su diana, sin mostrar reacción cruzada. Además, se observó que en las condiciones de qPCR multiplex ensayadas el Ct de cada una de las especies no aumentaba con respecto al Ct obtenido en las reacciones individuales descritas anteriormente.

Resultados

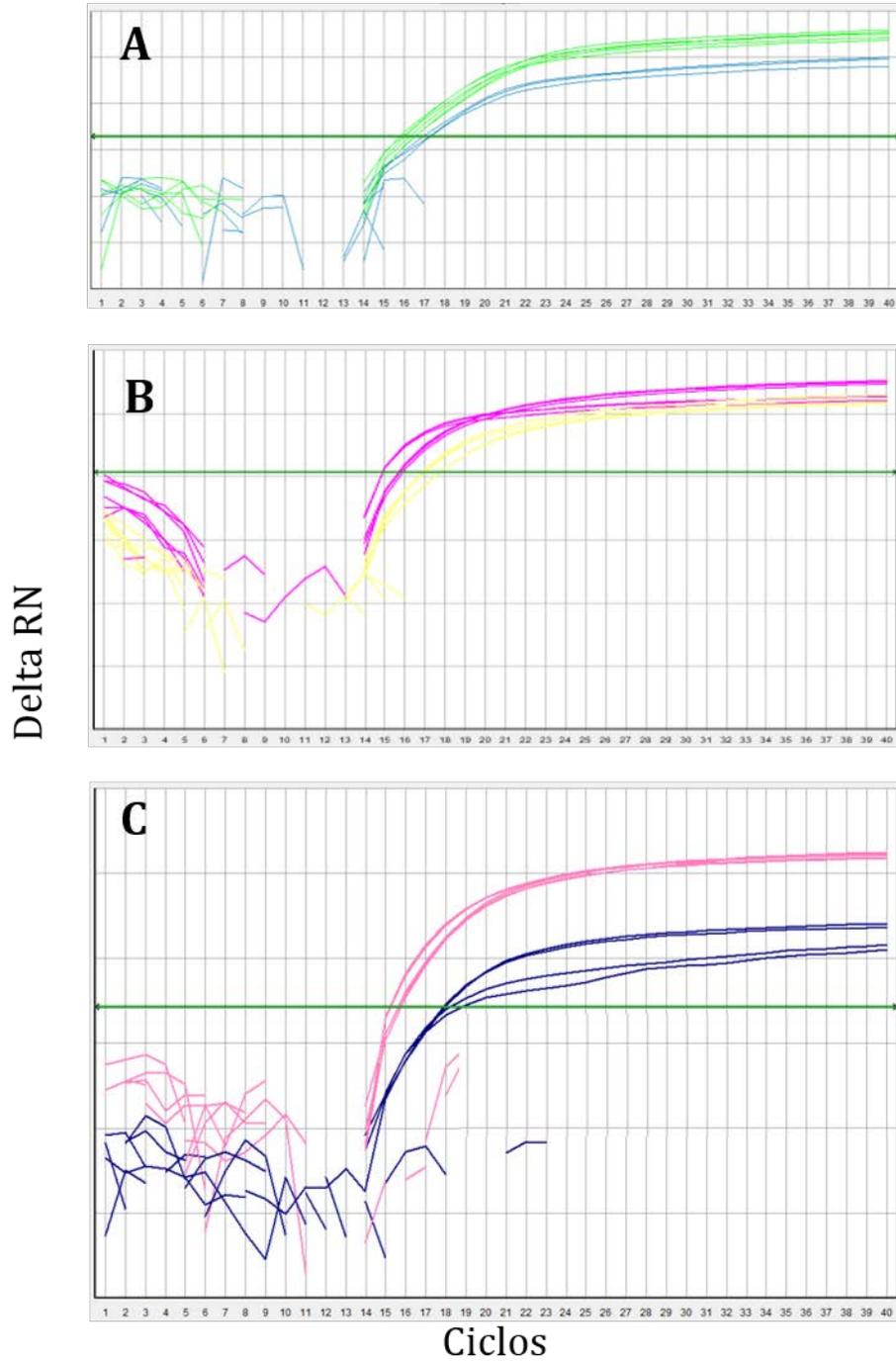


Figura 6. Resultados de la qPCR multiplex con las siguientes combinaciones de sondas; A: Calb (en verde) y Cpar3 (en azul) para la detección conjunta de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, respectivamente; B: Cgla (en fucsia) y Cgui4 (en amarillo) para la detección conjunta de *C. glabrata* y *C. guilliermondii*, respectivamente y C: Ctro2 (en azul oscuro) y Ckru2 (en rosa) para la detección conjunta de *C. tropicalis* y *C. krusei*, respectivamente.

4.3.3.4. Diseño del control interno de amplificación para el ensayo de qPCR

Como control interno (CI) de la qPCR multiplex se diseñó una secuencia de ADN aleatoria, de una longitud de 127 nucleótidos, con un extremo 5' compuesto por los nucleótidos del cebador Diamol-F, y un extremo 3' compuesto por los nucleótidos correspondientes a la secuencia reversa complementaria del cebador Diamol-R ([Tabla 11](#)). Asimismo, se diseñó una sonda para la detección específica del CI, Diamol-ICP, la cual se marcó con el fluoróforo ROX con el fin de poderlo combinar, en una misma reacción de PCR, con cualquiera de las combinaciones Calb-Cpar3, Cgla-Cgui4 o Ctro2-Ckru2, marcadas con los fluoróforos FAM y HEX.

Tabla 11. Secuencias del Control Interno (CI) de amplificación y de la sonda de hidrólisis que hibrida con el CI.

NOMBRE		SECUENCIA 5'→3'
CONTROL INTERNO	Diamol-ampli-ICP	TAG GTG AAC CTG CGG AAG GAT CGA AAC GTG CGA CGC TCC GAG CAT GAT CAC TAT GTC CTA ATC CCA TAT ATT ATT CAC TGT GTA CTA GCC CTT CTT GGT TCT CGC ATC GAT G
SONDA	Diamol-ICP	ROX-AAC GTG CGA CGT TCC GAG CA-BHQ2

Se determinó el límite de detección del CI de la misma forma que se realizó con las sondas diseñadas para discriminar las especies de *Candida*. Se obtuvo una recta de regresión a partir de 6 cantidades de CI, cubriendo un rango desde 0,1 fmoles hasta 10 pmoles. Los resultados mostraron un límite de detección de 10 fmoles ([figura 7](#)). Finalmente se seleccionó una cantidad de 1 pmol de CI para ser añadida en cada ensayo de qPCR multiplex, pudiendo detectarse tras 33 ciclos de amplificación.

Resultados

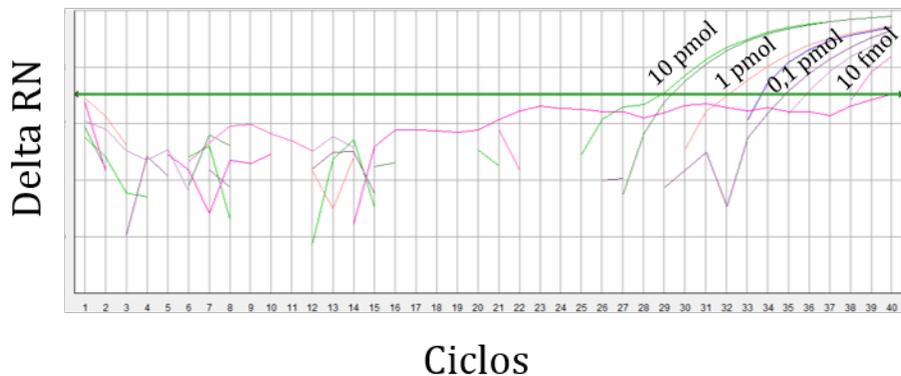


Figura 7. Resultados de qPCR utilizando diluciones seriadas del Control Interno (CI), desde 0,1 fmoles hasta 10 pmoles, y la sonda Diamol-ICP marcada con ROX para el cálculo del límite de detección del CI.

Una vez determinada la cantidad de CI para ser añadida en cada ensayo de qPCR, se procedió a incorporarla en cada una de las tres combinaciones de sondas detalladas en el apartado anterior de resultados, con 1 pmol de CI y 0,3 μ M de sonda Diamol-ICP marcada con ROX. En estas condiciones, sin embargo, no conseguimos detectar el CI cuando éste era combinado con las parejas de sondas diseñadas para la detección de especies de *Candida*. Asimismo, dado que la sonda Diamol-ICP estaba marcada con ROX, no se pudo emplear este fluoróforo como referencia pasiva de la reacción, y ello impedía determinar el Ct de las otras sondas (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió emplear el ROX de la Taq polimerasa como referencia pasiva, excluyendo el CI y la sonda Diamol-ICP de las reacciones de qPCR, eliminando así la posibilidad de detectar la posible inhibición de la PCR por parte de los componentes de la muestra y los falsos negativos en todos los pocillos de la qPCR.

4.3.4. Aplicación de la qPCR multiplex a muestras vulvovaginales humanas

Una vez puesta a punto la técnica de qPCR, se procedió a su aplicación con las 128 muestras de origen vulvovaginal estudiadas en el apartado 4.2. El ADN molde para las reacciones de qPCR se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4.2 de materiales y métodos. Para comprobar la reproducibilidad de la qPCR multiplex diseñada en este trabajo se realizaron 3 ensayos independientes, sin embargo, en este

caso, no se pudieron usar réplicas debido al volumen limitado de muestra vulvovaginal del que se disponía, de este modo se empleó una única muestra en cada uno de los 3 ensayos.

Junto con las muestras BE de origen vulvovaginal se realizaron controles de extracción de ADN, a estos controles también se les aplicó la qPCR con el fin de controlar posibles contaminaciones y detectar de esta forma los falsos positivos de esta técnica molecular.

Los resultados obtenidos se muestran en la [tabla 12](#).

En 122 (95,3%) de las 128 muestras analizadas la qPCR fue positiva para *C. albicans*. Del mismo modo, en 3 muestras (2,34%) la qPCR fue positiva para *C. glabrata*, en 2 muestras (1,56%) para *C. parapsilosis*, otras 2 muestras (1,56%) para *C. guilliermondii*, 3 muestras (2,34%) para *C. tropicalis* y finalmente 4 muestras (3,12%) para *C. krusei*. Se estableció, para las 6 especies, un punto de corte para el Ct de 30 ciclos, de modo que las muestras con resultados de Ct superiores a este valor se consideraron negativas. Esta determinación se tomó en base al elevado porcentaje de muestras, 96,09%, que resultaron positivas para *C. albicans* en la qPCR, probablemente debido a que el origen anatómico de las muestras es un nicho no-estéril. Los resultados obtenidos mediante qPCR se compararon con aquellos obtenidos mediante cultivo, tanto en nuestro laboratorio como en el de referencia ([Tabla 12](#)), ya que hubo alguna discrepancia entre ambos laboratorios tal y como se ha reportado en la [tabla 5](#) de resultados. Asimismo, se obtuvieron valores de Ct iguales o superiores a 30 para algunos de los controles negativos de extracción. Por último, cabe destacar que no hubo contaminación en las reacciones de PCR, ya que no se detectó señal con ninguna de las sondas, en ninguno de los controles negativos de PCR (NTC-*Non template Control*) (datos no mostrados).

Resultados

Tabla 12. Resultados obtenidos mediante qPCR multiplex aplicada a muestras vulvovaginales. Comparación con los resultados obtenidos por cultivo.

MUESTRAS	qPCR (Ct ± DE) ^a						CULTIVO*	
	Calb	Cgla	Cpar3	Cgui4	Ctro2	Ckru2	ESPECIE	UFC
BE-01	20,15 (1,05)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	4000
BE-02	30,33 (0,001)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-03	19,07 (0,28)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	4000
BE-04	27,21 (0,49)	25,3 (0,66)	-	32,2 (6,64)	-	-	Neg	-
BE-05	22,71 (0,237)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	80
BE-06	26,58 (0,34)	-	-	34,6 (15,7)	-	30,5 (0,1)	Neg	-
BE-07	21,33 (0,36)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2400
BE-08	17,07 (0,242)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2400
BE-09	30,36 (0,57)	-	35,7 (1,43)	-	-	-	Neg	-
BE-10	18,21 (0,85)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-11	32,92 (3,08)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-12	20,98 (0,27)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	600
BE-13	20,86 (0,48)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-14	23,4 (1,025)	-	-	-	-	32,7 (0,05)	<i>C. albicans</i>	300
BE-15	35,06 (11,58)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-16	23,37 (0,36)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-17	27,07 (0,27)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	182
BE-18	19,8 (0,28)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	780
BE-19	20,06 (0,57)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1356
BE-20	19,04 (0,71)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2280
BE-21	20,44 (0,27)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	9200
BE-22	29,04 (1,76)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	9
BE-23	19,92 (0,08)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-24	20,85 (0,34)	-	-	-	23,7 (0,03)	-	<i>C. tropicalis</i>	10000
BE-25	20,95 (0,72)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2
BE-26	27,5 (0,82)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-27	21,63 (0,05)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	238
BE-28	21,33 (0,22)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-29	23,86 (0,28)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1574
BE-30	32,8 (0,14)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-31	31,52 (0,15)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-32	24,86 (0,14)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	5
BE-33	19,33 (0,17)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-34	30,17 (0,99)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-35	32,93 (0,01)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-36	20,87 (0,1)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-37	33,06 (0,65)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-38	33,94 (0,51)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-39	35,36 (14,25)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-40	22,17 (0,03)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-41	19,71 (0,3)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-42	17,57 (0,34)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-43	18,14 (0,36)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-44	25,5 (0,33)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	300
BE-45	22,14 (0,18)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-46	23,73 (0,33)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	85
BE-47	29,99 (0,95)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	5
BE-48	17,77 (0,02)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-49	25,23 (0,04)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	500
BE-50	21,18 (0,06)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-51	27,25 (0,19)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	443
BE-52	24,06 (0,66)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2400

Resultados

MUESTRAS	qPCR (Ct ± DE) ^a						CULTIVO*	
	Calb	Cgla	Cpar3	Cgui4	Ctro2	Ckru2	ESPECIE	UFC
BE-53	22,11 (0,27)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	800
BE-54	30,44 (2,48)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-55	33,58 (6,23)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-56	28,57 (0,007)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	238
BE-57	32,55 (0,95)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-58	28,05 (0,41)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	257
BE-59	18,58 (0,4)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-60	-	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-61	32,81 (2,02)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-62	29,39 (0,45)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	130
BE-63	26,75 (0,21)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	78
BE-64	25,81 (0,05)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	338
BE-65	32,7 (0,64)	-	-	-	-	35,06 (1,27)	Neg	-
BE-66	23,04 (0,19)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	170
BE-67	-	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-68	34,97 (0,19)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-69	28,45 (0,31)	-	-	-	-	-	<i>C. parapsilosis</i>	2
BE-70	22,96 (0,16)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	150
BE-71	22,21 (0,15)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	3500
BE-72	-	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-73	34,44 (2,33)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-74	31,2 (0,42)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-75	31,9 (1,11)	-	-	-	34,8 (2,77)	-	Neg	-
BE-76	35,1 (9,02)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-77	32,15 (0,12)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-78	35,32 (2,8)	-	-	-	35,8 (2,03)	-	Neg	-
BE-79	22,15 (0,02)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2400
BE-80	20,1 (0,04)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	4800
BE-81	35,22 (3,25)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-82	-	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-83	35 (7,39)	-	-	-	-	-	<i>C. parapsilosis</i>	1
BE-84	-	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-85	30,76 (0,1)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	130
BE-86	34,88 (7,73)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-87	30,1 (0,19)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1
BE-88	20,28 (0,05)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	8000
BE-89	33,91 (6,05)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-90	19,07 (0,08)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	3000
BE-91	31,83 (0,17)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-92	33,51 (9,67)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-93	27,44 (0,19)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10
BE-94	20,05 (0,02)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	5000
BE-95	23,09 (0,33)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1360
BE-96	18,81 (0,05)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1600
BE-97	20,83 (0,36)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	8000
BE-98	15,27 (0,04)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-99	28,71 (0,03)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-100	31,05 (0,97)	-	-	-	-	32,57 (0,09)	Neg	-
BE-101	33,71 (5,06)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-102	30,47 (0,3)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	0 [§]
BE-103	20,4 (0,02)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	5000
BE-104	26,63 (0,11)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	400
BE-105	24,44 (0,13)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	3000
BE-106	30,13 (0,03)	-	-	-	-	-	Neg	-

Resultados

MUESTRAS	qPCR (Ct ± DE) ^a						CULTIVO*	
	Calb	Cgla	Cpar3	Cgui4	Ctro2	Ckru2	ESPECIE	UFC
BE-107	28,36 (0,31)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	34
BE-108	20,17 (0,02)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	8000
BE-109	24,08 (0,38)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	25
BE-110	36,25 (0,47)	-	34,2 (1,04)	-	-	-	Neg	-
BE-111	21,41 (0,07)	18,8 (0,72)	-	-	-	-	<i>C. albicans</i> / <i>C. glabrata</i>	5000/ 5000
BE-112	29,12 (0,11)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	250
BE-113	20,6 (0,2)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	8000
BE-114	19,16 (0,03)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	8000
BE-115	20,93 (0,06)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10000
BE-116	36,17 (3,28)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-117	-	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-118	31,9 (1,21)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1
BE-119	22 (0,31)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	ND
BE-120	25,16 (0,17)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	2800
BE-121	36,34 (4,64)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-122	32,8 (1,61)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-123	33,44 (3,1)	28,8 (1,15)	-	-	-	-	<i>C. glabrata</i>	1200
BE-124	33,77 (0,31)	-	-	-	-	-	Neg	-
BE-125	33,17 (1,83)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	10
BE-126	16,2 (0,24)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	1200
BE-127	23,34 (0,07)	-	-	-	-	-	<i>C. albicans</i>	212
BE-128	32,95 (0,75)	-	-	-	-	-	Neg	-

^aResultados obtenidos mediante qPCR con las sondas Calb, Cgla, Cpar3, Cgui4, Ctro2 y Ckru2. Valores medios del ciclo de umbral de detección (Ct) y la desviación estándar (DE) de las tres repeticiones. (-) No detección.

*Resultados combinados de la UPV/EHU y del laboratorio de referencia. UFC: Unidades Formadoras de Colonias. § resultado positivo en el laboratorio de referencia, aunque sin especificar UFCs. Los valores de Ct positivos aparecen en azul y los valores de Ct negativos están resaltados en rojo.

Basándonos en este nuevo punto de corte se construyó una tabla de contingencia de 2 x 2 ([Tabla 13](#)) para la sonda Calb, con el fin de determinar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la qPCR multiplex diseñada en este estudio como prueba diagnóstica.

Tabla 13. Tabla de contingencia de 2 x 2 para la qPCR multiplex con la sonda Calb, empleando como punto de corte un valor de Ct de 30 ciclos.

	Cultivo positivo	Cultivo negativo	Total
PCR positiva	73	5	78
PCR negativa	7	43	50
Total	80	48	128

En base a la tabla 14 se determinó que la sensibilidad de la qPCR multiplex con la sonda Calb diseñada para detectar *C. albicans* era de 91,25%, la especificidad de 89,6%, el valor predictivo positivo de 93,59% y el valor predictivo negativo de 86%.

No se calcularon los valores como prueba diagnóstica para el resto de las sondas, debido al escaso número de muestras positivas para las otras 5 especies de *Candida*. La sonda Cgla fue capaz de detectar las dos muestras positivas para *C. glabrata* y se obtuvo un falso positivo con ella. Se detectó la única muestra de *C. tropicalis* con la sonda Ctro2, pero la sonda Cpar3 no fue capaz de detectar las dos muestras positivas para *C. parapsilosis*, además no se obtuvo ningún resultado falso positivo con ninguna de ellas. Por último, no se obtuvo ningún aislamiento de *C. guilliermondii* ni de *C. krusei* de origen vulvovaginal, y no se detectó ninguna reacción positiva con las sondas Cgui4 y Ckru2, por lo que no se obtuvieron resultados falsos positivos para ninguna de estas dos sondas.

4.4. Sensibilidad a antifúngicos

4.4.1. Aislamientos vulvovaginales

En total se obtuvieron 79 aislamientos de *Candida* en muestras vulvovaginales, sin embargo, dos de ellas perdieron viabilidad y no se consiguió revivirlas.

4.4.1.1. CLSI M27-A3

El estudio de sensibilidad a antifúngicos mediante la técnica de microdilución en caldo basado en el protocolo M27-A3 del CLSI para fluconazol y clotrimazol, reveló que ambos antifúngicos eran muy activos in vitro frente a los 72 aislamientos de *C. albicans* como se recoge en la [tabla 14](#).

Tabla 14. Sensibilidad in vitro a clotrimazol y fluconazol de 72 aislamientos vulvovaginales de *C. albicans* de este estudio. Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresados en µg/ml.

	24h				48h			
	MG	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	MG	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango
CLOTRIMAZOL	0,042	0,03	0,06	0,03-0,25	0,1	0,12	0,25	0,03-0,5
FLUCONAZOL	0,17	0,12	0,25	0,12-4	0,33	0,25	1	0,12-8

MG: Media Geométrica (µg/ml).

Tal y como se observa en la tabla, la media geométrica de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del clotrimazol a las 24h, 0,042 µg/ml, fue menor que la del fluconazol, 0,17 µg/ml. Cabe destacar que 45 de los 72 aislamientos (62,5%) de

Resultados

C. albicans mostraron una CMI de clotrimazol de 0,03 µg/ml, mientras que 53 aislamientos (73,6%) presentaron una CMI de fluconazol de 0,12 µg/ml.

De acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI en su documento M27-S4, la gran mayoría de los aislamientos de *C. albicans*, 70 (97,2%), se clasificaron como sensibles para fluconazol (CMI₅₀ ≤2 µg/ml), los otros 2 aislamientos (BE-113 y BE-114) (2,8%) fueron clasificados como sensibles dosis dependiente (SDD) (CMI 4 µg/ml). En cuanto al clotrimazol, basándonos en los puntos de corte propuestos por Pelletier y colaboradores (Pelletier et al., 2000), todos los aislamientos se consideraron sensibles al presentar valores de CMI inferiores a 0,5 µg/ml. Los dos aislamientos clasificados como SDD para el fluconazol, BE-113 y BE-114, presentaron una CMI de 0,25 µg/ml para clotrimazol, un valor notablemente superior al resto de los aislamientos, hasta 8 veces superior para la mayoría de los casos, y se consideraron aislamientos con sensibilidad intermedia a clotrimazol.

Por otro lado, los 5 aislamientos de especies no-*C. albicans* mostraron unos valores de CMI considerablemente mayores a los observados en los aislamientos de *C. albicans* (Tabla 15). Aunque, todos ellos fueron clasificados como sensibles para ambos antifúngicos a las 24h, a las 48h el aislamiento de *C. tropicalis* y los dos aislamientos de *C. glabrata* mostraron resistencia a ambos azoles.

Tabla 15. Sensibilidad in vitro a clotrimazol y fluconazol de los 5 aislamientos vulvovaginales de especies no-*C. albicans* de este estudio. Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresados en µg/ml.

AISLAMIENTO	ESPECIE	CLOTRIMAZOL CMI ¹		FLUCONAZOL CMI	
		24h	48h	24h	48h
BE-24	<i>C. tropicalis</i>	0,12	2	0,5	64
BE-69	<i>C. parapsilosis</i>	0,06	0,25	0,12	0,5
BE-83	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	0,5	0,12	1
BE-111m	<i>C. glabrata</i>	0,25	1	4	8
BE-123	<i>C. glabrata</i>	0,12	0,5	2	4

¹Se emplearon los puntos de corte de *C. albicans* definidos por Pelletier y colaboradores (Pelletier et al., 2000) para clotrimazol. Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

4.4.1.2. Sensititre Yeast One®

A los dos aislamientos vulvovaginales de *C. albicans* que mostraron valores de CMI superiores al resto de los aislamientos, BE-113 y BE-114, se les realizó un ensayo con

el método comercial de dilución en caldo Sensititre YeastOne®, para evaluar la sensibilidad a otros antifúngicos, y en particular a otros azoles ([Tabla 16](#)).

Tabla 16. Sensibilidad in vitro a los antifúngicos de los aislamientos vulvovaginales de *C. albicans* BE-113 y BE-114, mediante el método Sensititre YeastOne®. Valores de CMI expresados en µg/ml.

ANTIFÚNGICOS	BE-113		BE-114	
	CMI 24h	CMI 48h	CMI 24h	CMI 48h
CSF	0,25	0,25	0,06	0,06
MFG	0,015	0,03	0,015	0,015
AFG	0,015	0,06	0,015	0,015
AMB	0,015	0,25	0,5	1
5FC	0,5	2	0,06	0,12
VRC	0,5	8	0,015	8
POS	8	8	0,015	8
ITC	16	16	0,03	16
FLC	4	256	0,25	256

CSF caspofungina, MFG micafungina, AFG anidulafungina, AMB anfotericina B, 5FC 5-fluorocitosina, VRC voriconazol, POS posaconazol, ITC itraconazol, FLC fluconazol. Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

Tanto las equinocandinas como la 5-fluorocitosina fueron muy activas in vitro contra estos dos aislamientos de *C. albicans*. En el caso de los azoles, el aislamiento BE-113 mostró resistencia a todos ellos a las 24h, mientras que en el aislamiento BE-114 la resistencia a todos los azoles sólo se mostró a las 48h. Estas dos cepas comparten algunas características, por un lado, ambas fueron aisladas de pacientes con signos claros de VVC, y el número de UFCs fue elevado en ambos casos (>8000). La cepa BE-114 además, fue aislada de una paciente con un largo historial de VVCR, dos meses después de participar en un ensayo clínico de una vacuna experimental frente a la candidiasis superficial.

Ambos aislamientos fueron seleccionados para la caracterización de los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* con el fin de determinar la posible presencia de mutaciones puntuales relacionadas con la resistencia a azoles.

4.4.2. Cepas de la colección de la UPV/EHU

Se seleccionaron 25 cepas de *C. albicans* de distintos orígenes, clasificadas como resistentes a azoles, y custodiadas en la colección del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y Enfermería de la UPV/EHU. Las características de estos aislamientos se detallan en las tablas 5, 6 y 7 del apartado 3.6 de materiales y métodos.

Por otro lado, se analizaron 2 cepas de *C. albicans* de referencia, ATCC 64124 y ATCC 64550, resistente a azoles y equinocandinas la primera, y a fluconazol, la segunda. Asimismo, se analizó la cepa de referencia SC5314, considerada como la cepa sensible de referencia, cuyo genoma está secuenciado.

4.4.2.1. CLSI M27-A3

En primer lugar, se verificó si las cepas catalogadas como resistentes a ciertos azoles, mantenían dicha resistencia tras su almacenamiento, para lo cual se realizó el método de microdilución en caldo M27-A3 del CLSI. Se probaron los dos mismo azoles que para los aislamientos vulvovaginales, clotrimazol y fluconazol, por duplicado. Los resultados obtenidos para las 46 cepas de *C. albicans* se recogen en la [tabla 17](#).

Según los puntos de corte establecidos para cada antifúngico, 34 aislamientos (74%) se clasificaron como sensibles para ambos azoles, aunque 8 de ellos mostraron resistencia a las 48h, cuatro a ambos azoles, tres únicamente a fluconazol y un último aislamiento sólo a clotrimazol. Siete aislamientos (15,21%) se clasificaron como resistentes (1 de ellos sensible dosis-dependiente) a fluconazol, 6 (26%) como resistentes a ambos y ninguno como resistente únicamente a clotrimazol.

Tabla 17. Sensibilidad in vitro a clotrimazol y fluconazol de aislamientos de *C. albicans* catalogados como resistentes a azoles de la colección de la UPV/EHU. Valores de CMI expresados en µg/ml.

CEPAS	CLOTTRIMAZOL CMI		FLUCONAZOL CMI		CEPAS	CLOTTRIMAZOL CMI		FLUCONAZOL CMI	
	24h	48h	24h	48h		24h	48h	24h	48h
06-114	[0,12-0,25]	[1-2]	[2-64]	64	16-086	0,12	0,25	1	2
06-116	0,03	0,06	[0,12-0,25]	0,5	16-087	0,03	0,03	0,12	0,25
06-100	0,03	[0,06-0,5]	0,15	0,5	16-088	0,03	0,03	0,12	0,25
10-166	0,03	0,03	0,12	0,12	16-089	0,03	0,06	4	4
10-168	[0,03-0,25]	0,25	[0,12-0,25]	64	16-090	0,03	0,03	0,12	0,12
10-169	0,03	0,06	[0,12-0,25]	0,25	16-091	0,03	0,06	64	64

10-170	0,06	0,5	[0,12-4]	64	16-092	0,5	1	64	64
10-171	0,06	[0,03-0,12]	[0,12-0,5]	0,12-1]	16-093	0,03	0,06	0,25	1
10-280	0,06	0,12	0,12-0,5	[0,5-1]	16-094	0,03	0,03	0,25	0,25
10-295	0,03	[0,06-0,5]	[0,12-0,25]	[0,25-1]	16-095	0,03	0,03	0,12	0,12
10-294	0,03	0,03	0,12	0,12	16-096	0,03	0,03	0,12	0,12
08-105	[0,03-0,06]	0,12	0,25	0,5	16-097	0,03	0,03	0,12	0,25
08-187	0,03	0,03	0,25	0,25	16-098	0,03	0,03	1	2
09-297	0,03	0,06	[0,12-0,25]	0,5	16-122	0,03	0,06	[2-4]	[16-32]
10-221	[0,12-0,25]	[0,12-0,25]	[0,12-0,25]	64	16-123	0,03	0,06	8	16
15-154	[0,12- 0,5]	[0,25-1]	[1- 64]	64	16-124	0,03	0,03	0,25	0,5
15-155	0,03	[0,03-0,06]	[0,12-0,25]	[0,25-0,5]	16-131	0,03	0,06	0,25	2
15-156	[0,03- 0,5]	[0,06-0,5]	[0,25- 64]	[0,5- 64]	16-132	0,12	0,25	0,5	64
15-157	[0,5-2]	[0,5-2]	16	64	16-133	0,12	0,5	0,5	64
15-159	0,03	0,03	2	64	16-134	0,25	1	64	64
15-161	0,03	[0,03-0,12]	[0,12-0,25]	[0,25-0,5]	16-135	0,03	0,12	1	32
15-176	[2-4]	[2-4]	[16-32]	64	16-136	0,03	0,03	0,25	0,25
15-178	0,03	0,03	0,12	0,12	16-138	1	1	64	64
15-179	0,03	0,03	[0,12-0,25]	[0,12-0,25]					

Los valores de CMI corresponden a la Media Geométrica, exceptuando los localizados entre corchetes que corresponden al rango de valores observados.

Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

4.4.2.2. Sensititre YeastOne®

Se realizó un ensayo de microdilución en caldo mediante el método comercial Sensititre YeastOne® a aquellas cepas que mostraron un perfil resistente mediante el método de microdilución en caldo M27-A3 del CLSI, con el fin de evaluar la sensibilidad a otros antifúngicos, y en particular a otros azoles. Se seleccionaron además cepas que habían dado resultados contradictorios en distintas repeticiones. Los resultados aparecen recogidos en la [tabla 18](#).

Tabla 18. Sensibilidad in vitro a los antifúngicos de los aislamientos de *C. albicans* catalogados como resistentes en la Colección de la UPV/EHU, mediante el método comercial Sensititre YeastOne. Valores de CMI expresados en µg/ml.

AISLAMIENTOS	06-114 CMI		06-100 CMI		10-168 CMI		10-170 CMI		10-171 CMI		10-295 CMI		10-221 CMI		15-154 CMI	
	24h	48h														
CSF	0,015	0,03	0,03	0,03	0,015	0,015	0,015	0,03	0,015	0,03	0,03	0,03	0,015	0,03	0,03	0,06
MFG	0,008	0,008	0,008	0,015	0,008	0,008	0,008	0,015	0,008	0,015	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,015
AFG	0,03	0,03	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,03	0,03	0,015	0,015
AMB	0,25	0,5	0,12	0,25	0,25	0,5	0,12	0,25	0,12	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
5FC	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
VRC	0,008	0,015	0,008	0,015	0,008	0,015	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,03	0,008	0,015	0,5	8
POS	0,015	0,015	0,03	0,03	0,015	0,015	0,008	0,015	0,015	0,03	0,015	0,03	0,015	0,03	8	8
ITC	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,03	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,06	16	16
FLC	0,25	0,5	0,5	1	0,25	0,5	0,12	0,25	0,12	0,5	0,12	0,5	0,25	0,5	32	256

CSF Caspofungina, MFG Micafungina, AFG Anidulafungina, AMB Anfotericina B, 5FC 5-Fluorocitosina, VRC Voriconazol, POS Posaconazol, ITC Itraconazol, FLC Fluconazol. Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

Tabla 18. (Continuación) Sensibilidad in vitro a los antifúngicos.

AISLAMIENTOS	15-156 CMI		15-157 CMI		15-159 CMI		15-176 CMI		16-091 CMI		16-122 CMI		16-123 CMI		16-132 CMI	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24 h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
CSF	0,03	0,03	0,015	0,06	0,06	0,12	0,03	0,06	0,015	0,06	0,12	0,25	0,12	0,12	0,03	0,06
MFG	0,015	0,015	0,008	0,015	0,008	0,008	0,015	0,015	0,008	0,015	0,015	0,03	0,015	0,03	0,015	0,015
AFG	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
AMB	0,12	0,25	0,12	0,5	0,12	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,12	0,5	0,5	1	0,25	0,5
5FC	0,06	0,12	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,25	0,12	0,5	0,06	0,5	0,12	0,25	2	64
VRC	0,008	8	0,008	0,015	0,06	1	1	1	0,5	1	0,5	1	1	2	0,015	0,06
POS	0,015	8	0,015	0,03	8	8	0,5	0,5	0,03	0,06	0,06	0,12	0,06	0,12	0,015	8
ITC	0,03	16	0,03	0,06	16	16	0,5	0,5	0,12	0,12	0,25	0,5	0,25	0,5	0,06	16
FLC	0,25	256	0,5	0,5	2	8	64	64	8	8	0,12	0,5	8	16	0,5	256

CSF Caspofungina, MFG Micafungina, AFG Anidulafungina, AMB Anfotericina B, 5FC 5-Fluorocitosina, VRC Voriconazol, POS Posaconazol, ITC Itraconazol, FLC Fluconazol. Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

Tabla 18. (Continuación) Sensibilidad in vitro a los antifúngicos.

AISLAMIENTOS	16-133 CMI		16-134 CMI		16-135 CMI		16-138 CMI	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
CSF	0,015	0,015	0,015	0,015	0,06	0,12	0,06	0,12
MFG	0,015	0,015	0,008	0,008	0,015	0,015	0,015	0,03
AFG	0,015	0,015	0,015	0,015	0,06	0,06	0,015	0,015
AMB	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	1
5FC	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12
VRC	0,008	0,015	0,008	0,03	0,015	0,03	8	8
POS	0,015	0,03	0,015	0,03	0,03	8	8	8
ITC	0,03	0,06	0,03	16	0,5	16	16	16
FLC	0,25	0,5	0,5	2	0,5	2	256	256

CSF Caspofungina, MFG Micafungina, AFG Anidulafungina, AMB Anfotericina B, 5FC 5-Fluorocitosina, VRC Voriconazol, POS Posaconazol, ITC Itraconazol, FLC Fluconazol. Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

Cabe destacar que únicamente 6 de los 20 aislamientos analizados mostraron un patrón resistente para alguno de los azoles a las 24 horas, mientras que 11 lo hicieron a las 48 horas, a pesar de que todos ellos habían sido catalogados anteriormente como resistentes a alguno de los compuestos azólicos.

De acuerdo con los puntos de corte establecidos, de los 6 aislamientos catalogados como resistentes a azoles, uno de ellos (16-091) fue clasificado como sensible dosis-dependiente a voriconazol y resistente a fluconazol; otro aislamiento (16-138) mostró resistencia a los 4 azoles; otros 2 aislamientos (15-176 y 15-154) mostraron resistencia a tres azoles, aunque no a los mismos; y los otros 2 aislamientos mostraron resistencia a dos azoles, a posaconazol e itraconazol (15-159) y a voriconazol y fluconazol (16-123). Los aislamientos 16-091 y 16-123 se consideraron de especial interés ya que se obtuvieron de la misma paciente, aunque en distintas fechas.

Las cepas que mostraron resistencia frente a alguno de los compuestos azólicos fueron seleccionadas para la caracterización de los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2*.

4.5. Análisis mediante secuenciación de mutaciones GOF de genes implicados en la resistencia a azoles

Los aislamientos clínicos que mostraron resistencia a azoles mediante los métodos de microdilución en caldo CLSI M27-A3 y Sensititre YeastOne10®, fueron seleccionados para el análisis de los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2*, para los cuales se han descrito mutaciones con efecto de ganancia de función (GOF-*Gain Of Function*) relacionadas con la resistencia a azoles.

La extracción de ADN y la amplificación de los tres genes se realizaron tal y como se detalla en los apartados 3.6.2., 3.6.3., 3.6.4. y 3.6.5. de materiales y métodos.

4.5.1. Diseño de cebadores

4.5.1.1. Cebadores para la amplificación del gen *ERG11*

Se han descrito más de 140 sustituciones de aminoácidos en Erg11 relacionadas con la resistencia a azoles, distribuidas por toda la proteína (Morio et al., 2010) desde el aminoácido 33 (Cernicka & Subik, 2006), hasta el 523 (Sanglard & Bille, 2002). Se diseñaron cebadores que pudiesen amplificar prácticamente en su totalidad la región codificante del gen *ERG11*. Para ello, se dividió el gen dos regiones solapadas: la parte del extremo 5' correspondiente a la región N terminal de la proteína codificada, y la parte del extremo 3', correspondiente a la región C terminal ([Figura 8](#)).

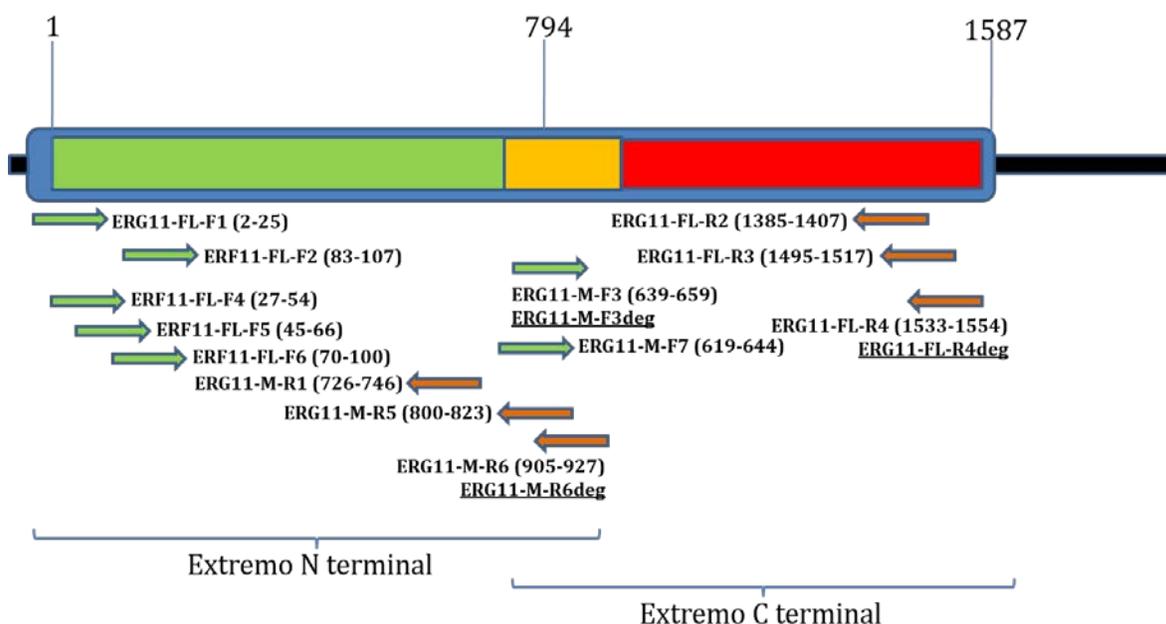


Figura 8. Esquema de las zonas de hibridación de los cebadores diseñados para la secuenciación de los fragmentos de interés del gen *ERG11*. Entre paréntesis, la posición donde hibrida cada uno de los cebadores con respecto al codón de inicio. Las regiones amplificadas aparecen resaltadas en verde y en rojo, y la región de solapamiento en naranja.

Con el fin de obtener amplificadores de mayor tamaño y con la mejor calidad de secuencia posible, y debido a la alta tasa de polimorfismos de este cromosoma (Magee, 2007), se diseñaron y probaron distintas combinaciones de cebadores ([Tabla 19](#) y [Tabla 20](#)).

Resultados

Tabla 19. Cebadores diseñados para la amplificación del extremo 5' del gen *ERG11*.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Localización respecto al ATG	Tm (°C)
ERG11_FL_F1	TGG CTA TTG TTG AAA CTG TCA TTG	2-25	54
ERG11_FL_F2	GGG TTC CAT TTG TTT ACA ACT TAG T	83-107	53,7
ERG11_FL_F4	TGG CAT TAA TTA TTT TTT GTC CCT TAG T	27-54	53,9
ERG11_FL_F5	GTC CCT TAG TGT TAC ACA ACA G	46-66	53,1
ERG11_FL_F6	AGT ATA TTA TTA GGG GTT CCA TTT GTT TAC A	70-100	54,6
ERG11_M_R1	GCA GCA TCA CGT CTC CAA TAA	746-726	55,3
ERG11_M_R5	CAC GAT TTG GAT CAA TAT CAC CAC	823-800	54,1
ERG11_M_R6	TTG ACC ACC CAT AAG AAT ACC AA	927-905	53,9

Tabla 20. Cebadores diseñados para la amplificación del extremo 3' del gen *ERG11*.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Localización respecto al ATG	Tm (°C)
ERG11_M_F3	TGA CCG TTC ATT TGC TCA ACT A	639-660	55,3
ERG11_M_F7	GAT GAA ATG AGA AGA ATT TTT GAC CG	619-644	54,1
ERG11_FL_R2	TCT ATG TCT ACC ACC ACC AAA TG	1407-1385	53,9
ERG11_FL_R3	CTA TAA TCA GGG TCA GGC ACT TT	1517-1495	54,5
ERG11_FL_R4	GAT TTC TGC TGG TTC AGT AGG T	1554-1533	53,2

4.5.1.2. Cebadores para la amplificación del gen *TAC1*

La estrategia para caracterizar este gen fue distinta; no se planteó la amplificación de toda la secuencia codificante (cds) debido a su longitud (2946 pb). Se amplificaron por tanto dos regiones no-solapantes (Figura 9.B): una desde el aminoácido 225 hasta el 461 y la otra desde el aminoácido 673 hasta el 980, por ser las regiones donde se localizaban las mutaciones con efecto de ganancia de función o GOF descritas en la literatura (Figura 10A)(A. Coste et al., 2006; A. T. Coste et al., 2004; A. T. Coste et al., 2009; Znaidi et al., 2007).

Del mismo modo que con *ERG11*, con el fin de obtener el amplificado de mayor tamaño y con la mejor calidad de secuencia posible y teniendo en cuenta la alta tasa de variabilidad del cromosoma 5 (Magee, 2007), se diseñaron y probaron distintas combinaciones de cebadores ([Tabla 21](#) y [Tabla 22](#)).

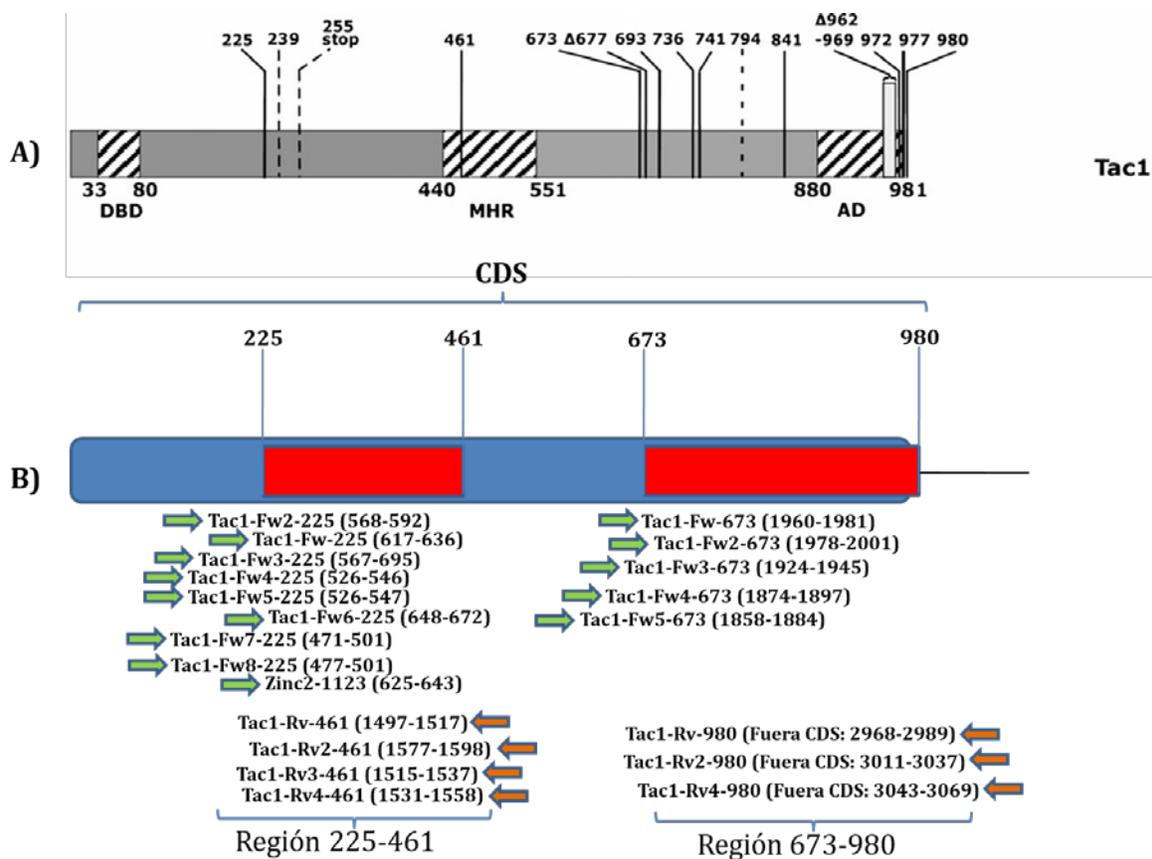


Figura 9. A) Esquema de las mutaciones GOF del factor de transcripción Tac1. Las posiciones de las mutaciones aparecen señaladas mediante barras. Las líneas discontinuas señalan mutaciones obtenidas por mutagénesis dirigida. Las líneas continuas señalan mutaciones detectadas en aislamientos clínicos. Los números se refieren a las posiciones de aminoácidos. DBD: *DNA Binding Domain*-Dominio de Unión al ADN; MHR: *Middle Homology Region*-Región Homóloga Central; AD: *Activation Domain*-Dominio de Activación (Imagen de Sanglard *et al.*, 2011). B) Esquema de las zonas de hibridación de los cebadores diseñados para la secuenciación de los fragmentos de interés del gen *TAC1*. Entre paréntesis, la posición donde hibrida cada uno de los cebadores con respecto al codón de inicio. Estos números entre paréntesis hacen referencia a posiciones de nucleótidos. Las regiones analizadas aparecen en rojo.

Resultados

Tabla 21. Cebadores diseñados para la amplificación del fragmento de *TAC1* entre los aminoácidos 225 y 461.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Localización respecto al ATG	Tm (°C)
Tac1_Fw_225	ACG CTA AGG ATG CCA ATG AA	617-636	54,6
Tac1_Fw2_225	GAT AGT GAA GAA CAA CAA ACT TCA C	568-592	52,4
Tac1_Fw3_225	TGA TAG TGA AGA ACA ACA AAC TTC ACA TA	567-595	54,9
Tac1_Fw4_225	CTA TCG CCC ACT CCT TCA GAA	526-546	52,4
Tac1_Fw5_225	CTA TCG CCC ACT CCT TCA GAA G	526-547	57
Tac1_Fw6_225	GAG AAA TTG GGA TGA ATT TGT TGG T	648-672	54,3
Tac1_Fw7_225	GAC ACA AGC AAT AAG AAA TAA CCA TTC CAA C	471-501	57
Tac1_Fw8_225	AGC AAT AAG AAA TAA CCA TTC CAA C	477-501	52,1
Zinc2-1123 ^(a)	GAT GCC AAC GAA TTA TTG A	625-643	48
Tac1_Rv_225	TTG ATT ACT GGA GGT TTA CCG	1517-1497	52,1
Tac1_Rv2_225	AAC AGT ATG GAC CAC TAT CAC C	1598-1577	54
Tac1_Rv3_225	TGG TAG TGA CAT CGT TGG TAT TG	1537-1515	54,7
Tac1_Rv4_225	GTA ATA AGT CTT CAT CAC TAT TGG TAG T	1558-1531	52,6

(a): Coste, 2009.

Tabla 22. Cebadores diseñados para la amplificación del fragmento de *TAC1* entre los aminoácidos 673 y 980.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Localización respecto al ATG	Tm (°C)
Tac1_Fw_673	CGA GAC ACG ATT CTT GCT ATG A	1960-1981	54,5
Tac1_Fw2_673	ATG AAA TTG ACT TTT TTC TCG CAT	1978-2001	52
Tac1_Fw3_673	ACC TCA GTT CAA GCA AGT ACT G	1924-1945	54,8
Tac1_Fw4_673	GTA TTT AGC AGA TGA GGC CAA AC	1874-1897	54
Tac1_Fw5_673	ATG TTT GAG TTG GCA ATG TAT TTA GCA	1858-1884	55,8
Tac1_Rv_980	ACA TTA TAC ATC GCT TTC ACC A	Fuera CDS: 2989-2968	52,1
Tac1_Rv2_980	CCT TTG ATA GGA AAA AAT ATA TGA AAC	Fuera CDS: 3037-3011	49,3
Tac1_Rv4_980	TTC ACA ACA ATT TTA CTC TCA AGA CAT	Fuera CDS: 3069-3043	53,5

CDS: Coding Sequence-región codificante.

Los cebadores Tac1_Rv_980, Tac1_Rv2_980 y Tac1_Rv4_980 se localizan fuera de la región codificante del gen (CDS), y se diseñaron a partir de una única secuencia, la correspondiente al “contig” Ctg19-10170 (número de acceso en Nucleotide: NW_139520), que se obtuvo como resultado en la secuenciación del genoma completo de la cepa de *C. albicans* SC5314 (Jones et al., 2004). Este “contig” corresponde a un fragmento de 100.418 pb del cromosoma 5 de *C. albicans*, donde está localizado el gen *TAC1*.

4.5.1.3. Cebadores para la amplificación del gen *UPC2*

Las mutaciones GOF descritas en el factor de transcripción Upc2 se localizan entre los aminoácidos 643 y 648 (Dunkel et al., 2008a; Heilmann et al., 2010; Hoot et al., 2011) (Figura 11A); con posterioridad se identificó otra mutación GOF en el aminoácido 642 (Flowers et al., 2012). Se diseñó una única pareja de cebadores con la cual se obtuvo un amplificado de 268 pb que contenía la región comprendida entre los aminoácidos 642 y 648 (Figura 10.B).

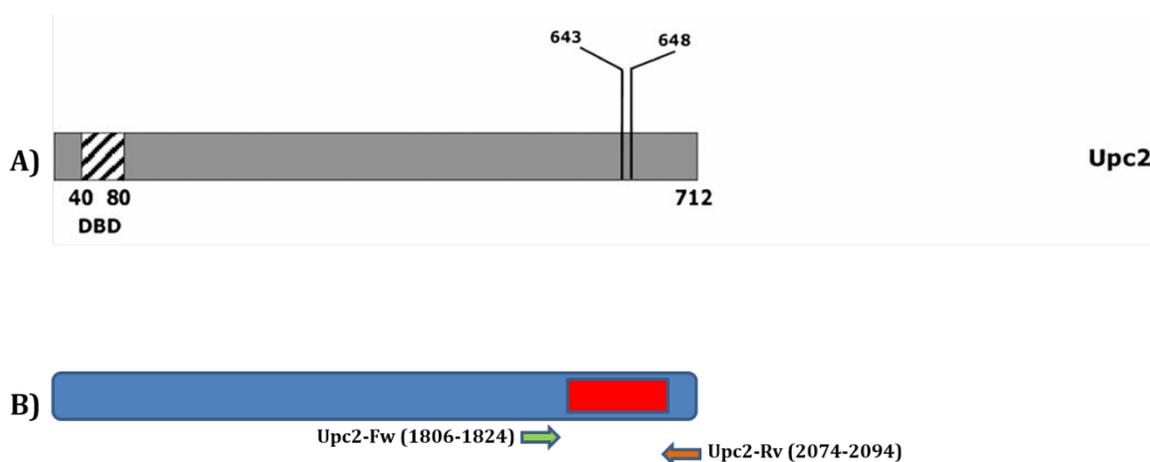


Figura 10. A) Esquema de las mutaciones GOF del factor de transcripción Upc2. Las posiciones de aminoácidos en las cuales se han descrito mutaciones aparecen señaladas con barras. DBD: *DNA Binding Domain*-Dominio de Unión al ADN (Imagen modificada de (Sanglard, 2011b)). B) Esquema de las zonas de hibridación de los cebadores diseñados para la secuenciación del fragmento de interés del gen *UPC2*. Entre paréntesis, la posición donde hibrida cada uno de los cebadores con respecto al codón de inicio. Estos números entre paréntesis hacen referencia a posiciones de nucleótidos. La región analizada aparece en rojo.

En este caso se diseñó una única pareja de cebadores, la cual se muestra en la [tabla 23](#).

Tabla 23. Cebadores diseñados para la amplificación del fragmento entre los aminoácidos 643 y 648 de *UPC2*.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Localización respecto ATG	Tm (°C)
Upc2_Fw	GGC CAT GCG GAT AAT GAG A	1806-1824	54,9
Upc2_Rv	CCA AGC GTC CTT ACC AGT AAT	2094-2074	54,6

4.5.2. Análisis de las secuencias de las cepas resistentes a azoles

Mediante la amplificación por PCR de las regiones seleccionadas para los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* se obtuvieron amplicones que mostraron correspondencia con el tamaño esperado ([Figura 11](#)): región 225-471 de *TAC1* ~875 pb (panel izquierdo, A),

Resultados

región 673-980 de *TAC1* ~1000 pb (panel izquierdo, B), extremo 5' de *ERG11* ~660 pb (panel central, A), extremo 3' de *ERG11* ~915 pb (panel central, B) y extremo 3' de *UPC2* ~288 pb (panel derecho, A):

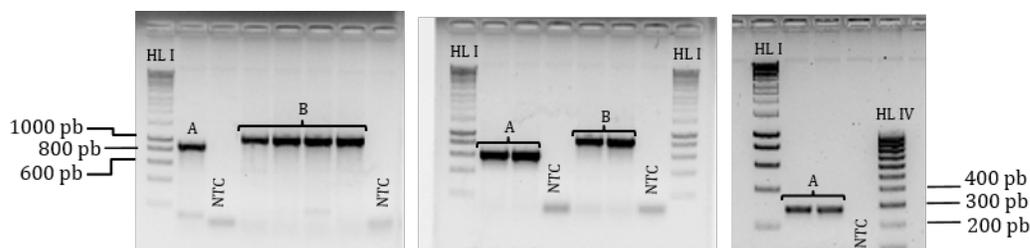


Figura 11. Productos de PCR con los cebadores diseñados para amplificar el extremo 5' de *ERG11* (panel izquierdo, A), el extremo 3' de *ERG11* (panel izquierdo, B), la región 225-461 de *TAC1* (panel central, A), la región 673-980 de *TAC1* (panel central, B) y el extremo 3' de *UPC2* (panel derecho). NTC: *Non-template control*, HL I: marcador de tamaño molecular Hyperladder I y HL IV: marcador de tamaño molecular Hyperladder IV.

Mediante el análisis de las secuencias de los amplicones usando el algoritmo de BLAST de NCBI se verificó que se estaba amplificando de manera específica el fragmento de ADN deseado, y se procedió a su análisis en busca de mutaciones que pudieran conferir resistencia a antifúngicos.

Se analizaron las secuencias de un total 26 aislamientos clínicos de *C. albicans*, clasificados en función de su CMI a azoles (Tabla 24): doce eran resistentes a uno o varios azoles, 11 eran sensibles a todos los azoles y los 3 restantes se clasificaron como indeterminados, ya que se obtuvieron resultados no concordantes entre repeticiones de ensayos, o bien entre las distintas pruebas de sensibilidad a antifúngicos realizadas. Además, se analizaron 3 cepas de referencia, ATCC 64550 y ATCC 64124 resistentes a azoles y la cepa sensible de referencia SC5314.

Tabla 24. Sensibilidad in vitro a los azoles mediante los métodos Sensititre YeastOne® y el protocolo M27-A3 del CLSI de los 26 aislamientos clínicos de *C. albicans* cuyas secuencias fueron analizadas. Valores de CMI expresados en µg/ml. Datos obtenidos a las 24h.

Clasificación [¶]	CEPAS	Sensititre YeastOne® (CMI)				CLSI M27-A3 (CMI) [§]	
		VRC	POS	ITC	FLC	CLT	FLC
R	BE-113	0,5	8	16	4	0,25	4
	BE-114	0,015	0,015	0,03	0,25	0,25	4
	15-154	0,5*	8	16	32	[0,12-0,5]	[1-64]
	15-156	0,008	0,015	0,03	0,25	[0,03-0,5]	[0,25-64]

	15-157	0,008	0,015	0,03	0,5	1	16
	15-159	0,06	8	16	2	0,03	2
	15-176	1	0,5	0,5	64	[2-4]	[16-32]
	16-091	0,5	0,03	0,12	8	0,03	64
	16-092	-	-	-	-	0,5	64
	16-123	1	0,06	0,25	8	0,03	8
	16-132	0,015	0,015	0,06	0,5	0,12	0,5
	16-138	8	8	16	256	1	64
I	06-100	0,008	0,03	0,03	0,5	0,03	0,15
	06-114	0,008	0,015	0,03	0,25	[0,12-0,25]	[2-64]
	10-171	0,008	0,015	0,03	0,12	0,06	0,24
S	06-116	-	-	-	-	0,03	[0,12-0,25]
	08-105	-	-	-	-	[0,03-0,06]	0,25
	10-166	-	-	-	-	0,03	0,12
	10-169	-	-	-	-	0,03	[0,12-0,25]
	10-280	-	-	-	-	0,06	[0,12-0,5]
	15-153	-	-	-	-	0,03	2
	15-160	-	-	-	-	0,03	0,25
	BE-AZ	-	-	-	-	0,03	0,12
	BE-32	-	-	-	-	0,03	0,12
	BE-47	0,015	0,008	0,03	0,5	0,03	0,12
BE-48	-	-	-	-	0,03	0,25	
R	ATCC 64550	0,5	0,5	0,25	32	2	16
R	ATCC 64124	8	1	16	256	-	-
S	SC5314	0,008	0,008	0,03	0,25	0,03	0,12

§Los valores de CMI corresponden a la Media Geométrica, exceptuando los localizados entre corchetes que corresponden al rango de valores observados.

Los valores de CMI considerados resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

¥ Cepas catalogadas como: R: resistentes; I: indeterminadas y S: sensibles.

4.5.2.1. Análisis de las secuencias de *ERG11*

El análisis de las secuencias del gen *ERG11* reveló un gran número de polimorfismos, sin embargo, no todos los cambios de base nucleotídica generaban sustitución en el aminoácido correspondiente (Figura 12). Se identificaron un total de 20 sustituciones no-sinónimas, de las que 7 se han descrito que confieren resistencia a azoles: A114S, Y132H, K143R, Y257H, G450E, R467K y Q474K (en negrita), mientras que 8 no estaban relacionadas con la resistencia (en negro). Asimismo, se identificaron 5 cambios no descritos hasta hora: S42L, D225N, P236H, F319L y Q479R (en rojo).

Resultados

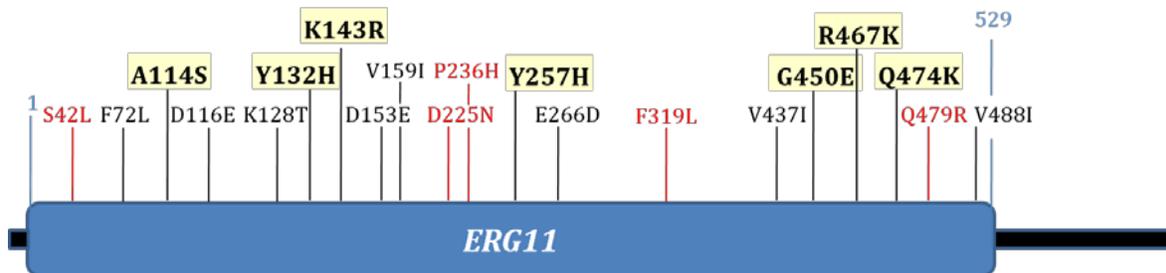


Figura 12. Esquema de las mutaciones no-sinónimas detectadas en el gen *ERG11* de *C. albicans*, en azul aparecen las posiciones de aminoácidos. En negrita resaltadas en amarillo aparecen las mutaciones relacionadas en la literatura con la resistencia a azoles. En rojo aparecen las mutaciones identificadas por primera vez en este trabajo y en negro las mutaciones no relacionadas con la resistencia.

En la [tabla 25](#) se detallan todas las mutaciones de Erg11p detectadas en este trabajo, en las cepas catalogadas como resistentes, sensibles o de resistencia intermedia frente a los azoles.

Tabla 25. Mutaciones encontradas en Erg11p en cepas de *C. albicans* clasificadas en función de su sensibilidad frente a los azoles.

CEPAS	Resistente	Mutaciones																			
		S42L	F72L	A114S	D116E	K128T	Y132H	K143R	D153E	V159I	D225N	P236H	Y257H	E266D	F319L	V347I	G450E	R467K	Q474K	Q479R	V488I
BE-113	C*-F*- I-P-V*			■								■									
BE-114	C*-F*																				
15-154	C-F-P- I-V*																				
15-156	C-F				■	■				■											■
15-157	C-F	■			■			■													
15-159	I-P																				
15-176	C-F- I*-P-V																				■
16-091	F-V*						■														■
16-092	C-F												■		■						■
16-123	F-I*-V						■							■							■
16-132					■	■															
16-138	C-F-P V-I												■								
ATCC	C-F- I*-P-			■	■										■						■

únicamente se detectaron en el grupo de cepas resistentes, lo que sugiere una posible participación en la resistencia a los azoles.

4.5.2.2. Análisis de las secuencias de *TAC1*

En el caso del gen *TAC1*, el factor de transcripción regulador de los genes *CDR* y localizado en el mismo cromosoma que *ERG11*, también se detectó una elevada tasa de variabilidad, identificándose una gran cantidad de polimorfismos, aunque sólo 20 de ellos generaron cambio de aminoácido en el factor de transcripción Tac1 ([Figura 13](#)). De estos cambios, tres ya se han descrito que confieren resistencia a azoles (la delección $\Delta 962-969$, A736V y N977D), once no estaban relacionados con la resistencia, y 6 se han descrito por primera vez en este trabajo: E265K, S758F, N823K, C858Y, I895T, S935L.

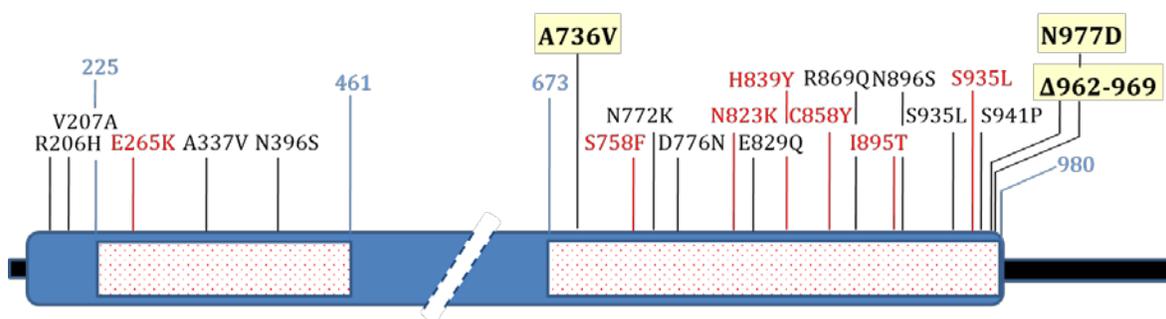


Figura 13. Esquema de la localización de las mutaciones no sinónimas detectadas en el gen *TAC1* de *C. albicans*. En azul aparecen las posiciones de aminoácidos, y el análisis de las secuencias se llevó a cabo entre las posiciones 225-461 y 673-980 (las regiones aparecen resaltadas con puntos rojos). En negrita y resaltadas en amarillo aparecen las mutaciones relacionadas en la literatura con la resistencia a azoles. En rojo aparecen las mutaciones identificadas por primera vez en este trabajo y en negro las mutaciones no relacionadas con la resistencia.

En la [tabla 26](#) se detallan todas las mutaciones de Tac1p detectadas en este trabajo, en las cepas catalogadas como resistentes, sensibles o de resistencia intermedia frente a azoles.

Tabla 26. Mutaciones encontradas en Tac1p en cepas de *C. albicans* clasificadas en función de su sensibilidad.

CEPAS	Resistente	Mutaciones																				
		R206H	V207A	E265K	A337V	N396S	A736V	S758F	N772K	D776N	N823K	E829Q	H839Y	C858Y	R869Q	I895T	N896S	S935L	S941P	Δ962-969	N977D	
BE-113	C*-F*- I-P-V*																					
BE-114	C*-F*																					
15-154	C-F-P- I-V*																					
15-156	C-F																					
15-157	C-F																					
15-159	I-P																					
15-176	C-F- I*-P-V																					
16-091	F-V*																					
16-092	C-F																					
16-123	F-I*-V																					
16-132																						
16-138	C-F-P V-I																					
ATCC 64550	C-F- I*-P- V*																					
ATCC 64124	F-P- V-I																					
06-100	-																					
06-114	-																					
10-171	-																					
06-116	-																					
08-105	-																					
10-166	-																					
10-169	-																					
10-280	-																					
15-153	-																					
15-160	-																					
BE-AZ	-																					
BE-032	-																					
BE-047	-																					
BE-048	-																					
SC5314	-																					

C: clotrimazol; F: fluconazol; P: posaconazol; V: voriconazol; I: itraconazol. Azul oscuro: mutación ya descrita en homocigosis; azul claro: mutación ya descrita en heterocigosis; rojo oscuro: mutación nueva en homocigosis; rojo claro: mutación nueva en heterocigosis. Las mutaciones **en negrita y resaltadas en amarillo** están descritas y asociadas a resistencia a azoles, las resaltadas en rojo han sido descritas por primera vez en este trabajo.

Entre las cepas resistentes destacan el aislamiento 15-176 y la cepa de referencia ATCC 64124, por ser ambas portadoras de mutaciones, en heterocigosis, asociadas

Resultados

a resistencia, la primera con el intercambio de alanina por valina en la posición 736 (A736V) y la deleción entre los aminoácidos 962 y 969 (Δ 962-969), y la segunda con el intercambio de asparagina por ácido aspártico en la posición 977 (N977D).

Se detectaron varias sustituciones no descritas en la literatura, entre ellas destacan S758F por encontrarse en homocigosis en una cepa resistente, y H839Y que se detectó en la cepa resistente de referencia ATCC 64124, aunque únicamente en uno de los alelos.

Las sustituciones N396S, N772K, D776N, E829Q, N896S, S935L, esta última identificada por primera vez en este trabajo, y S941P se detectaron en la mayoría de los aislamientos, tanto en sensibles como en resistentes, por lo que su presencia no se asocia a resistencia a azoles.

4.5.2.3. Análisis de las secuencias de *UPC2*

En la región carboxilo terminal del gen *UPC2* analizada en este trabajo no se detectaron sustituciones sinónimas; únicamente se hallaron 2 sustituciones no-sinónimas ya descritas en la literatura y relacionadas con la resistencia a azoles: A643V y G648S, ambas en heterocigosis, en 3 de los aislamientos resistentes ([Tabla 27](#)).

Tabla 27. Mutaciones encontradas en *Upc2p* en cepas de *C. albicans* clasificadas como resistentes a azoles.

CEPAS	Resistente	A643V	G648S
BE-113	C*-F*-I-P-V*		
BE-114	C*-F*		
15-154	C-F-P-I- V*		
15-156	C-F		
15-157	C-F		
15-159	I-P		
15-176	C-F- I*-P-V		
16-091	F-V*		
16-092	C-F		
16-123	F-I*-V		
16-132			
16-138	C-F-P V-I		
ATCC 64550	C-F-I*-P-V*		
ATCC 64124	F-P-V-I		

C: clotrimazol; F: fluconazol; P: posaconazol, V: voriconazol; I: itraconazol. Azul claro: mutación ya descrita en heterozigosis. Las mutaciones **en negrita y resaltadas en amarillo** ya se han descrito y están asociadas a resistencia a azoles.

Cabe destacar, tras el análisis conjunto de las mutaciones detectadas en los tres genes estudiados, que las 6 cepas de *C. albicans* resistentes a azoles que presentaban mutaciones ya descritas y asociadas en la literatura con la resistencia a azoles son portadoras de más de una sustitución, bien en el mismo gen, en otro distinto o incluso en todos ellos ([Tabla 28](#)).

Tabla 28. Sustituciones de aminoácidos en Erg11p y en los factores de transcripción Tac1p y Upc2p en cepas de *C. albicans* resistentes a azoles.

CEPAS	Erg11p	Tac1p	Upc2
BE-113	A114S Y257H	-	-
15-159	K143Rh		
15-176	R467K	A736Vh Δ962-969h	A643V
16-091	Y132H G450E	-	G648S
16-123	Y132H G450E	-	G648S
ATCC 64550	Q474K	-	-
ATCC 64124	Y132H G450E	N977Dh	-

h: sustitución hallada en heterozigosis. Δ: delección.

4.5.3. Análisis de los factores de transcripción Tac1p y Upc2p y de Erg11p en las poblaciones experimentales BE-47 y SC5314 sometidas a la presión del fluconazol

Previo al análisis de las secuencias, se determinó la sensibilidad a los azoles de las poblaciones antes de la exposición al antifúngico (t0) y tras el mantenimiento durante 23 días a concentraciones crecientes de fluconazol hasta 64 µg/ml (t23) ([Figura 14](#)).

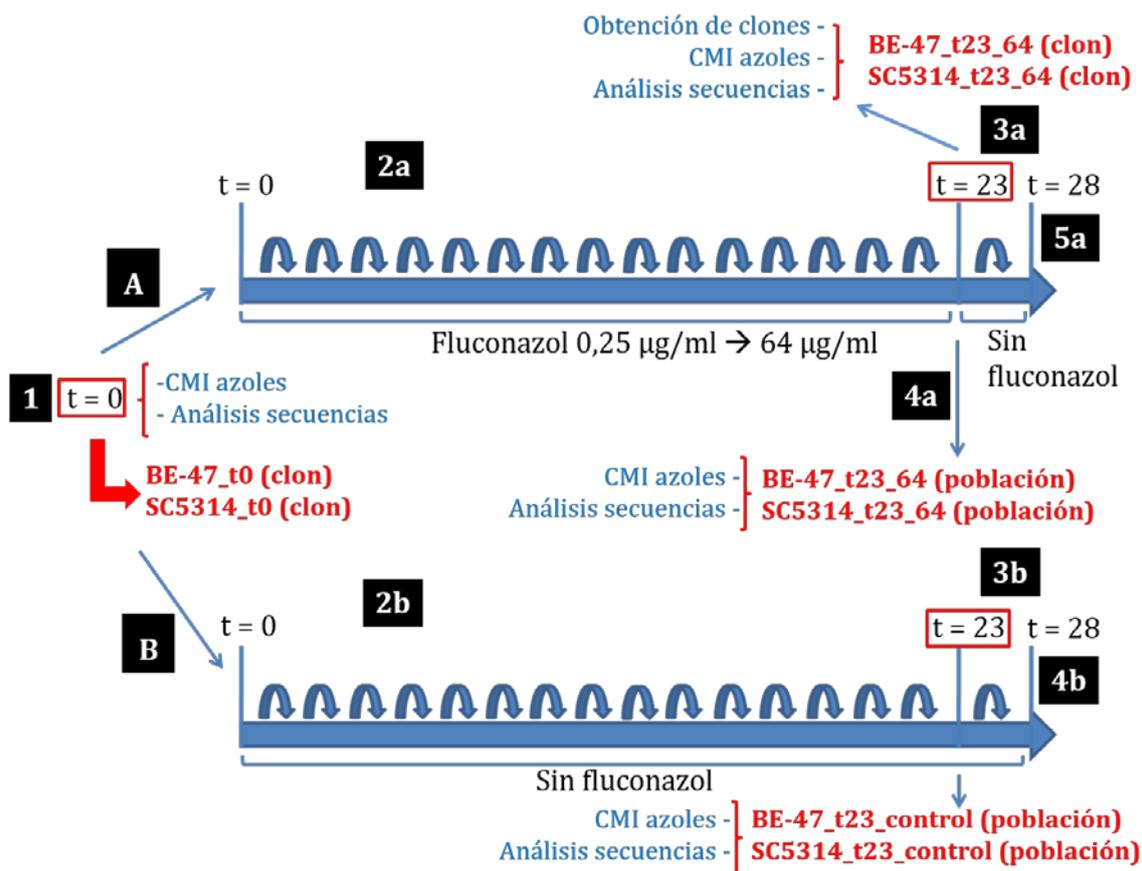


Figura 14. Esquema del ensayo de las poblaciones experimentales de las cepas de *C. albicans* BE-47 y SC5314 y tiempos en los cuales se analizaron la sensibilidad a azoles y las secuencias de los genes *ERG11*, *TAC1* y *UPC2* (en rojo). (1) t=0: se partió de un único clon (BE-47_t0 o SC5314_t0), se determinó la CMI y se analizaron las secuencias. El inóculo inicial se empleó para su propagación en presencia de fluconazol (A) y sin antifúngico (control) (B). (2A) Se inició la propagación durante 23 días de ambas poblaciones en presencia de concentraciones crecientes de fluconazol, desde 0,25 hasta 64 µg/ml, cada vez que una población superaba la concentración de antifúngico se inoculaba en medio nuevo con el doble de antifúngico. Tras 23 días se analizaron clones (3A) y poblaciones (4A). Después se mantuvieron durante 5 días más en medio sin antifúngico (5A) (datos no mostrados). Por otro lado, se analizaron las poblaciones control tras 23 (3B) y 28 días (4B) creciendo en medio sin antifúngico.

Transcurridos los 23 días pudimos observar que los valores de CMI para los diferentes azoles se incrementaron entre 4 y 16 veces en el caso de la población SC5314, mientras que para BE-47 los valores de CMI llegaron a multiplicarse hasta 256 veces para posaconazol e incluso 512 veces en el caso de itraconazol, alcanzando una CMI de 16 µg/ml en este último caso (Tabla 29).

Tabla 29. CMI de las poblaciones BE-47 y SC5314 frente a distintos azoles, antes y después de la exposición a fluconazol. Lecturas a las 24h y a las 48h. Valores de CMI expresados en µg/ml.

AF	BE-47_t0		BE-47_t23_64		SC5314_t0		SC5314_t23_64	
	24h	48h	24h (a)	48h (a)	24h	48h	24h (a)	48h (a)
CLT	0,03	0,06	0,03 (1)	0,25 (4)	0,03	0,12	0,25 (8)	1 (4)
PSC	0,015	0,03	0,06 (4)	8 (256)	0,015	0,03	0,25 (16)	0,5 (16)

VRC	0,008	0,008	0,06 (8)	0,12 (16)	0,008	0,015	0,06 (8)	0,25* (16)
ITC	0,03	0,06	0,12 (4)	16 (512)	0,03	0,06	0,25 (8)	0,5 (8)
FLC	0,5	0,5	1 (2)	2 (4)	0,25	0,5	2 (8)	4 (8)

AF: antifúngico. CLT: clotrimazol, PSC: posaconazol, VRC: voriconazol, ITC: itraconazol, FLC: fluconazol. (a) Factor de multiplicación de CMI en t23 con respecto al t0 correspondiente. Los valores de CMI catalogados como resistentes aparecen resaltados en rojo, y los SDD en negrita.

El análisis de las secuencias de las poblaciones experimentales BE-47 y SC5314 mostró resultados dispares (Tabla 30). En el caso de BE-47, a pesar de haber aumentado los valores de CMI para todos los compuestos azólicos, no se detectó ninguna de las sustituciones de aminoácidos relacionadas en la literatura con la resistencia. Las 4 muestras analizadas, con y sin exposición a fluconazol, mostraron los mismos polimorfismos genéticos, ninguno de los cuales está descrito como relacionado con la resistencia.

La población SC5314, por el contrario, mostró polimorfismos diferentes en la población control y en la expuesta a fluconazol. En este último caso, tanto la población como el clon seleccionado presentaron la mutación con GOF N977D en Tac1p, además en homocigosis, lo cual implica que durante la exposición al fármaco la población SC5314 fijó dicha mutación y que además sufrió una pérdida de la heterocigosis. Comparando SC5314_t23_64 (población) y SC5314_t23_64 (clon) se puede deducir que la pérdida de heterocigosis involucró además a otras regiones del cromosoma 5, ya que también se observó pérdida de heterocigosis en Erg11p para el clon SC5314_t23_64.

Tabla 30. Sustituciones de aminoácidos en ERG11p y en los factores de transcripción Tac1p y Upc2 en las poblaciones experimentales, en comparación con las secuencias de referencia X132296, DQ393587 y EU583451.

Poblaciones	Resistente a	Erg11p		Tac1p						Upc2p
		D116E	K128T	N396S	N772K	D776N	E829Q	S935L	S941P	N977D
BE-47_t0	-									-
BE-47_t23_CONTROL	-									-
BE-47_t23_64 (población)	I-P									-
BE-47_t23_64 (clon)										-
SC5314_t0	-									-
SC5314_t23_CONTROL	-									-
SC5314_t23_64 (población)	P-F*-V*-I*									-
SC5314_t23_64 (clon)										-

F: fluconazol; I: itraconazol; P: posaconazol; V: voriconazol. * Sensible dosis-dependiente. Azul oscuro: mutación ya descrita en homocigosis; azul claro: mutación ya descrita en heterocigosis; rojo claro: mutación nueva en heterocigosis. Las mutaciones **en negrita y resaltadas en amarillo** están descritas y asociadas a resistencia a azoles, las resaltadas en rojo han sido descritas por primera vez en este trabajo.



Molecular Identification of *Saprochaete capitata* in Human Blood and Paraffinized Tissue Samples

I. Arrieta-Aguirre,^a P. Menéndez-Manjón,^b M. S. Cuétara,^c L. López-Soria,^{d,f}
J. C. García-Ruiz,^{e,f} M. D. Moragues^{a,f}

Accepted manuscript posted online 7 June 2017

Citation Arrieta-Aguirre I, Menéndez-Manjón P, Cuétara MS, López-Soria L, García-Ruiz JC, Moragues MD. 2017. Molecular identification of *Saprochaete capitata* in human blood and paraffinized tissue samples. *J Clin Microbiol* 55:2556–2559. <https://doi.org/10.1128/JCM.00876-17>.

Editor Geoffrey A. Land, Carter BloodCare & Baylor University Medical Center

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to M. D. Moragues, lola.moragues@ehu.es.

Department of Nursing, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain^a; Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain^b; Microbiology Laboratory, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés-Madrid, Spain^c; Microbiology Laboratory, University Hospital Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain^d; Hematology and Hemotherapy Ward, University Hospital Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain^e; BioCruces Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain^f

KEYWORDS *Saprochaete capitata*, invasive fungal infection, molecular diagnosis, PCR, spiked blood, paraffin-embedded tissue, molecular diagnostics, mycology

Invasive fungal infections (IFIs) caused by *Candida* and *Aspergillus* species are the most prevalent fungal infections in hospitals; however, those caused by rare fungal species have become increasingly common in recent years. *Saprochaete capitata* (anamorph; *Magnusiomyces capitatus* teleomorph), formerly known as *Trichosporon capitatum*, *Geotrichum capitatum*, *Blastoschizomyces capitatus*, and *Dipodascus capitatum* (1), has emerged as a cause of IFI, especially in patients with hematological malignancies (2, 3). Invasive infections by *S. capitata* can be confused with *Candida* infections and may result in high attributed mortality rates due to its low susceptibility to fluconazole and echinocandins, antifungals commonly used in the clinical set for the treatment of candidiasis and aspergillosis (3). The objective of this study was to design a specific PCR assay for the rapid identification of *S. capitata* from paraffinized tissue samples that would provide useful results with blood samples as well.

Nine clinical isolates of *S. capitata* were assayed: five strains, including Scap 74605, Scap 69180, Scap 47451, Scap 17719, and Scap 99190, previously identified as *G. capitatum* (3), and four strains—600, 648, 696, and 1123—from Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés-Madrid. Three more clinical strains of *M. capitatus*—IHEM 5665, IHEM 5666, and IHEM 6803 (BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussels, Belgium)—were included as positive controls, while *Candida albicans* NCPF 3153 (National Collection of Pathogenic Fungi, Bristol, United Kingdom), *Candida dubliniensis* NCPF 3949, *Candida glabrata* NCPF 3203, *Candida parapsilosis* NCPF 3104, *Candida guilliermondii* NCPF 3099, *Candida tropicalis* NCPF 3111, *Candida krusei* ATCC 6258 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1678 (Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot-Valencia, Spain), *Lomentospora prolificans* ATCC 64913, and *Aspergillus fumigatus* AF-293 (NCPF 7367) were included as negative controls.

Resultados

Fungal cultures were grown overnight at 37°C and 150 rpm, collected by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min, and ground in liquid nitrogen. DNA was extracted using an ATP genomic DNA minikit (Plants) (ATP biotech Inc., Taiwan) according to the manufacturer's instructions.

DNA from formalin-fixed paraffinized liver and gut tissue samples was extracted in duplicate following the protocols described by Bialek et al. (4) with some modifications. Briefly, tissue slices from paraffin blocks were dewaxed in xylene at 45°C for 15 min (two rounds), followed by graded (100%, 90%, and 70%) ethanol washes. Deparaffinized

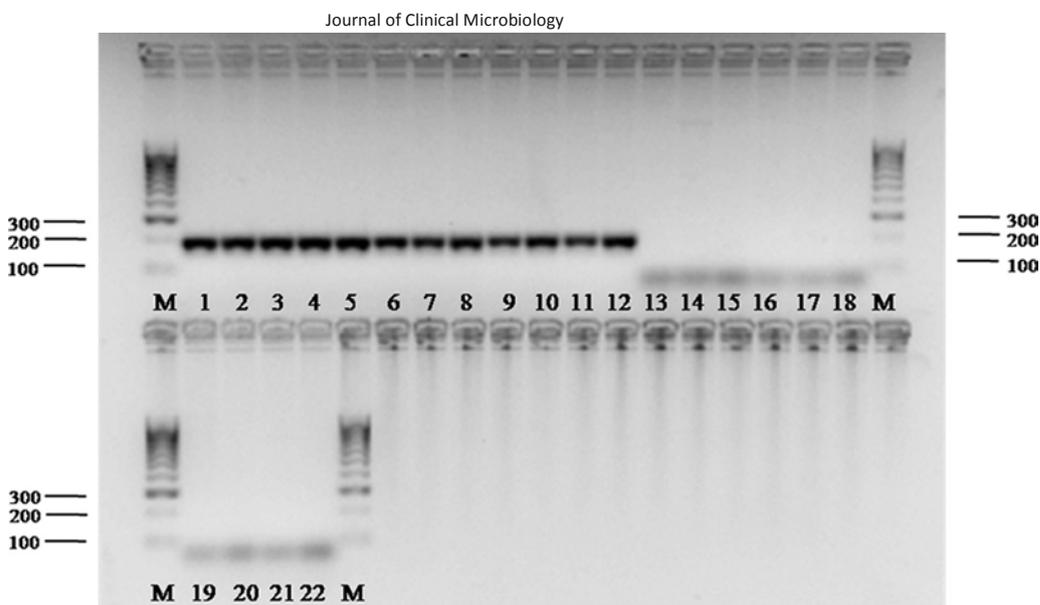


FIG 1 Products of PCR amplification of DNA samples by the use of Scap-200 and Scap-R primers. Lanes 1 to 9, *S. capitata* clinical isolates Scap 74605, 69180, 47451, 17719, and 99190 and *S. capitata* clinical isolates 600, 648, 696, and 1123; lanes 10 to 12, *S. capitata* strains IHEM 5665, IHEM 5666, and IHEM 6803; lane 13, *C. albicans* NCPF 3153; lane 14, *C. glabrata* NCPF 3203; lane 15, *C. parapsilosis* NCPF 3104; lane 16, *C. guilliermondii* NCPF 3099; lane 17, *C. tropicalis* NCPF 3111; lane 18, *C. krusei* ATCC 6258; lane 19, *C. dubliniensis* NCPF 3949; lane 20, *A. fumigatus* NCPF 7367; lane 21, *L. prolificans* ATCC 64913; lane 22, *S. cerevisiae* CECT 1678; lane M, 100-bp HyperLadder (Bioline).

tissue was left to dry and was then suspended in bacterial lysis buffer (Roche, Germany) and proteinase K (Roche, Germany) and incubated overnight at 45°C. Glass beads were added, and the samples were subjected to vortex mixing for 5 min and then centrifuged at 13,200 rpm for 1 min. Supernatants were transferred into new tubes, complemented with fresh bacterial lysis buffer and proteinase K, and incubated for 1 h at 65°C. A volume of 400 μ l of the supernatant was transferred into a cartridge of a MagNA Pure compact nucleic acid isolation kit for automated DNA extraction with a MagNA Pure compact instrument (Roche Diagnostics). Tissue samples from proven nontarget fungi and noninfected tissue were used as negative controls.

A human blood sample (containing EDTA) from an anonymous donor was spiked with *S. capitata* cells (10^6 CFU/ml) and then serially diluted 10-fold with blood to 10 CFU/ml. For a more accurate enumeration, a 100- μ l aliquot from each dilution was inoculated on Sabouraud dextrose agar and incubated at 37°C for 24 h. Erythrocytes and white cells of blood samples were lysed following the recommendations of Einsele and colleagues (5). Samples were then incubated at 30°C for 20 min with lyticase (15 U) in lysis buffer (50 mM Tris [pH 8], 15 mM Na-EDTA, 75 mM NaCl) to obtain spheroplasts. The same protocol was followed for a positive control containing *S. capitata* (10^6 CFU per ml of phosphate-buffered saline [PBS]) and the negative blood and buffer controls. DNA was extracted in duplicate using an ATP genomic DNA minikit (Plants) and was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., USA).

Primers Scap-200 (5'-CCG ATT GAA TGG CTT AGT GAG-3') and Scap-R (5'-TGT AAA TTC AAC CAA ATG TTC CA-3') were designed after analyzing the 18S ITS1 to 5.8S ITS2 region sequences of *B. capitatus*, *D. capitatus*, *G. capitatum*, and *M. capitatus* registered in the GenBank database.

The reaction mixture for PCR assays comprised 0.1 to 10 ng of DNA template, 1 BioMix (Bioline, London, United Kingdom), and a 0.625 M concentration of each primer in a total volume of 20 l. The PCR conditions were as follows: denaturation for 10 min at 95°C followed by 45 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s and a final elongation period at 72°C for 7 min. PCR products were resolved in 2%

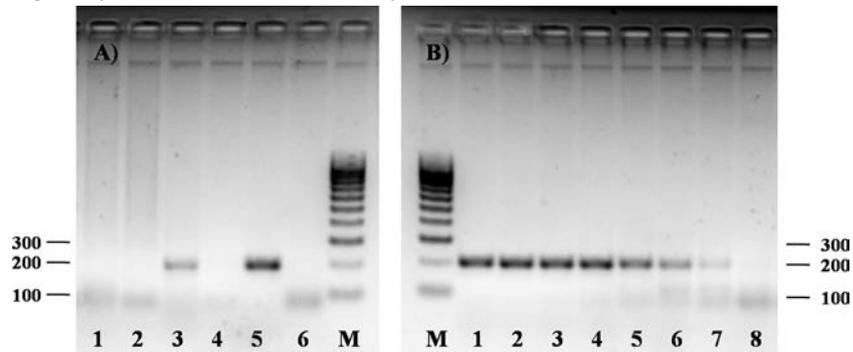


FIG 2 Products of PCR amplification of DNA samples by the use of Scap-200 and Scap-R primers. (A) Lanes: 1, deparaffinized tissue of a patient infected with *Mucor* sp.; 2, deparaffinized lung tissue of a noninfected patient; 3, deparaffinized liver tissue of a patient infected with Scap 99190; 4, paraffin DNA extraction protocol, negative control; 5, *S. capitata* IHEM 5666, PCR positive control; 6, non-DNA template, PCR negative control; M, 100-bp HyperLadder (Bioline). (B) Lanes: 1, *S. capitata* Scap 99190 (10^6 CFU/ml in PBS following blood extraction protocol), positive control; 2 to 7, DNA extracted from spiked human blood with Scap 99190 (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , and 10^1 CFU/ml); 8, nonspiked blood, negative control.

agarose gels in Tris-borate-EDTA buffer at 70 V for 90 min and were stained with Gel-Red (Biotium, USA).

The resulting amplicons were purified with a NucleoSpin Gel and PCR Cleanup kit (Macherey-Nagel, Germany) and sequenced at the SGIker DNA Sequencing and Genotyping Unit of the University of the Basque Country (UPV/EHU).

A 195-bp section of the 18S and ITS1 region was amplified from DNA extracts of *S. capitata* clinical isolates (Fig. 1, lanes 1 to 9). Similar amplicons were obtained for the three reference IHEM strains (Fig. 1, lanes 10 to 12). The specificity of this primer pair was confirmed by the unsuccessful amplification of DNA extracts from a variety of fungal species that are usually involved in human invasive fungal diseases such as *Candida* spp., *A. fumigatus*, or even *L. prolificans* and *S. cerevisiae* (Fig. 1, lanes 13 to 22).

PCR analysis of a deparaffinized liver tissue sample from a patient infected with Scap 99190 (Fig. 2A, lane 3) yielded an amplicon of the expected size that showed 100% identity with GenBank *D. capitatus* sequences. The application of primers Scap-200 and Scap-R was also useful to detect *S. capitata* in Scap 99190 spiked human blood samples ranging from 10 to 10^6 CFU/ml (Fig. 2B, lanes 2 to 7). This finding can complement those of studies addressing the rapid identification of clinical relevant yeasts and filamentous fungi in paraffin-embedded tissues and blood samples by PCR-based molecular techniques (5–10).

In conclusion, PCR performed with the designed primers Scap-200 and Scap-R amplified a 195-bp nucleotide sequence that matched those of fungal species currently known as *S. capitata*. These primers appear to be specific for *S. capitata*, since no amplification was detected with other species responsible for most invasive fungal diseases in humans. The designed protocol could be applied to diagnose *S. capitata* infections from paraffin-embedded tissues and blood samples.

Interestingly, the described PCR assay may help to obtain an earlier and accurate identification of *S. capitata* infection that would permit reorientation of the commonly

Resultados

used preemptive or empirical antifungal treatments, including those using fluconazole and/or echinocandins, which are usually not effective against this fungal species.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J. Guarro and J. Cano (University Rovira i Virgili, Reus, Spain) for their advice about dewaxing protocols for formalin-fixed paraffin-embedded tissues. We are grateful for technical and human support provided by the SGiker DNA Sequencing and Genotyping Unit of UPV/EHU and European funding (ERDF and ESF).

This work was supported by Universidad del País Vasco UPV/EHU (UFI11/25) and Consejería de Educación, Universidades e Investigación of Gobierno Vasco—Eusko Jaurlaritz (GIC12/184_IT-788-13 and GIC15/103_IT-913-16).

We declare that we have no competing interests.

No writing assistance was utilized in the production of the manuscript.

REFERENCES

1. de Hoog GS, Chaturvedi V, Denning DW, Dyer PS, Frisvad JC, Geiser D, Graser Y, Guarro J, Haase G, Kwon-Chung KJ, Meis JF, Meyer W, Pitt JI, Samson RA, Taylor JW, Tintelnot K, Vitale RG, Walsh TJ, Lackner M; ISHAM Working Group on Nomenclature of Medical Fungi. 2015. Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. *J Clin Microbiol* 53:1056–1062. <https://doi.org/10.1128/JCM.02016-14>.
2. Durán Graeff L, Seidel D, Vehreschild MJ, Hamprecht A, Kindo A, Racil Z, Demeter J, De Hoog S, Aurbach U, Ziegler M, Wisplinghoff H, Cornely OA, FungiScope Group. 2017. Invasive infections due to *Saprochaete* and *Geotrichum* species: Report of 23 cases from the FungiScope Registry. *Mycoses* 60:273–279. <https://doi.org/10.1111/myc.12595>.
3. García-Ruiz JC, López-Soria L, Olazábal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, Pontón J, Moragues MD. 2013. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol* 30:248–255. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.02.004>.
4. Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, JustNubling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V. 2005. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 58:1180–1184. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.024703>.
5. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 35:1353–1360.
6. Canteros CE, Alejandro Vélez H, Toranzo AI, Suárez-Alvarez R, Ángela Tobón O, María del Pilar Jimenez A, Ángela Restrepo M. 2015. Molecular identification of *Coccidioides immitis* in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from a Colombian patient. *Med Mycol* 53: 520–527. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv019>.
7. Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, Gómez BL. 2010. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. *J Clin Microbiol* 48:2147–2153. <https://doi.org/10.1128/JCM.00459-10>.
8. Rickerts V, Khot PD, Myerson D, Ko DL, Lambrecht E, Fredricks DN. 2011. Comparison of quantitative real time PCR with sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Infect Dis* 11:202. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-202>.
9. Salehi E, Hedayati MT, Zoll J, Rafati H, Ghasemi M, Doroudinia A, Abastabar M, Tolooe A, Snelders E, van der Lee HA, Rijs AJ, Verweij PE, Seyedmousavi S, Melcher WJ. 2016. Discrimination of aspergillosis, mucormycosis, fusariosis, and scedosporiosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens by use of multiple real-time quantitative PCR assays. *J Clin Microbiol* 54:2798–2803. <https://doi.org/10.1128/JCM.01185-16>.
10. Simner PJ, Buckwalter SP, Uhl JR, Wengenack NL, Pritt BS. 2013. Detection and identification of yeasts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by use of PCR-electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 51:3731–3734. <https://doi.org/10.1128/JCM.01967-13>.



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

MECHANISMS OF RESISTANCE



Sequencing of *FKS* Hot Spot 1 from *Saprochaete capitata* To Search for a Relationship to Reduced Echinocandin Susceptibility

Inés Arrieta-Aguirre,^a Pilar Menéndez-Manjón,^{a,b} María Soledad Cuétara,^c Iñigo Fernández de Larrinoa,^d Juan Carlos García-Ruiz,^{e,f} María Dolores Moragues^{a,f}

^aDepartment of Nursing, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa,

Bizkaia, Spain ^bDepartment of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine and Nursing, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Bizkaia, Spain

^cMicrobiology Department, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid, Spain

^dDepartment of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of the Basque Country UPV/EHU,

Donostia, Gipuzkoa, Spain ^eHematology Department, Cruces University Hospital, Barakaldo, Bizkaia, Spain ^fBioCruces Health Research Institute, Barakaldo, Bizkaia, Spain

ABSTRACT *Saprochaete capitata*, formerly known as *Geotrichum capitatum*, is an emerging fungal pathogen with low susceptibility to echinocandins. Here, we report the nucleotide sequence of the *S. capitata* hot spot 1 region of the *FKS* gene (*FKS* HS1), which codifies for the catalytic subunit of -1,3-D-glucan synthase, the target of echinocandins. For that purpose, we first designed degenerated oligonucleotide primers derived from conserved flanking regions of the *FKS1* HS1 segment of 12 different fungal species. Interestingly, analysis of the translated *FKS* HS1 sequences of 12 isolates of *S. capitata* revealed that all of them exhibited the same F-to-L substitution in a position that is highly related to reduced echinocandin susceptibility.

KEYWORDS antifungal resistance

Received 16 June 2017 Returned for modification 18 August 2017 Accepted 22 November 2017

Accepted manuscript posted online 11 December 2017

Citation Arrieta-Aguirre I, Menéndez-Manjón P, Cuétara MS, Fernández de Larrinoa I, GarcíaRuiz JC, Moragues MD. 2018. Sequencing of *FKS* hot spot 1 from *Saprochaete capitata* to search for a relationship to reduced

echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01246-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01246-17>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to María Dolores Moragues, lola.moragues@ehu.es.

Resultados

S *aprochaete capitata* (teleomorph: *Magnusiomyces capitatus*), formerly known as *Trichosporon capitatum*, *Geotrichum capitatum*, *Dipodascus capitatus*, and *Blastoschizomyces capitatus* (1), is an emerging opportunistic pathogen, and fatal fungal infections have often been reported in patients with hematological malignancies (2, 3). Patterns of susceptibility to the common antifungal drugs are variable, and clinical breakpoints are not available (4). Antifungal treatment remains empirical, and echinocandins appear to have no role in *S. capitata* infection management (5). Furthermore, empirical treatment with echinocandins may be a predisposing factor for this yeast infection (6). Echinocandins inhibit fungal cell wall biosynthesis through inhibition of the catalytic subunits of α -1,3-D-glucan synthase, Fksp (7), which are encoded by *FKS* genes. Other yeasts, such as *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon*, and *Rhodotorula*; molds, such as *Fusarium solani* and *Lomentospora prolificans*; and *Zygomycetes* show intrinsic resistance to echinocandins (8). Reduced susceptibility of some *Candida* species to echinocandins has been associated with point mutations in two highly conserved regions of paralogous *FKS* genes known as hot spots 1 (HS1) and 2 (HS2) (9), although the highest frequency of resistance mutations was found within HS1 (10). Naturally occurring amino acid substitutions of *FKS* HS1 and HS2 were reported for different fungal species related to reduced echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* complex (11) and *Candida guilliermondii* (12) or even to intrinsic resistance of *F. solani* and *L. prolificans* (13).

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Our objective was to obtain the sequence of the *FKS* HS1 homologous region of *S. capitata* to check whether it is related to the innate reduced susceptibility to echinocandins of this fungal species.

Five clinical strains of *S. capitata* were isolated from patients suffering hematological malignancies at Cruces University Hospital, where four of the patients had received caspofungin alone or in combination with other antifungal drugs (4). Four more strains were isolated by one of the investigators (M.S.C., Severo-Ochoa Hospital). Three reference strains of clinical origin were also included (IHEM 5665, IHEM 5666, and IHEM 6803; BCCM/IHEM Biomedical Fungi and Yeasts Collection, Brussels, Belgium).

No information on the *S. capitata* *FKS* gene sequence was found in the GenBank database. Therefore, for amplification of the HS1 region of the *S. capitata* *FKS* gene, new degenerated primers were designed based on the GenBank deposited *FKS1* sequences of 12 different fungal species (Fig. 1A), including *Saccharomyces cerevisiae* (AY395693) (14), *Candida glabrata* (HM366440) (15), *Candida albicans* (D88815) (16), *Candida dubliniensis* (GQ342611) (17), *Candida tropicalis* (EU676168) (18), *Candida parapsilosis* (EU221325) (11), *Candida orthopsilosis* (EU350513) (11), *Meyerozyma guilliermondii* (HQ822127) (19), *Issatchenkia orientalis* (EF426563) (20), *Yarrowia lipolytica* (AF198090) (21), *Emericella nidulans* (U51272) (22), and *Aspergillus fumigatus* (XM_746025) (23). The sequences of the designed primers were FKS_HS1_Fdeg 5'--GAY ADR WDK HTR TCN TAY BKN NTD TGG-3' and FKS_HS1_Rdeg 5'--GTA CCA NAD RTA RST RTC SAR RAA G-3'. Based on DNA sequences yielded with the degenerated primers, we designed specific internal primers for the *S. capitata* *FKS* HS1 region: FKS_HS1_Fsapr 5'--GTG TGG GTT TGT GTC TTT ACT G-3', and FKS_HS1_Rsapr 5'--ACC AAG TCA ATA GCG TAC ATC ATA CC-3'.

DNA was purified before PCR, following the recommendations of Turin and colleagues (24), with modifications. Four or five fungal colonies were suspended in 400 μ l of sterile phosphate-buffered saline, and 90 mg of acid-washed glass beads (Sigma) was added. The mixture was subjected to vortex mixing for 5 min, and the supernatant was transferred to a new tube, followed by incubation with 15 U of lyticase (Sigma) for 20 min at 30°C, 4 U of RNase for 20 min at 37°C, and 100 μ l of 10% SDS and 200 μ g of proteinase K (Roche) for 20 min at 55°C. After an additional centrifugation step, the DNA was purified using a DNeasy plant minikit (Qiagen).

The Platinum SuperFi DNA polymerase (Invitrogen) and one of the two primer pairs described previously (FKS_HS1_Fsapr and FKS_HS1_Rsapr or FKS_HS1_Fdeg and FKS_HS1_Rdeg) were used for the *FKS* HS1 amplification reaction. PCR was performed as follows: initial denaturation step at 98°C for 30 s; followed by 30 cycles consisting of denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 51°C for 10 s, and extension at 72°C for 30 s; ending with a final

elongation at 72°C for 5 min. Amplicons were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) and sequenced at the SGIker DNA Sequencing and Genotyping Unit of the University of the Basque Country (UPV/EHU).

The MIC values of caspofungin, micafungin, and anidulafungin against *S. capitata* isolates were determined using the Sensititre YeastOne panel (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, United Kingdom).

DNA amplification with the FKS_HS1_Fdeg and FKS_HS1_Rdeg primers resulted in a 243-bp DNA fragment that was submitted to GenBank (accession no. [KY783948](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KY783948)). In comparison with the GenBank nucleotide database using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), the sequence matched the -1,3- β -glucan synthase gene of different fungal species (*C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *M. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida metapsilosis*, *I. orientalis*, or *S. cerevisiae*), with identity values ranging from 69% to 76%. Analysis of the *S. capitata* FKS sequences showed a polymorphic region, although most of the base substitutions were synonymous. The region located between nucleotides 46 and 72 (Fig. 1B) was identified as FKS HS1 by comparison with other fungal species, and it was highly conserved among all the isolates. Of note, the first base of this segment for all of the studied isolates of *S. capitata* was cytosine (Fig. 1B and C, blue shading), whereas echinocandin-susceptible fungi usually present with thymine. This naturally occurring T-to-C change resulted in *S. capitata* and Reduced Echinocandin Susceptibility.

Resultados

A)

1949-GATAGATGGATGCCTATTTAGTTTGG-1975	<i>S. cerevisiae</i>	2164-CTTCTGGATACCTACTTATGGTAC-2188
1807-GACAGATGGTTGTCTTACCTGGTTTGG-1833	<i>C. glabrata</i>	2022-CTTCTGGATACCTATCTGTGGTAC-2046
2562-GATATGTGGATGCTTATTTGTTATGG-2588	<i>C. albicans</i>	2777-CTTTTGGATACTTATATGTGGTAC-2801
1855-GATATGTGGATGTCATATTTGTTATGG-1881	<i>C. dubliniensis</i>	2070-CTTTTGGATACTTATATGTGGTAC-2094
160-GATATGTGGATGCCTACTTGTGTGG-186	<i>C. tropicalis</i>	375-CTTCTGGATACTTATATGTGGTAC-399
2903-GACATGTGGATGTCGATTTGTTGTTGG-2929	<i>C. parapsilosis</i>	3118-CTTTTGGATACTTACTTGTGGTAC-3142
49-GACATGTGGATGCTTACTTGTGTGG-75	<i>C. orthopsilosis</i>	264-CTTCTGGATACTTACTTGTGGTAC-288
1828-GACATGTGGTTATCTTATTTAATGTGG-1854	<i>M. guilliermondii</i>	2043-CTTTTGGATACTACATGTGGTAC-2067
2013-GATAGATATCTATCTTATCTGGTTTGG-2039	<i>I. orientalis</i>	2228-CTTTTGGATACTTATATGTGGTAC-2252
2606-GACAAGATTATGCTTATCTTCTGTGG-2632	<i>Y. lipolytica</i>	2833-CTTCTCGATACTACCTCTGGTAC-2857
2668-GATATGTGGATGTCATATGGACTTTGG-2694	<i>E. nidulans</i>	2886-CTTCTCGACAGTTATCTCTGGTAC-2910
1957-GATATGTGGATGTCGTACGGCCTATGG-1983	<i>A. fumigatus</i>	2175-CTTCTGGACAGCTATCTTGGTAC-2199

GAYADRWDKHTRTCNTAYBKNNDTGG

CTTYTSGAYASYTAHTNTGGTAC

FKS_HS1_Fdeg

FKS_HS1_Rdeg

B)

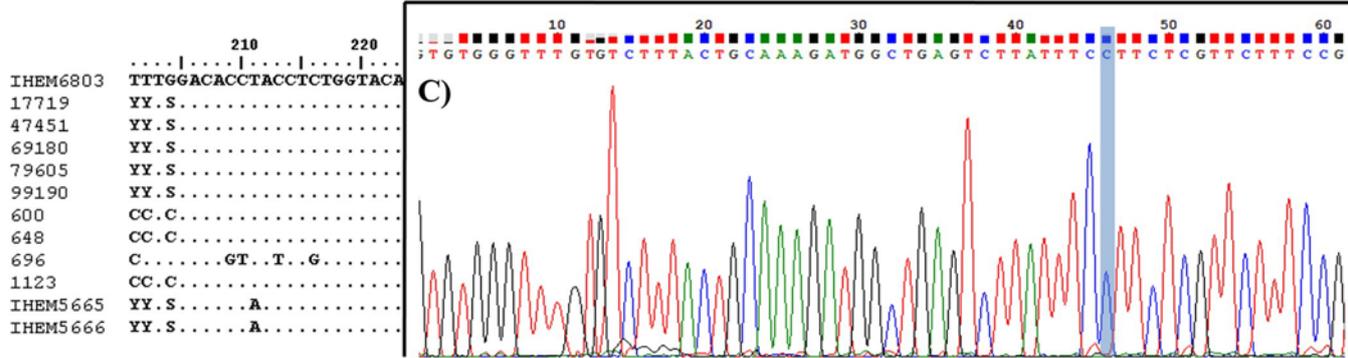
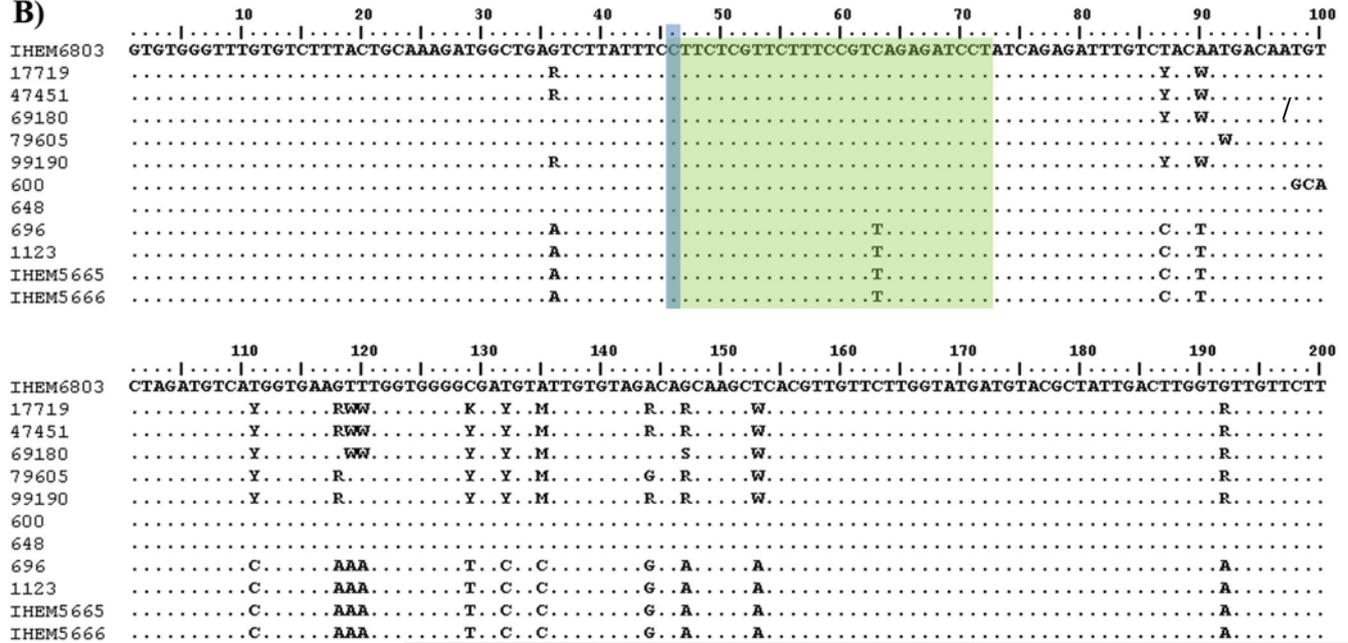


FIG 1 *FKS* HS1 genome region. (A) Multiple-sequence alignment showing the *FKS1* HS1 genome region of several fungal species that served to design the degenerated primers FKS_HS1_Fdeg and FKS_HS1_Rdeg shown in the red boxes. Code letters for mixed bases are Y, C/T; D, A/G/T; R, A/G; W, A/T; K, G/T; H, A/C/T; N, A/C/G/T; B, C/G/T; S, C/G; and M, A/C. (B) Green shading, DNA sequence alignments of the *FKS* HS1 region of 12 *S. capitata* clinical isolates obtained with the primers FKS_HS1_Fsapr and FKS_HS1_Rsapr. Blue shading, naturally occurring T-to-C change. (C) Sequencing chromatogram of *FKS* HS1 of *S. capitata* IHEM 6803 strain. Blue shading, naturally occurring T-to-C substitution.

an F-to-L amino acid substitution in a highly conserved position of Fks1p (Fig. 2, blue shading). This F-to-L substitution was previously associated with echinocandin resistance in *C. albicans* (25) and *C. tropicalis* (18). Other mutations in the same position have been related to reduced echinocandin susceptibility of *S. cerevisiae* (14), *C. albicans* (26),

<i>S. cerevisiae</i>	635	E	S	Y	<u>F</u>	L	V	L	S	L	R	D	P	I	R	649	(14)
					<u>I</u>												(14)
<i>C. glabrata</i>	621	I	635	(15)
					<u>V</u>												(25)
<i>C. albicans</i>	637	.	.	.	F	.	S	T	651	(16)
					<u>L</u>												(25)
					<u>YS</u>												(26)
<i>C. dubliniensis</i>	637	.	.	.	F	.	.	T	651	(17)
<i>C. tropicalis</i>	72	.	.	.	F	.	.	T	86	(18)
					<u>LS</u>												(18)
<i>C. parapsilosis</i>	648	.	.	.	F	.	.	T	<u>A</u>	662	(11)
<i>C. orthopsilosis</i>	35	.	.	.	F	.	.	T	<u>A</u>	49	(11)
<i>I. orientalis</i>	651	I	.	.	I	665	(20)
					<u>C</u>												(20)
<i>M. guilliermondii</i>	628	.	.	.	F	.	<u>M</u>	<u>A</u>	648	(12,19)
<i>Y. lipolytica</i>	688	I	702	(21)
<i>E. nidulans</i>	666	.	.	.	F	.	.	T	.	.	I	K	.	.	.	680	(22)
<i>A. fumigatus</i>	671	.	.	.	F	.	.	T	.	.	F	K	.	.	.	685	(23)
<i>F. solani</i>	679	V	.	.	T	<u>Y</u>	.	I	.	.	F	693	(13)
<i>L. prolificans</i>	316	V	.	.	A	<u>Y</u>	.	T	.	.	F	632	(13)
<i>S. capitata</i>	12	<u>L</u>	V	26	This study

FIG 2 Green shading, Fks1p HS1 region sequence alignment of 14 different fungal species compared with that of *S. capitata*. Dots, identity to *S. cerevisiae* sequence. The mutations associated with reduced echinocandin susceptibility are underlined, and most are located in the first position (blue shading).

C. glabrata (19), and *C. krusei* isolates (20) (Fig. 2). Furthermore, the naturally occurring F-to-L substitution may be comparable to F684Y of *F. solani* and F320Y of *L. prolificans*, two intrinsically echinocandin-resistant species (13). In addition, a naturally occurring L-to-V substitution was found in the sixth position of the *S. capitata* HS1 (Fig. 2); however, changes in this amino acid position still have an unknown impact in other fungal species (27).

Different amino acid alterations of Fksp have been described. In most cases, they confer cross-resistance to all three echinocandins; however, some amino acid substitutions cause more moderate MIC alterations and not always for all three compounds (27). All of the studied *S. capitata* isolates showed high MIC values for echinocandins ranging from 1 to 2 g/ml for anidulafungin, 2 to 8 g/ml for micafungin, and 8 g/ml for caspofungin. Because clinical breakpoint values for echinocandins are not available for this species, it was impossible to classify them as susceptible or resistant. Nevertheless, *S. capitata* is generally considered to be intrinsically resistant to echinocandins (4).

In this study, we report for the first time the partial sequence of the *FKS* gene of 12 *S. capitata* isolates comprising the HS1 region (GenBank accession nos. [KY783948](#), [MG356975](#), [MG356976](#), [MG356977](#), [MG356978](#), [MG356979](#), [MG356980](#), [MG356981](#), [MG356982](#), [MG356983](#), [MG356984](#), [MG356985](#), [MG356986](#), [MG356987](#), [MG356988](#), [MG356989](#), [MG356990](#), and [MG356991](#)). A naturally occurring T-to-C change was detected in all of the examined isolates of *S. capitata* leading to an F-to-L amino acid substitution in the first position of HS1. Since reduced echinocandin susceptibility of other fungal species has been related to mutations in the Fks1p HS1 region, mostly in the first position, further studies are warranted to confirm this relationship for *S. capitata*.

Accession number(s). The reported *FKS* HS1 sequences for *S. capitata* isolates have been submitted to GenBank under accession numbers [KY783948](#), [MG356975](#), *S. capitata* and Reduced Echinocandin Susceptibility

Resultados

MG356976, MG356977, MG356978, MG356979, MG356980, MG356981, MG356982, MG356983, MG356984, MG356985, MG356986, MG356987, MG356988, MG356989, MG356990, and MG356991.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for technical and human support provided by the SGIker DNA Sequencing and Genotyping Unit of UPV/EHU and European funding (ERDF and ESF).

This work was supported by grants from the Universidad del País Vasco UPV/EHU (UFI11/25) and the Consejería de Educación, Universidades e Investigación (GIC12/ 184_IT-788-13, and GIC15/103_IT-913-16) of Gobierno Vasco - Eusko Jaurlaritz.

We declare that we have no competing interests.

REFERENCES

1. de Hoog GS, Chaturvedi V, Denning DW, Dyer PS, Frisvad JC, Geiser D, Graser Y, Guarro J, Haase G, Kwon-Chung KJ, Meis JF, Meyer W, Pitt JI, Samson RA, Taylor JW, Tintelnot K, Vitale RG, Walsh TJ, Lackner M, ISHAM Working Group on Nomenclature of Medical Fungi. 2015. Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. *J Clin Microbiol* 53:1056–1062. <https://doi.org/10.1128/JCM.02016-14>.
2. Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, Melillo L, Buelli M, Pizzarelli G, Venditti M, Martino P, GIMEMA Infection Program. 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol* 43:1818–1828. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1818-1828.2005>.
3. Martino R, Salavert M, Parody R, Tomas JF, de la Camara R, Vazquez L, Jarque I, Prieto E, Sastre JL, Gadea I, Peman J, Sierra J. 2004. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. *Clin Infect Dis* 38:335–341. <https://doi.org/10.1086/380643>.
4. Garcia-Ruiz JC, Lopez-Soria L, Olazabal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, Ponton J, Moragues MD. 2013. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol* 30:248–255. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.02.004>.
5. Chittick P, Palavecino EL, Delashmitt B, Evans J, Peacock JE, Jr. 2009. Case of fatal *Blastoschizomyces capitatus* infection occurring in a patient receiving empiric micafungin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5306–5307. <https://doi.org/10.1128/AAC.00710-09>.
6. Kubiak DW, Bryar JM, McDonnell AM, Delgado-Flores JO, Mui E, Baden LR, Marty FM. 2010. Evaluation of caspofungin or micafungin as empiric antifungal therapy in adult patients with persistent febrile neutropenia: a retrospective, observational, sequential cohort analysis. *Clin Ther* 32: 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2010.04.005>.
7. Denning DW. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362: 1142–1151. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14472-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14472-8).
8. Cornely OA. 2008. *Aspergillus* to Zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. *Infection* 36: 296–313. <https://doi.org/10.1007/s15010-008-7357-z>.
9. Perlin DS. 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 10:121–130. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2007.04.002>.
10. Balashov SV, Park S, Perlin DS. 2006. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2058–2063. <https://doi.org/10.1128/AAC.01653-05>.
11. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2305–2312. <https://doi.org/10.1128/AAC.00262-08>.
12. Dudiuk C, Macedo D, Leonardelli F, Theill L, Cabeza MS, Gamarra S, Garcia-Effron G. 2017. Molecular confirmation of the relationship between *Candida guilliermondii* Fks1p naturally occurring amino acid substitutions and its intrinsic reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 61:pii02644-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02644-16>.
13. Katiyar SK, Edlind TD. 2009. Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1772–1778. <https://doi.org/10.1128/AAC.00020-09>.
14. Ohyama T, Miyakoshi S, Isono F. 2004. FKS1 mutations responsible for selective resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to the novel 1,3-beta-glucan synthase inhibitor arborcandin C. *Antimicrob Agents Chemother* 48:319–322. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.319-322.2004>.
15. Niimi K, Woods MA, Maki K, Nakayama H, Hatakenaka K, Chibana H, Ikeda F, Ueno K, Niimi M, Cannon RD, Monk BC. 2012. Reconstitution of high-level micafungin resistance detected in a clinical isolate of *Candida glabrata* identifies functional homozygosity in glucan synthase gene expression. *J Antimicrob Chemother* 67:1666–1676. <https://doi.org/10.1093/jac/dks112>.
16. Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H. 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces*

- cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. J Bacteriol 179:4096–4105. <https://doi.org/10.1128/jb.179.13.4096-4105.1997>.
17. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Perlin DS. 2010. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. Antimicrob Agents Chemother 54:426–439. <https://doi.org/10.1128/AAC.01256-09>.
 18. Garcia-Effron G, Kontoyiannis DP, Lewis RE, Perlin DS. 2008. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. Antimicrob Agents Chemother 52:4181–4183. <https://doi.org/10.1128/AAC.00802-08>.
 19. Garcia-Effron G, Canton E, Peman J, Dilger A, Roma E, Perlin DS. 2011. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. J Clin Microbiol 49:3257–3261. <https://doi.org/10.1128/JCM.00508-11>.
 20. Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, Park S, Marr KA, Perlin DS. 2007. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. Antimicrob Agents Chemother 51: 1876–1878. <https://doi.org/10.1128/AAC.00067-07>.
 21. Leon M, Sentandreu R, Zueco J. 2002. A single FKS homologue in *Yarrowia lipolytica* is essential for viability. Yeast 19:1003–1014. <https://doi.org/10.1002/yea.893>.
 22. Kelly R, Register E, Hsu MJ, Kurtz M, Nielsen J. 1996. Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. J Bacteriol 178:4381–4391. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4381-4391.1996>.
 23. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, Garcia JL, Garcia MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Guillemin R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jimenez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latge JP, Li W, Lord A, Lu C, Majoros WH, et al. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature 438:1151–1156. <https://doi.org/10.1038/nature04332>.
 24. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. 2000. Fast, simple and highly sensitive double-round polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest 30:511–518. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00659.x>.
 25. Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. 2009. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *fkp1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. Antimicrob Agents Chemother 53:112–122. <https://doi.org/10.1128/AAC.01162-08>.
 26. Katiyar S, Pfaller M, Edlind T. 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 50:2892–2894. <https://doi.org/10.1128/AAC.00349-06>.
 27. Arendrup MC, Perlin DS. 2014. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? Curr Opin Infect Dis 27:484–492. <https://doi.org/10.1097/QCO.000000000000111>.

DISCUSIÓN

5. Discusión

HISTORIA: técnicas de diagnóstico y PCR

En las últimas décadas se viene observando un incremento significativo de las infecciones fúngicas humanas, debido principalmente a los avances médico quirúrgicos, que han permitido la supervivencia de pacientes de por sí vulnerables a este tipo de infecciones (Lass-Flörl, 2009; Sanguinetti, Posteraro, & Lass-Flörl, 2015). Dentro de los hongos causantes de estas infecciones destaca el género *Candida*, que ocupa el cuarto lugar entre los microorganismos aislados en hemocultivo, y presenta una tasa de mortalidad asociada que oscila entre el 30% y el 60% (Bouza & Muñoz, 2008). El diagnóstico de una infección sistémica por *Candida* es difícil debido a la inespecificidad de los síntomas y a las técnicas de diagnóstico empleadas (que son laboriosas y lentas en proporcionar resultados) entre las que se encuentran el hemocultivo, que sigue siendo la técnica referencia pese a su baja sensibilidad, las técnicas serológicas o el examen de cortes histológicos (Posch, Heimdörfer, Wilflingseder, & Lass-Flörl, 2017). El principal inconveniente del hemocultivo radica en su relativamente baja sensibilidad y en el tiempo necesario para la identificación del agente etiológico por lo que el tratamiento antifúngico específico suele iniciarse con retraso, lo que conlleva un aumento de la tasa de mortalidad (Morrell, Fraser, & Kollef, 2005).

Con el fin de superar esta problemática, los laboratorios de micología se han centrado en el desarrollo de nuevas técnicas, entre las cuales destacan la espectrometría de masas, conocida como MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), o la PCR. El MALDI-TOF permite la identificación del microorganismo mediante el análisis proteico del microorganismo, es una técnica precisa que permite llegar a la identificación muy rápidamente sin apenas manipulación de la muestra. Sin embargo, debido a su elevado coste (el aparato tiene un precio de entre 180.000 € - 250.000 €) no está disponible en todos los laboratorios clínicos (Buchan & Ledebor, 2013). Por otro lado, la PCR es una técnica con unos excelentes valores de sensibilidad, especificidad y también con una elevada rapidez y fiabilidad proporcionando resultados (Avni, Leibovici, & Paul, 2011; Ellepola & Morrison, 2005; McCarthy &

Walsh, 2016). La PCR es una técnica capaz de detectar cantidades muy bajas de ADN, hacía mucho tiempo que se empleaba para el diagnóstico de enfermedades víricas y bacterianas, pero fueron Buchman y colaboradores los primeros en demostrar que se podía detectar ADN de *C. albicans* directamente de muestras clínicas mediante PCR (Buchman, Rossier, Merz, & Charache, 1990). Desde entonces muchas han sido las reseñas que han ido apareciendo en la bibliografía científica en torno a esta técnica, protocolos diseñados para la detección de distintas especies fúngicas, desde las más comunes, *Candida* (Carvalho et al., 2007; Fricke et al., 2010) y *Aspergillus* (P. L. White et al., 2010), hasta las menos frecuentes (Arrieta-Aguirre et al., 2017b; Hata, Buckwalter, Pritt, Roberts, & Wengenack, 2008; Hue, Huerre, Rouffault, & de Bievre, 1999; Wedde, Müller, Tintelnot, De Hoog, & Stahl, 1998), o protocolos de PCR panfúngicos (Bezdicek et al., 2016; Lau et al., 2007; Vollmer, Stormer, Kleesiek, & Dreier, 2008). Se han descrito ensayos de PCR capaces detectar ADN fúngico directamente de sangre (Maaroufi et al., 2003), de muestras embebidas en parafina (Muñoz-Cadavid et al., 2010), de muestras orales (RW.ERROR - Unable to find reference:680) o vulvovaginales (Tardif & Schlaberg, 2017; Trama, Mordechai, & Adelson, 2005). Existen distintos métodos enfocados a la mejora de la extracción del ADN fúngico (Metwally et al., 2008), así como distintos sistemas comercializados de PCR (Posch et al., 2017). A pesar de ello la detección de ácidos nucleicos mediante PCR aún no se encuentra aceptada como criterio microbiológico para el diagnóstico de infecciones fúngicas debido a la falta de estandarización y validación de protocolo, y es usada como técnica complementaria a los métodos tradicionales

En este estudio se ha desarrollado un ensayo de qPCR multiplex, útil para la detección e identificación de las 6 especies más frecuentes del género *Candida*. Como modelo para nuestro estudio y con el fin de poder validar el ensayo de qPCR diseñado con muestras clínicas, se emplearon muestras de mucosa oral y vulvovaginal. De este modo, se pudo trabajar con especímenes que contenían material genético humano o de otros microorganismos presentes en ambos nichos que podían amplificarse de manera inespecífica junto con el ADN diana, o compuestos propios de las muestras clínicas que pudieran inhibir la qPCR debido a la interacción con la Taq polimerasa (Winn et al., 2008). La realización de este trabajo con muestras orales y vulvovaginales nos ha permitido además conocer la

distribución de las especies de *Candida* en ambos nichos debido a que se ha trabajado con un número aceptable de muestras

Epidemiología CO y VVC

En lo referente a las muestras orales, los 291 pacientes accedieron a que se les tomase una muestra de su mucosa oral independientemente de que presentasen o no candidiasis oral (CO). El 44,33% de esta población estaba colonizada por alguna de las especies de *Candida*, siendo *Candida albicans* la especie mayoritaria, representado más del 69% de los aislamientos orales. Estos datos concuerdan con los observados en la literatura ya que numerosos estudios apuntan que la presencia de *Candida* en la cavidad oral oscila entre un 20% y un 70% (Aguirre, 2002), siendo *C. albicans* la especie aislada hasta en un 93% de los casos. Tras ella, *Candida glabrata* junto con *Candida tropicalis* son las especies que ocupan el segundo lugar y suelen suponer el 5%-8% de los aislamientos orales (Vazquez & Sobel, 2002), y en este sentido los resultados obtenidos en este trabajo también muestran a *C. glabrata* como la segunda especie aislada con mayor frecuencia, sumando el 11,18% de los aislamientos.

En cuanto a características epidemiológicas, se pudieron recabar reseñas relacionadas con el género y la edad, otro tipo de datos –patologías de base o si eran portadores de prótesis dentales- se notificaron en escasas ocasiones. Con respecto a la edad, se observó una mayor proporción de colonización oral por *Candida* en los pacientes de mayor edad. Éste no es un hecho excepcional, ya que en el caso de la candidiasis oral, la edad avanzada es un factor de riesgo, bien por el estado inmunológico del paciente, por la presencia de diabetes o por el uso de prótesis dentales (Vazquez & Sobel, 2002). Este aumento de la colonización se vio acompañado en los pacientes mayores de 80 años de un cambio en la distribución de las especies, llegando a representar las especies de *Candida* no-*Candida albicans* (NCA) más del 50% de los aislamientos, cambio ya observado por diversos autores en personas de edad avanzada (de Resende, de Sousa, Lourimar Viana Nascimento Franco, de Oliveira, Rita Cássia Botelho Weikert, Koga-Ito, & Lyon, 2006; Grimoud et al., 2005; Kleinegger, Lockhart, Vargas, & Soll, 1996).

Por otro lado, se obtuvieron 128 muestras vulvovaginales de mujeres que acudieron a la consulta de las matronas. En este grupo muestral se obtuvo un cultivo positivo de *Candida* para el 60,9% de la población y, al igual que ocurrió con las muestras orales, *C. albicans* fue la especie prevalente seguida de *C. glabrata* y, en este caso, *Candida parapsilosis*. Esta distribución por especies concuerda con lo descrito por distintos autores, que señalan *C. albicans* seguida por *C. glabrata* como los principales agentes etiológicos de la vulvovaginitis candidiásica (VVC) (Goncalves et al., 2016; J. D. Sobel, 2007b), y eso a pesar de no ser una enfermedad bien caracterizada epidemiológicamente (Ilkit & Guzel, 2011). Se estima que la incidencia de las especies NCA está aumentando en las distintas formas de candidiasis (Martins et al., 2010; Sanguinetti et al., 2015; Silva et al., 2012), en este sentido la VVC es una infección muchas veces autodiagnosticada por las propias mujeres, y este hecho junto con la disponibilidad sin receta médica de antimicóticos de uso tópico, conlleva un tratamiento inadecuado con dosis inferiores a las recomendadas y con periodos de tratamiento más breves o más largos a los indicados por los clínicos. Esto implicaría una selección positiva hacia otras especies de *Candida* con una menor sensibilidad a compuestos azólicos – *C. glabrata*, *C. tropicalis* o *Candida krusei*-, sin embargo, ningún estudio ha podido constatar este cambio epidemiológico en este tipo de candidiasis (Marchaim, Lemanek, Bheemreddy, Kaye, & Sobel, 2012). Tampoco en este estudio se pudo constatar un incremento de las especies NCA con respecto a los estudios consultados (J. D. Sobel, 2016; J. D. Sobel, 2007b), y *C. albicans* sumó el 93,67% de todos los aislamientos vulvovaginales.

Ciertamente, no existen estudios epidemiológicos fiables sobre la VVC y la vulvovaginitis candidiásica recurrente (VVCR) (Rathod & Buffler, 2014; J. D. Sobel, 2016), debido principalmente a la disponibilidad sin receta de los antifúngicos tópicos y a la falta de diagnóstico por parte de los clínicos que ello conlleva (J. D. Sobel, 2016). Sin embargo, hay descritos algunos factores de riesgo para la VVC y la VVCR, destacando entre ellos el embarazo, la diabetes mal controlada, las inmunodeficiencias, los antibióticos o los anticonceptivos hormonales (Patel et al., 2004). Existe también la hipótesis de que una respuesta inmunológica excesiva sea la base de alguno de los casos recurrentes, ya que muchas de las mujeres con VVCR padecen atopia o rinitis alérgica (Cararach-Tur et al., 2013).

Por todo ello, se realizó una encuesta a todas las mujeres que participaron en este estudio, con el fin de verificar la relación entre los episodios de candidiasis, tanto ocasionales como recurrentes, con alguno de los factores de riesgo descritos en la literatura. Se observó, como ya ha sido demostrado en publicaciones anteriores que el embarazo supone un factor de riesgo para el desarrollo de VVC (Goncalves et al., 2016). Este hecho puede deberse al incremento del nivel de estrógenos durante el embarazo, lo que justificaría otro de los factores de riesgo, el uso de anticonceptivos hormonales, aunque en este trabajo no pudo establecerse dicha relación de manera significativa. Asimismo, otros de los factores analizados, diabetes, rinitis alérgica o el empleo de antibióticos, tampoco pudieron ser asociados a esta infección vulvovaginal ($P > 0,05$). El análisis de una muestra de mayor tamaño sería determinante para poder establecer o rechazar una asociación estadísticamente significativa entre estos factores de riesgo y la VVC o la VVCR.

Aun así, muchas mujeres que padecen VVCR no presentan ninguno de estos factores de riesgo. Se han detectado polimorfismos en determinados genes y alteraciones de la inmunidad innata que podrían jugar un papel importante en el origen de la VVC y de la VVCR (Rosentul et al., 2009). El análisis de los polimorfismos de estos genes en mujeres asintomáticas y mujeres con distintos episodios de VVC podría ser interesante de cara al futuro para poder dilucidar las causas de la recurrencia en estas infecciones.

PCR a tiempo real para el diagnóstico

Como se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico de una infección por *Candida* es complejo debido a la inespecificidad de los síntomas y a que el cultivo, la técnica convencional para la identificación de hongos, requiere la presencia de microorganismos viables en muestras biológicas. Además, se precisan varios días para que éste sea positivo y la posterior identificación de los hongos aislados mediante diversas técnicas (Ellepola & Morrison, 2005). En el caso de las micosis invasoras es imprescindible un diagnóstico rápido y preciso, tanto por la gravedad de la infección como por el mal estado general del paciente. La técnica de referencia en este tipo de infecciones sigue siendo el hemocultivo, el cual posee una baja sensibilidad, cercana al 50%. Por otro lado, se estima que *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* causan más del 90% de las

candidiasis invasoras en humanos, con la lista de especies causantes de infecciones en aumento (M. A. Pfaller & Diekema, 2007), por ello resulta primordial la identificación del agente etiológico, sobre todo teniendo en cuenta que las distintas especies muestran distintos grados de sensibilidad frente a fármacos antifúngicos. El diagnóstico de la CO y de la VVC se realiza principalmente mediante el cultivo (J. Sobel & Akins, 2015), en estas infecciones de la mucosa también está sucediendo presumiblemente un cambio epidemiológico, con hasta un 30% de los casos de VVC causados por especies NCA (Vermitsky et al., 2008b). Sin embargo, poco se sabe de la VVC causada por especies NCA, en parte porque son poco frecuentes los casos, pero también porque en la práctica clínica hasta hace poco no era necesario el cultivo para el diagnóstico de la VVC (Kennedy & Sobel, 2010). Y ciertamente, a pesar de que la mera presencia del hongo no sea suficiente para confirmar una candidiasis ya que *Candida* spp. son colonizadores habituales de las mucosas (Revankar & Sobel, 2012), los aislamientos de origen vulvovaginal obtenidos de mujeres con síntomas de infección deberían no sólo ser identificados, si no que se debería evaluar su potencial patogénico y su susceptibilidad frente a los antimicóticos antes de decidir el tratamiento adecuado.

Por lo tanto, uno de los objetivos de este estudio fue el desarrollo de una técnica rápida y fiable para la detección e identificación de distintas especies del género *Candida*. Tras consultar publicaciones previas (De Marco et al., 2007; Khot & Fredricks, 2009; Trama et al., 2005; P. L. White et al., 2004), se optó por un ensayo de PCR a tiempo real, o qPCR, con sondas marcadas con distintos fluoróforos como la técnica idónea para lograr nuestro objetivo. Mediante esta qPCR se pretendía detectar, diferenciar y cuantificar de manera conjunta las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, y *C. tropicalis*, al ser las de mayor interés clínico. Asimismo, se incluyó *C. krusei* dada su importancia debido a su resistencia intrínseca a los compuestos azólicos, aunque no se obtuvo ningún aislamiento de estas especies en las muestras estudiadas.

El ensayo de qPCR con sondas desarrollado en este estudio se basa en el marcaje de las mismas con distintos fluoróforos y en la actividad exonucleasa 5' → 3' de la Taq polimerasa (Holland, Abramson, Watson, & Gelfand, 1991). Asimismo, se seleccionó la región del ADN ribosómico (ADNr), que incluye los genes

conservados 18S, 5.8S y 28S, y las regiones altamente variables ITS1 e ITS2, como diana de nuestro ensayo de qPCR. Siguiendo las recomendaciones de Khot y Fredricks (Applied Biosystems, 2001; Khot & Fredricks, 2009) se diseñó una única pareja de cebadores, Diamol-F y R, que hibridan en las regiones 18S y 5.8S de cualquiera de las 6 especies de *Candida*, y que generan además unos amplicones del tamaño óptimo en lo que a eficiencia de qPCR se refiere (50-150 pb) (Applied Biosystems, 2001).

El producto de amplificación generado por los cebadores Diamol-F y R contenía la región hipervariable ITS1, donde se diseñaron las 6 sondas Taqman de hidrólisis, específicas para la detección y discriminación de las 6 especies de mayor relevancia clínica. Tres sondas se marcaron con el fluoróforo FAM y las otras 3 con HEX, de este modo se podían incluir dos sondas, cada una marcada con un fluoróforo distinto, en un mismo tubo de PCR permitiendo así la detección simultánea de dos especies, desarrollando por lo tanto un ensayo de qPCR multiplex.

Con el fin de detectar un posible efecto inhibitorio debido a la presencia de compuestos no controlados en las muestras clínicas, y siguiendo las recomendaciones de distintos autores (Bustin et al., 2009; Khot & Fredricks, 2009), se diseñó un control interno (CI) de amplificación y una sonda marcada con un fluoróforo distinto, ROX, para la detección específica del CI para incluirlos en cada reacción de qPCR. Este control consistía una secuencia de ADN aleatoria, sin homología con ninguna de las especies de *Candida*, cuyos extremos 5' y 3' correspondían a las secuencias de los cebadores Diamol-F y R, respectivamente.

Previo al desarrollo de la qPCR multiplex, se comprobó el funcionamiento de los cebadores con cada una de las sondas por separado. Todas las sondas mostraron ser específicas, así, cada una de ellas detectó únicamente la especie para la cual había sido diseñada. A continuación, y con objeto de detectar hibridaciones inespecíficas de las sondas con especies que pueden estar presentes en la microbiota humana, lo que daría lugar a falsos positivos (FP), se comprobó el funcionamiento de las sondas con distintas especies de levaduras, hongos, bacterias y ADN humano. En este sentido, ninguna de las sondas emitió señal con ninguno de los microorganismos de probados, a excepción de la sonda Cgla, que

produjo reacción cruzada con *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe destacar que *C. glabrata* se encuentra filogenéticamente más cercana a *S. cerevisiae* que a algunas de las especies clínicamente relevantes de *Candida* (Moran et al., 2012). Por otro lado, hemos de resaltar que no hubo señal positiva con ADN humano para ninguna de las 6 sondas, y esto implica que habíamos superado uno de los retos a los que se enfrenta el diagnóstico molecular, que es la capacidad de detectar específicamente los microorganismos diana en presencia de una gran cantidad de ADN humano presente en la muestra (Dalla-Costa et al., 2017). Aunque el hecho de haber diseñado los cebadores Diamol-F y Diamol-R en regiones altamente conservadas, como son los genes 18S y 5.8S, posibilitaba la amplificación de ADN humano, ninguna de las sondas emitió señal debido a la no hibridación con ADN humano, evidenciando nuevamente la especificidad de las sondas diseñadas en este trabajo.

Por otro lado, muchas de las especies fúngicas potencialmente patógenas que han aparecido en las últimas décadas pertenecen a especies crípticas que forman parte de complejos de especies, destacando los complejos de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Guarro, 2012). La sonda Cpar3 no mostró reacción cruzada con las especies *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*, lo cual demuestra que Cpar3 detecta *C. parapsilosis sensu stricto* de manera específica. Debido a que las sondas Calb y Cgla emitieron señal con todas las especies de sus correspondientes complejos, se diseñaron las nuevas sondas Calb2 y Cgla2. La sonda Calb2 no mostró reacción cruzada con ninguno de los aislamientos de *Candida dubliniensis*, aunque hibridó con *Candida africana* de manera previsible ya que la secuencia de la región ITS1 es idéntica para ambas especies. De hecho, varios son los autores que no consideran *C. africana* como una especie distinta de *C. albicans*, sino como a una variante atípica de la misma (Theill et al., 2016). Por último, la sonda Cgla2 emitió señal con todas las especies del complejo *C. glabrata*, es necesario por tanto realizar ajustes en el diseño de la sonda para asegurar una hibridación específica con *C. glabrata*.

También se analizaron los límites de detección de la qPCR, observando que nuestro ensayo poseía una elevada sensibilidad analítica al mostrar unos límites de detección de ADN genómico de hasta 20 fg para las 6 sondas diseñadas, un valor

similar a los 10 fg obtenidos por Kasai y colaboradores que también emplearon el complejo de rDNA como diana de amplificación para *C. albicans* (Kasai et al., 2006). La diana elegida en este trabajo es un gen multicopia, y aunque hay autores que estiman un número determinado de copias de este gen por especie (Jones et al., 2004), otros autores defienden que el número de repeticiones varía ampliamente entre cromosomas homólogos y entre cepas (Magee, 2007), lo cual impide determinar el límite de detección en base al número de “genomas/células” y la cuantificación de la carga fúngica.

Una vez comprobado el correcto funcionamiento de los cebadores y las sondas por separado se desarrolló la qPCR multiplex combinándolas en una misma reacción, posibilitando la detección conjunta de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. guilliermondii* y por último *C. tropicalis* y *C. krusei*. Cabe destacar que la qPCR multiplex mostró los mismos límites de detección que los observados en las reacciones individuales (20 fg). El tercer canal de fluorescencia del termociclador se utilizó para la detección del CI, el cual al estar marcado con ROX, se podía añadir a todos los tubos permitiendo la detección de falsos negativos (FN) en todas las muestras. No obstante, el ROX suele estar incluido en los buffers de los kits comerciales de qPCR, se emplea para normalizar la señal de fluorescencia y poder establecer así el ciclo umbral (Ct). Se realizaron las reacciones de qPCR múltiple con y sin el CI, y se observó que cuando se añadía el CI marcado con ROX no se podía normalizar la reacción ni establecer el Ct. Esto nos llevó a tener que prescindir del CI, perdiendo así la oportunidad de detectar los casos FN. El número de canales de fluorescencia que poseen los termocicladores suponen un factor limitante de la qPCR multiplex (Valero, de la Cruz-Villar, Zaragoza, & Buitrago, 2016), sin embargo, este hándicap podría resolverse utilizando un termociclador con un mayor número de canales que posibilite el marcaje del CI con un fluoróforo distinto al ROX, o introducir un mayor número de controles positivos de PCR. Aun así, es importante destacar que la qPCR múltiple mostró los mismos límites de detección que los observados en las reacciones individuales (20 fg).

Por otro lado, la obtención del ADN del hongo a partir de la compleja matriz en la que éste se encuentra supone un punto clave en la puesta a punto de la técnica de qPCR (Metwally et al., 2008). Prueba de ello son los numerosos trabajos que hay en

la literatura comparando distintos protocolos para la extracción de ácidos nucleicos (Maaroufi, Ahariz, Husson, & Crokaert, 2004; Metwally et al., 2008; P. L. White, Shetty, & Barnes, 2003). El método empleado ha de ser capaz de lisar la pared fúngica, que es un procedimiento complejo en hongos (Muller et al., 1998), y de aislar la mayor cantidad posible de ADN fúngico, evitando copurificar ADN humano o de otros microorganismos que pudieran estar presentes en la muestra e interferir en los análisis posteriores. La extracción manual de ácidos nucleicos está cada vez más en desuso debido a la laboriosidad del proceso junto con el mayor riesgo de contaminaciones cruzadas. Por ello varias han sido las casas comerciales que han desarrollado sistemas de extracción automatizados que han sido aplicados para la detección de microorganismos mediante PCR (Costa et al., 2002; Loeffler, Schmidt, Hebart, Schumacher, & Einsele, 2002), destacando entre ellos el sistema MagNA Pure de Roche. Este protocolo es significativamente más rápido que los protocolos manuales, permitiendo un diagnóstico más eficiente. Además, el empleo de controles negativos de extracción de ADN demostró que este método es el menos propenso a la contaminación, y, por tanto, se esperan menos resultados falsos positivos (FP). Este proceso se realiza casi exclusivamente dentro de un único espacio, que es el propio sistema MagNA Pure, evitando así la manipulación excesiva de las muestras y la exposición a potenciales fuentes de contaminación de ADN fúngico (Khot & Fredricks, 2009; Loeffler et al., 1999). Nuestros resultados están en concordancia con lo reportado en la literatura (Bretagne & Costa, 2005; Bretagne & Costa, 2006; Costa et al., 2002; Loeffler, Swatoch, Akhawi-Araghi, Hebart, & Einsele, 2003), y refuerzan el progresivo abandono de los métodos manuales de extracción a favor de las técnicas automatizadas, las cuales constituyen un paso fundamental para la anhelada estandarización de la técnica de PCR como herramienta para el diagnóstico de las infecciones fúngicas.

Hemos de mencionar que las muestras orales fueron empleadas para la puesta a punto del protocolo de extracción de ADN y posterior qPCR. Los resultados obtenidos fueron muy variables, dependientes del protocolo de extracción, y del tiempo que los hisopos estuvieron guardados a 4°C, previo a la extracción de ADN. Es por ello por lo que no se han incluido en este trabajo las reacciones de qPCR obtenidas a partir de estos hisopos orales, y el análisis posterior sólo incluyó los resultados de qPCR obtenidos con las muestras vulvovaginales.

Nuestro ensayo de qPCR multiplex con ADN de los cultivos fúngicos diseñado para detectar 6 especies de *Candida* mediante sondas específicas resultó prometedor debido a los buenos resultados obtenidos, por lo que se procedió a su validación con muestras clínicas de origen vulvovaginal. En el caso de la sonda Calb, tras aplicar el nuevo punto de corte mediante el cual se estableció que todas las muestras con un valor de Ct superior a 30 eran consideradas negativas, se obtuvo un valor de sensibilidad superior al 91%. Resultado que supuso una mejora con respecto a los resultados obtenidos con muestras vulvovaginales por Giraldo y colaboradores (29,4%) (Giraldo et al., 2000), Xiang y colaboradores (49%) (H. Xiang, Xiong, Liu, & Tu, 2007) o Weissenbacher y colaboradores (42%) (Weissenbacher et al., 2009). Por otro lado, las sondas Cgla y Ctro2 detectaron aquellas especies de *Candida* para las cuales habían sido diseñadas, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, respectivamente. En el caso de la sonda Cpar3, no se pudieron diagnosticar mediante qPCR las dos muestras que resultaron ser positivas para *C. parapsilosis* mediante cultivo, debido probablemente a que ambas muestras mostraban una baja carga fúngica, con 1 y 2 colonias. Este hecho podría suponer un inconveniente a la hora de aplicar el ensayo diseñado en pacientes con infecciones sistémicas, debido a que estas infecciones presentan niveles bajos de células fúngicas en sangre, encontrándose frecuentemente entre 1 y 100 ufc/ml (Reiss & Morrison, 1993). Finalmente, no se pudo valorar la sensibilidad de las sondas Cgui4 y Ckru2 en muestras vulvovaginales, ya que no hubo ningún cultivo positivo para estas especies en la población estudiada.

En cuanto a la especificidad de la sonda Calb, tras bajar el punto de corte a 30 ciclos, se obtuvo un valor superior al 89%, lo cual permite descartar de manera fiable en las muestras negativas por qPCR la infección causada por *C. albicans*, además supone una mejora con respecto a los valores obtenidos por Mårdh y colaboradores (~50%) (Cartwright et al., 2013; Mårdh, Novikova, Witkin, Korneeva, & Rodrigues, 2003) y están próximos a los excelentes valores obtenidos por Cartwright y colaboradores (Cartwright et al., 2013). Para el resto de las sondas cabe destacar que únicamente se obtuvo un resultado FP para la sonda Cgla. Las especies de *Candida* son colonizadores habituales de las mucosas, su presencia en la vagina y detección por qPCR no debería considerarse por tanto como un caso FP debido a que la qPCR detectó aquello para lo que se había

diseñado. El hecho de que el origen de nuestras muestras sea un nicho no estéril justificaría el cambio del punto de corte del Ct de 40 a 30 ciclos. Además, varios autores apuntan a que el número máximo de ciclos de la PCR en muestras no estériles debería ser menor de 40, debido precisamente a su alta sensibilidad (J. Sobel & Akins, 2015).

La obtención de resultados FP es uno de los principales inconvenientes de una técnica tan sensible como es la qPCR. *Candida albicans* es un hongo ubicuo, y como tal, su presencia supone un riesgo de contaminación de muestras y reactivos. Debido a ello se intentó llevar a cabo todas las extracciones de ADN y todas las reacciones de qPCR siguiendo las recomendaciones de esterilidad propuestas por Khot y Fredricks (Khot & Fredricks, 2009): en una primera habitación se trabajó con los reactivos de PCR, en una segunda habitación se realizaron las extracciones de ADN y era aquí donde se añadía el ADN molde a las reacciones de qPCR, y en la última habitación se manipularon los amplicones, en caso necesario. Además, se realizaron junto con las muestras vulvovaginales controles negativos de extracción con el fin de poder detectar estos FP debidos a la contaminación exógena. Las reacciones de qPCR llevadas a cabo con los controles mostraron amplificación en el 66,6% de estas muestras (12 de 18) con la sonda Calb. Mientras que aplicando el punto de corte de 30 ciclos se consiguió reducir el número de positivos a 1. No obstante, estos datos indican que hemos de seguir mejorando en el desarrollo de esta técnica tan sensible. Cabe destacar que según se iba avanzando en el desarrollo del trabajo, los valores de los Cts de estos controles iban en aumento, indicando que las medidas que íbamos tomando eran las adecuadas.

Por último, destacar el potencial de este ensayo de qPCR multiplex como técnica diagnóstica de infecciones por *Candida*. En lo que a candidiasis de la mucosa se refiere, desde nuestro punto de vista creemos que la identificación de la especie causante de la VVC es necesaria, a pesar de que tratándose de un nicho anatómico no estéril la mera presencia del hongo no implique causalidad. Sin embargo, *Candida* es un patógeno del aparato genital, y su detección junto con la pericia clínica del personal que atiende a la paciente, decidirá qué papel juega el hongo y cuál es el tratamiento adecuado. Las especies NCA de *Candida* muestran una menor sensibilidad (*C. glabrata*) o incluso resistencia (*C. krusei*) a los azoles, con lo cual

antes de iniciar el tratamiento antimicótico, el clínico debería conocer la sensibilidad del agente etiológico frente al fármaco de elección. Asimismo, aunque hay autores que niegan empíricamente la capacidad de las especies no-*C. albicans* para causar infección vaginal (Agatensi et al., 1991; Dennerstein, Ellis, Reed, & Bennett, 2011), otros no han obtenido los mismos resultados y apelan a la necesidad de un gran estudio epidemiológico, multicéntrico, para poder determinar el papel etiopatológico de estas especies (Kennedy & Sobel, 2010).

Diagnóstico molecular de la resistencia basado en la secuenciación

Las pacientes con VVC y VVCR son tratadas en nuestro país con imidazoles, como el clotrimazol, o triazoles, principalmente fluconazol. El análisis de la sensibilidad in vitro de los aislamientos vulvovaginales de este trabajo a estos compuestos mostró que el 97,2% de los aislamientos de *C. albicans* eran sensibles a ambos azoles. Los aislamientos de *C. glabrata* y *C. tropicalis*, por el contrario, eran resistentes a ambos compuestos. Estos resultados corroboran lo descrito previamente, la excelente actividad de los azoles frente a *C. albicans* en episodios no complicados de VVC, y la moderada actividad antifúngica de éstos frente a las especies no-*albicans* de *Candida* (Choukri, Benderdouche, & Sednaoui, 2014; Liu, Fan, Peng, & Zhang, 2014; Richter et al., 2005).

Sin embargo, cada vez son más frecuentes los aislamientos vulvovaginales resistentes de *C. albicans* (Gamarra et al., 2014; Marchaim et al., 2012). Muchos autores ya apuntaban desde hacía tiempo a la exposición previa a fármacos antifúngicos como causante de este cambio epidemiológico (Dun, 1999). Este fenómeno de resistencia adquirida tras la exposición a fluconazol está ampliamente documentado en aislamientos orales de *C. albicans* aislados de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (RW.ERROR - Unable to find reference:602; M. A. Pfaller et al., 1994; Redding et al., 1994; Rex, Rinaldi, & Pfaller, 1995; Sanglard et al., 1995; T. C. White, 1997b). En estos pacientes, aunque inicialmente responden bien al tratamiento con fluconazol, es difícil erradicar completamente el hongo y las recaídas son frecuentes. Debido a ello, muchos son expuestos a largos y discontinuos tratamientos con fluconazol, promoviendo así la aparición de cepas resistentes (T. C. White, 1997b). De un modo similar, a las mujeres que padecen VVC de manera recurrente se les

prescriben azoles de manera empírica, lo que unido a la disponibilidad de tratamientos sin receta, o la prescripción de tratamientos a bajas dosis durante periodos cortos de tiempo, crean las condiciones idóneas para la evolución, aparición y expansión de cepas vulvovaginales resistentes (Marchaim et al., 2012). Asimismo, existen otros posibles factores, específicos de los aislamientos vulvovaginales, que contribuyen a la resistencia, tales como la baja biodisponibilidad del fluconazol en la vagina, lo que implica una exposición al fármaco a una concentración 12 veces menor que en otros tejidos, con lo que los aislamientos vaginales están expuestos a concentraciones bajas de fluconazol. Por otro lado, el pH ácido de la vagina puede inhibir la actividad de las bombas Mdr1p, ya que éstas son dependientes del gradiente de protones. Por este motivo, el pH de la vagina es importante a la hora de determinar la sensibilidad frente a un fármaco antifúngico, debido a que los valores de CMI son dependientes del pH (Bhattacharya, Sobel, & White, 2016). De hecho, se ha observado que en aislamientos vulvovaginales de *C. albicans* con sensibilidad reducida los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para compuestos azólicos van en aumento a medida que se reduce el pH, lo que podría comprometer la sensibilidad de estas cepas en pHs bajos como el de la vagina (Danby, Boikov, Rautemaa-Richardson, & Sobel, 2012b).

El análisis de aislamientos de *C. albicans* seriados, es decir, de cepas isogénicas inicialmente sensibles que se tornan resistentes posteriormente, es muy útil a la hora de elucidar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de resistencia a azoles. Este tipo de estudio ya se había realizado con cepas orales y sistémicas, pero fueron Bhattacharya y colaboradores, tras analizar aislamientos vulvovaginales seriados de *C. albicans*, los primeros en comprobar que estos mismos mecanismos eran compartidos por cepas vulvovaginales y que, al igual que en los aislamientos orales, la sobreexpresión de los genes codificantes de bombas de eyección era el principal mecanismo de resistencia (Bhattacharya et al., 2016).

Actualmente el diagnóstico de la resistencia se realiza principalmente empleando métodos basados en el cultivo, los cuales requieren entre 48 y 72 horas para alcanzar el resultado (Perlin, 2009). Sin embargo, desde los laboratorios de micología clínica se reclama el desarrollo de técnicas más rápidas. Varios autores

han conseguido elucidar varios de los mecanismos desarrollados por *C. albicans* para neutralizar los efectos de los fármacos. Se tratan de mutaciones puntuales en el gen *ERG11*, las cuales conllevan alteraciones en la diana de los azoles (Favre et al., 1999), y de las mutaciones denominadas GOF (*Gain-of-Function*) identificadas principalmente en los factores de transcripción Tac1, Mrr1 y Upc2, las cuales dan lugar a alelos hiperactivos (Sanglard, 2011c). Dada la disponibilidad de esta información genética, la detección de la resistencia se podría realizar con técnicas moleculares basadas en la secuenciación de determinados segmentos de ADN estos genes. Es por ello que partiendo de aislamientos vulvovaginales de *C. albicans* con sensibilidad reducida a azoles, nos propusimos la caracterización mediante identificación de mutaciones puntuales en el gen *ERG11*, codificante de la proteína diana de los azoles, y de los factores de transcripción Tac1 y Upc2, reguladores de los genes *CDR* (A. T. Coste et al., 2004) y *ERG11* (Flowers et al., 2012), respectivamente. De este modo, se podría contribuir con nuevos marcadores de resistencia que pudieran considerarse marcadores a la hora de aplicar técnicas moleculares para el diagnóstico de la resistencia.

En concordancia con lo consultado en trabajos previos (Richter et al., 2005), se obtuvieron escasos aislamientos vulvovaginales con sensibilidad reducida a azoles, únicamente dos aislamientos (BE-113 y BE-114) que mostraron sensibilidad dosis dependiente a fluconazol y clotrimazol. Ambas pacientes habían reportado múltiples episodios anteriores de VVC, e incluso una de ellas había llegado a participar en un ensayo clínico de una vacuna para prevenir la candidiasis, y habían sido tratadas con azoles en numerosas ocasiones. Estos antecedentes sugerían que ambos aislamientos podían haber resultado seleccionados por la presión selectiva ejercida por los azoles. Si esto fuese así, ambos clones podrían portar mutaciones GOF, las cuales se habrían fijado en ambas poblaciones fúngicas a causa de la presión ejercida por el fármaco, dando como resultado un genotipo y fenotipo resistentes.

Como no disponíamos de aislamientos isogénicos seriados se estudiaron aislamientos de *C. albicans* de la colección del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco. También se realizó el análisis de las cepas de

referencia ATCC 64550, ATCC 64124 y SC5314, resistentes a azoles las dos primeras y sensible a todos los compuestos azólicos, la última.

Muchos de los aislamientos clínicos guardados en agua durante un largo período de tiempo y catalogados en su día como resistentes a alguno de los compuestos azólicos, resultaron ser sensibles a estos compuestos. Este hecho podía deberse a una clasificación incorrecta de los aislamientos debido a una lectura errónea de las pruebas, dejando patente el problema de la interpretación debido al efecto “trailing” (crecimiento residual) en los aislamientos de *C. albicans* (M. Lee, Williams, Warnock, & Arthington-Skaggs, 2004). No se detectó en estos aislamientos sensibles ni una de las mutaciones asociadas a resistencia descritas en la literatura (Flowers et al., 2012; Sanglard, 2011c), por lo que estos aislamientos podrían haber desarrollado mecanismos transitorios para superar la presión del fármaco, y que una vez eliminado éste del medio hubiesen retornado a su fenotipo sensible.

En referencia al gen *ERG11*, la secuenciación y posterior comparación con la secuencia de referencia X13296 permitió la identificación de un gran número de mutaciones, tanto sinónimas como no-sinónimas, lo que pone de manifiesto una vez más el elevado grado de polimorfismo de este gen (Morio et al., 2010). En cuanto a las sustituciones no-sinónimas, se identificaron varias de las sustituciones relacionadas con la resistencia, en las cuales se ha comprobado de manera empírica, bien clonando el alelo portador de la mutación en una cepa sensible o bien mediante pruebas de cinética enzimática, su implicación directa en la resistencia, se trataba de las mutaciones A118S (M. Xiang et al., 2013), Y132H (Kakeya et al., 2000; S. L. Kelly et al., 1999; Sanglard et al., 1998), K143R (M. Xiang et al., 2013), Y257H (M. Xiang et al., 2013), R467K (RW.ERROR - Unable to find reference:602; Lamb et al., 2000; Sanglard et al., 1998; T. C. White, 1997c). O bien aquellas mutaciones que únicamente se han identificado en aislamientos resistentes de *C. albicans* como G450E o Q474K (Morio et al., 2010). Otras se han descrito por primera vez en este trabajo; entre ellas, S42L, D225N y P236H se detectaron tanto en aislamientos sensibles como en resistentes, lo que descarta su participación en la resistencia. Otras de las sustituciones nuevas, F319L y Q479R, se detectaron exclusivamente en cepas resistentes, lo que podría indicar que se

trata de mutaciones relacionadas con la resistencia. Sin embargo, se desconoce su implicación, por ello nuestro grupo de trabajo se centrará en un futuro en dilucidar la función de estas nuevas mutaciones mediante la expresión heteróloga de las mismas.

Por otro lado, el gen *TAC1*, que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 5 junto con el gen *ERG11*, al igual que éste resultó ser muy polimórfico y con una elevada tasa de heterozigosidad. En este aspecto, habría que destacar que la secuenciación del genoma de *C. albicans* en 2004 (Jones et al., 2004) reveló una elevada tasa de heterozigosidad, algo sorprendente ya que se trata de un organismo que se reproduce de manera asexual. Se calcula que existen unos 62.000 puntos heterozigóticos en todo el genoma, es decir uno cada 237 bases, y éstos no están distribuidos uniformemente por todo el genoma, siendo los cromosomas 5 y 6 los que poseen una mayor tasa de heterozigosidad (Magee, 2007). Por lo tanto, parece razonable la gran cantidad de sustituciones de nucleótidos, sinónimas y no-sinónimas, que se detectaron. La mayoría de las mutaciones de *TAC1* identificadas en este trabajo ya estaban descritas y era conocida su falta de implicación en la resistencia a azoles, debido a que se habían detectado tanto en cepas sensibles como en resistentes (Morio et al., 2013). Tal es el caso de las mutaciones N396S, identificada en todos los aislamientos analizados en este trabajo, D776N, E829Q o S941P. Al igual que ocurrió con el gen *ERG11*, se detectaron dos mutaciones ya descritas y relacionadas con la resistencia a azoles, la delección $\Delta 962-969$ (A. Coste et al., 2007) y N977D (A. Coste et al., 2006), ambas en heterozigosis, en uno de los aislamientos resistentes de la colección y en la cepa de referencia ATCC 64124, respectivamente. Se han descrito otras mutaciones por primera vez en este estudio, destacando entre ellas S758F, que se identificó sólo en el aislamiento vulvovaginal BE-113, procedente de una paciente con repetidos tratamientos antifúngicos, y que además mostraba una sensibilidad reducida a azoles. Esta mutación se localizaba en la región carboxilo terminal del factor de transcripción, una región con un posible dominio de activación donde, además, se localizan la mayoría de las mutaciones GOF de *TAC1* (Sanglard, 2011c). Cabe destacar que esta mutación se detectó en ambos alelos, en la línea con lo indicado por algunos autores que apuntaban a la obligatoriedad de que las mutaciones GOF se encuentren en homocigosis para resultar en un alelo hiperactivo y, por lo tanto,

en un fenotipo resistente (A. T. Coste et al., 2004). Estas mutaciones aparecen inicialmente en uno de los alelos, después sucede alguna alteración genómica relacionada con la pérdida de la heterocigosidad, de modo que los dos alelos sean idénticos (Ford et al., 2015), y de hecho, los aislamientos de *C. albicans* resistentes son homocigosos para el gen *TAC1* (Morschhäuser, 2016). Sin embargo, Sasse y colaboradores observaron, tras introducir mutaciones de manera escalonada en ambos alelos, que las mutaciones en heterocigosis también conferían resistencia, aunque en un menor grado que el observado en las que se encuentran en homocigosis (Sasse et al., 2012). El hecho de haber detectado S758S en homocigosis reforzó la hipótesis de que esta mutación pueda estar implicada de manera directa en la resistencia.

Finalmente, se identificaron dos de las siete mutaciones descritas en la literatura (Flowers et al., 2012) para el gen *UPC2*, A643V y G648S, ambas en heterocigosis y en cepas resistentes. No se identificó en este gen ninguna mutación nueva, ni ninguna mutación sinónima, lo que indicaba que se trataba de un gen no tan polimórfico como *ERG11* y *TAC1*, de hecho, este gen se encuentra localizado en el cromosoma 1 (Heilmann et al., 2010), que no es tan variable como los cromosomas 5 y 6 (Magee, 2007).

No se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre las distintas mutaciones y los distintos perfiles de resistencia observados en los aislamientos resistentes. Si bien es cierto que todos los aislamientos albergaban alguna de las mutaciones ya descritas y relacionadas con más de un mecanismo de resistencia, y todos ellos mostraban resistencia cruzada a distintos azoles, lo que implicaría un posible efecto colaborativo de estas mutaciones. El aislamiento BE-113, resistente a posaconazol, itraconazol y voriconazol, y con una sensibilidad reducida a clotrimazol y fluconazol, era portador de dos mutaciones en homocigosis en *ERG11*; la cepa 15-176 de la colección, resistente a todos los azoles, excepto a itraconazol, al cual mostraba sensibilidad reducida, portaba mutaciones GOF en los tres genes estudiados, en homocigosis en *ERG11* y en heterocigosis en *TAC1* y *UPC2*; las cepas 16-091 y 16-123, ambas aisladas de la misma paciente con VVCR, resistentes a fluconazol y con una sensibilidad reducida a voriconazol portaban dos mutaciones en *ERG11* y otra en *UPC2*, en homocigosis las primeras, y

en heterocigosis la segunda. En cuanto a la cepa de referencia ATCC 64124, resistente a todos los azoles, portaba dos mutaciones en *ERG11* en homocigosis y una mutación en *TAC1* en heterocigosis. El escaso número de aislamientos resistentes portadores de mutaciones que hemos podido analizar en este trabajo no permitió el análisis estadístico. No obstante, la diversidad de mutaciones detectadas en todos ellos indica, tal y como han observado otros autores, que existen distintos mecanismos por los cuales las células fúngicas pueden adquirir resistencia, y que éstos pueden aparecer de manera simultánea en un único aislamiento, lo que conlleva un efecto aditivo (A. Coste et al., 2007; Morio et al., 2013). Sin embargo, la detección en un aislamiento clínico de *C. albicans* de alguna de las mutaciones en *ERG11*, o de las mutaciones GOF en *TAC1* y *UPC2*, sí que parece predecir un fenotipo resistente, lo que validaría los protocolos de PCR y secuenciación diseñados en este trabajo de tesis como técnicas de diagnóstico molecular de resistencia a azoles. Se trata de un protocolo rápido, preciso y proclive a la estandarización en el laboratorio. En este sentido, el diseño del cebador denominado Tac1-Rv-980 fuera de la región codificante, junto con su pareja Tac1-Fw-673, permitió analizar el extremo 3' del gen *TAC1* hasta la última base, evitando tener que clonar los amplicones, y reduciendo así de manera notable el tiempo hasta el resultado. Además, dado el nivel de heterocigosidad de los genes *TAC1* y *ERG11*, era necesario emplear un sistema que permitiera la detección de puntos heterocigóticos. La secuenciación directa de los amplicones permite esta detección conjunta, la inserción del amplicon en un vector y la posterior secuenciación de éste último, por el contrario, no lo permite.

Por otro lado, en varios de los aislamientos resistentes no se detectó ninguna de las sustituciones implicadas en la resistencia a azoles descritas en la literatura, esto podía deberse a que no se estudiaron las secuencias completas de los genes, sino determinados segmentos, en el caso del factor de transcripción Tac1p se analizó la secuencia comprendida entre los aminoácidos 225 y 461, y la comprendida entre los aminoácidos 673 y el 980, por ser las regiones portadoras de las mutaciones GOF (Sanglard, 2011c). Por la misma razón, se analizó la región comprendida entre los aminoácidos 642 y 648 del factor de transcripción Upc2p (Flowers et al., 2012). Este tipo de análisis excluía, por lo tanto, la detección de mutaciones GOF fuera de las regiones seleccionadas.

No se ha analizado en este trabajo el gen *MRR1*, el cual regula la expresión de *MDR1* (Morschhäuser et al., 2007) y, al igual que *TAC1* y *UPC2*, pertenece a la familia de factores de transcripción con motivos de “grupos de zinc” (MacPherson et al., 2006), está relacionado con la resistencia a azoles y es portador de mutaciones GOF (Dunkel et al., 2008b). Perea y colaboradores se propusieron determinar la contribución específica de cada uno de los mecanismos a la resistencia y observaron que el 85% de los aislamientos analizados sobreexpresaban genes codificantes de bombas de eyección (cuyos genes están codificados por Tac1p), el 65% era portador de mutaciones en *ERG11* y el 35% lo sobreexpresaba (Perea et al., 2001). Debido a ello se decidió comenzar el análisis de las mutaciones GOF por los genes *TAC1*, *ERG11* y *UPC2*. No se ha descartado el análisis de *MRR1*, de hecho, actualmente se está llevando a cabo en nuestro laboratorio el análisis de las secuencias comprendidas entre los aminoácidos 335 y 381 y entre 683 y 998 de este factor de transcripción.

Asimismo, se estima que existen más de 80 factores de transcripción en el genoma de *C. albicans* pertenecientes a la familia con motivos de “grupos de zinc”, la mayoría todavía sin caracterizar (Morschhäuser, 2016). Al igual que sucede con Tac1p, Upc2p o Mrr1p, podría ser posible que alguno de ellos fuera portador de mutaciones GOF relacionadas con la resistencia. Entre ellos destaca el factor de transcripción Mrr2p, regulador de la expresión de *CDR1*, que está relacionado con la resistencia a azoles y en el cual ya se han identificado las primeras mutaciones GOF (Wang et al., 2015). Todos ellos son genes candidatos para futuras investigaciones relacionadas con la búsqueda de mutaciones implicadas en la resistencia a azoles.

A pesar de que en la literatura se ha analizado la sobreexpresión de los genes *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* y *ERG11* en cepas resistentes de *C. albicans* (Morio et al., 2013), desde nuestro punto de vista creemos que el análisis de ARN no sería una técnica idónea para emplearla en el ámbito clínico debido a que los niveles de expresión implican la comparación de los mismos entre una cepa sensible y la misma cepa con un fenotipo resistente, material del que no siempre se dispone. Además, esta técnica no es tan proclive a la estandarización, lo cual dificulta su uso como herramienta de diagnóstico.

El hecho de que no se detectase ninguna mutación de las descritas en la literatura en algunas de las cepas resistentes de las colecciones, o incluso en la cepa resistente de referencia ATCC 64550, nos llevó a pensar que esta búsqueda de mutaciones GOF para la detección de cepas resistentes, no fuera realmente útil para aislamientos seleccionados al azar y sin ninguna relación entre sí (T. C. White, Holleman, Dy, Mirels, & Stevens, 2002b). Debido a ello, realizamos un ensayo de evolución in vitro frente a fluconazol, con el fin de obtener cepas isogénicas seriadas, sensibles inicialmente y que evolucionaran a un fenotipo resistente, tal y como se había observado en varios estudios (Cowen et al., 2000). Se seleccionaron dos cepas de *C. albicans*, la cepa de referencia SC5314 y un aislamiento vulvovaginal sensible a todos los azoles, BE-47, aislado de una paciente que reportaba un primer caso de VVC y sin ningún tratamiento anterior con azoles. Ambos aislamientos se sometieron a concentraciones crecientes de fluconazol durante 23 días. El aumento en los valores de CMI para ambas poblaciones nos hizo pensar que ambas habrían desarrollado mecanismos de resistencia debido a la presión ejercida por el fluconazol. Ambas poblaciones evolucionaron de manera diferente, ya que únicamente se detectó un alelo hiperactivo en una de las poblaciones resistentes, se trataba de la mutación N977D de *TAC1* en SC5314. La comparación de las secuencias de población inicial con las de población final nos permitió concluir que esta mutación se había fijado en algún punto del ensayo en uno de los alelos, y que después había ocurrido una pérdida de heterocigosidad, ya que se detectó en homocigosis. Sin embargo, el tipo de análisis realizado no permitió concluir si la pérdida de heterocigosidad se debió a una recombinación mitótica, una recombinación local o a la duplicación de todo el cromosoma 5. Estos resultados muestran una vez más la diversidad en los mecanismos por los cuales *C. albicans* desarrolla la resistencia, que la presencia de fluconazol por sí misma promueve la aparición de cepas resistentes, y que el método de detección de mutaciones propuesto en este trabajo podría ser válido como técnica de diagnóstico de resistencia, ya que la detección en un aislamiento de la mutación N977D descrita en la literatura es capaz de predecir resistencia in vitro (A. Coste et al., 2006).

Por último y dado nuestro interés en la tecnología molecular como base de nuevos métodos de diagnóstico y continuando con la problemática del aumento de

aislamientos de hongos con sensibilidad reducida a fármacos antifúngicos y sus mecanismos subyacentes, nos propusimos la caracterización en *Saprochaete capitata* del gen *FKS*, cuyas mutaciones en las regiones denominadas *Hot Spot* (HS) han sido relacionadas con la resistencia a equinocandinas en distintas especies fúngicas (Cornely, 2008; Dudiuk et al., 2017; Garcia-Effron et al., 2008; Garcia-Effron, Park, & Perlin, 2009; S. K. Katiyar & Edlind, 2009). *Saprochaete capitata*, anteriormente conocida *Trichosporon capitatum*, *Geotrichum capitatum* o *Dipodascus capitatus* (de Hoog et al., 2015), es un hongo oportunista, capaz de originar infecciones sistémicas muy graves, principalmente en pacientes oncohematológicos (Girmenia et al., 2005; Martino et al., 2004), difíciles de distinguir de las candidiasis invasoras. Su tratamiento se realiza de manera empírica y las equinocandinas parecen no tener efecto en el manejo de las infecciones causadas por este hongo (Chittick et al., 2009). El análisis de la secuencia de *FKS* reveló que esta especie era portadora del aminoácido Leucina en vez de Fenilalanina (F-a-L) en la primera posición del HS1. Esta región está altamente conservada en las distintas especies fúngicas y los cambios de aminoácidos en esta primera posición han sido asociados de manera directa con la resistencia a equinocandinas, bien el mismo cambio F-a-L en *C. albicans* (Garcia-Effron et al., 2009) o *C. tropicalis* (Garcia-Effron, Kontoyiannis, Lewis, & Perlin, 2008), u otros cambios como F-a-S en *C. albicans* (S. Katiyar, Pfaller, & Edlind, 2006) y *C. tropicalis* (Garcia-Effron et al., 2008), F-a-V en *C. glabrata* (Garcia-Effron et al., 2009), F-a-C en *C. krusei* (Kahn et al., 2007), F-a-Y en *C. albicans* (S. Katiyar et al., 2006), *Fusarium solani* o *Lomentospora prolificans* (S. K. Katiyar & Edlind, 2009) o F-a-I en *S. cerevisiae* (Ohyama, Miyakoshi, & Isono, 2004). Esta Leucina situada en el primer aminoácido del HS de *FKS* en *S. capitata* se identificó en todos los aislamientos analizados, y, aunque son necesarios más análisis, este cambio F-a-L ocurrido de manera natural en *S. capitata* podría estar relacionado con la sensibilidad reducida de esta especie frente a las candinas.

Para finalizar, desde nuestro punto de vista creemos que los ensayos aquí presentados, aunque preliminares, suponen una herramienta prometedora para su empleo tanto en la identificación del agente etiológico de la infección fúngica como en la evaluación de la resistencia a los antifúngicos del mismo. Por otra parte, nuestro grupo de investigación continua con la misma línea de trabajo, buscando

nuevas mutaciones en distintos genes y técnicas alternativas a la secuenciación con el fin poder tipificar estas mutaciones GOF de una manera más rápida, así como en el análisis de la implicación de las mutaciones identificadas por primera vez en este trabajo. Asimismo, la búsqueda de nuevos mecanismos de resistencia permitirá el empleo de los mismos como diana para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antifúngica.

CONCLUSIONES



6.CONCLUSIONES

1. *Candida albicans* fue la especie más frecuentemente aislada tanto en muestras de origen oral como vulvovaginal, seguida de *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.
2. El ensayo de qPCR multiplex diseñado en este trabajo permite la detección específica de las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, con un límite de detección de 20 fg de ADN. Sin embargo, debido al origen multicopia del gen diana no es posible equiparar al número de células/genomas.
3. Las sondas Calb2 y Cpar3, diseñadas para la detección de las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*, respectivamente, son específicas y no hibridan con el resto de especies crípticas de ambos complejos de especies.
4. El empleo del sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos MagNA Pure Compact (Roche) supone una mejora en cuanto a la reproducibilidad y disminución del tiempo de ejecución en comparación con los protocolos manuales. Asimismo, constituye un paso fundamental para la estandarización de la PCR como herramienta para el diagnóstico de infecciones fúngicas.
5. El ensayo de qPCR con la sonda Calb rebajando el punto de corte a 30 ciclos sigue manteniendo unos valores sensibilidad y especificidad cercanos al 90%.
6. Se han identificado nuevas mutaciones GOF en los aislamientos de *C. albicans* analizados. Cinco se han detectado en el gen que codifica Erg11p: S42L, D225N, P236H, F319L, Q479R y 7 en el gen que codifica Tac1p: E265K, S758F, N823K, H839Y, C858Y, I895T y S935L. Se desconoce el papel de estas mutaciones en la resistencia, sin embargo, F319L y Q479R para Erg11 y S758F, que se detectó en homocigosis, y H839Y para Tac1 se detectaron exclusivamente en aislamientos resistentes, lo cual sugiere una implicación de las mismas en la adquisición de la resistencia a azoles
7. Todos los aislamientos de *C. albicans* portadores de alguna de las mutaciones GOF en Erg11p, Tac1p o Upc2p caracterizadas en la literatura y asociadas a la resistencia a azoles mostraron un fenotipo resistente, lo cual



refuerza la propuesta de emplear la detección de estas mutaciones GOF como diagnóstico molecular de la resistencia.

8. El análisis de las poblaciones experimentales sometidas a la presión del fluconazol mostraron una vez más la diversidad de mecanismos mediante los cuales *C. albicans* puede desarrollar la resistencia a azoles. El análisis de distintos tiempos permitirá además conocer la secuencia del desarrollo de la resistencia y si esta resistencia se mantiene en ausencia de la presión del antifúngico.
9. Los cebadores Scap-F y Scap-R detectan de manera específica la presencia de *Saprochaete capitata* en muestras de sangre y muestras clínicas incluidas en parafina.
10. La sustitución natural de la base timina por citosina detectada en la primera posición del *Hot Spot 1* del gen *FKS* de *S. capitata* sugiere que este cambio puede ser el responsable de la sensibilidad reducida a equinocandinas que posee esta especie fúngica de manera intrínseca.

BIBLIOGRAFIA

1. **Abbas, J., G. P. Bodey, H. A. Hanna, M. Mardani, E. Girgawy, D. Abi-Said, E. Whimbey, R. Hachem, and I. Raad.** 2000. *Candida krusei* fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients. Arch. Intern. Med. **160**:2659-2664.
2. **Agatensi, L., F. Franchi, F. Mondello, R. L. Bevilacqua, T. Ceddia, F. De Bernardis, and A. Cassone.** 1991. Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. J. Clin. Pathol. **44**:826-830.
3. **Aguirre, J. M.** 2002. Candidiasis orales. Revista Iberoamericana De Micología. **19**:17-21.
4. **Alexander, B. D., M. D. Johnson, C. D. Pfeiffer, C. Jiménez-Ortigosa, J. Catania, R. Booker, M. Castanheira, S. A. Messer, D. S. Perlin, and M. A. Pfaller.** 2013. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. Clinical Infectious Diseases. **56**:1724-1732.
5. **Amouri, I., H. Sellami, N. Borji, S. Abbes, A. Sellami, F. Cheikhrouhou, L. Maazoun, S. Khaled, S. Khrouf, and Y. Boujelben.** 2011. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. Mycoses. **54**:
6. **Anderson, M. R., K. Klink, and A. Cohrsen.** 2004. Evaluation of vaginal complaints. Jama. **291**:1368-1379.
7. **Andrioli, J. L., G. S. Andrade Oliveira, C. Souza, Z. Lima, M. C. Haun, I. Mauruzio, and R. Fontana.** 2009. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. Rev Bras Ginecol Obstet. **31**:300-304.
8. **Anil, S., S. Vellappally, M. Hashem, R. S. Preethanath, S. Patil, and L. P. Samaranayake.** 2016. Xerostomia in geriatric patients: a burgeoning global concern. Journal of Investigative and Clinical Dentistry. **7**:5-12.
9. **Applied Biosystems.** 2001. Primer Express^R Software v2.0. Applications-based primer design software. 4-10.
10. **Arendrup, M. C., and T. F. Patterson.** 2017. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. J. Infect. Dis. **216**:S445-S451.
11. **Arendrup, M. C., J. Guinea, J. Meletiadis, J. Mouton, P. Hamal, and F. Barchiesi.** 2017. EUCAST Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee. .
12. **Arrieta-Aguirre, I., P. Menendez-Manjon, M. S. Cuetara, L. Lopez-Soria, J. C. Garcia-Ruiz, and M. D. Moragues.** 2017. Molecular identification of *Saprochaete capitata* in human blood and paraffinized tissue samples. J. Clin. Microbiol. . doi: JCM.00876-17 [pii].
13. **Avni, T., L. Leibovici, and M. Paul.** 2011. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. J. Clin. Microbiol. **49**:665-670. doi: 10.1128/JCM.01602-10 [doi].
14. **Ayats, J., E. Martín-Mazuelos, J. Pemán, G. Quindós, F. Sánchez, J. García-Rodríguez, J. Guarro, J. Guinea, M. J. Linares, and J. Pontón.** 2011. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **29**:39. e1-39. e15.
15. **Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, D. Giannini, and G. Scalise.** 2007. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:941-945. doi: AAC.00880-06 [pii].
16. **Belet, N., E. Ciftci, E. Ince, N. Dalgic, S. Oncel, H. Guriz, A. Yagmurlu, H. Dindar, and U. Dogru.** 2006. Caspofungin treatment in two infants with persistent fungaemia due to *Candida lipolytica*. Scand. J. Infect. Dis. **38**:559-562.
17. **Berkhout, C.** 1923. *De Schimmelgeslachten Monilia, Oidium, Oospora em Torula*. Universiteit Utrecht, Utrecht.
18. **Bezdicsek, M., M. Lengerova, D. Ricna, B. Weinbergerova, I. Kocmanova, P. Volfova, L. Drgona, M. Poczova, J. Mayer, and Z. Racil.** 2016. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. Medical Mycology. **54**:714-724.
19. **Bhattacharya, S., J. D. Sobel, and T. C. White.** 2016. A Combination Fluorescence Assay Demonstrates Increased Efflux Pump Activity as a Resistance Mechanism in Azole-Resistant Vaginal *Candida albicans* Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **60**:5858-5866. doi: 10.1128/AAC.01252-16 [doi].
20. **Bialek, R., F. Konrad, J. Kern, C. Aepinus, L. Cecenas, G. M. Gonzalez, G. Just-Nubling, B. Willinger, E. Presterl, C. Lass-Flörl, and V. Rickerts.** 2005. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. J. Clin. Pathol. **58**:1180-1184. doi: 58/11/1180 [pii].
21. **Blinkhorn, R. J., D. Adelstein, and P. J. Spagnuolo.** 1989. Emergence of a new opportunistic pathogen, *Candida lusitanae*. J. Clin. Microbiol. **27**:236-240.
22. **Boikov, D. A., J. B. Locke, K. D. James, K. Bartizal, and J. D. Sobel.** 2017. In vitro activity of the novel echinocandin CD101 at pH 7 and 4 against *Candida* spp. isolates from patients with vulvovaginal candidiasis. J. Antimicrob. Chemother. **72**:1355-1358.
23. **Bouza, E., and P. Muñoz.** 2004. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. Clinical Microbiology and Infection. **10**:76-85.
24. **Bouza, E., and P. Muñoz.** 2008. Epidemiology of candidemia in intensive care units. Int. J. Antimicrob. Agents. **32**:S87-S91.

25. **Brammer, K. W., P. R. Farrow, and J. K. Faulkner.** 1990. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev. Infect. Dis.* **3**:S318-26.
26. **Braun, B., M. van het Hoog, M. Martchenko, J. Dungan, A. Kuo, D. Inglis, M. Uhl, H. Hogues, M. Berriman, M. Lorenz, A. Levitin, U. Oberholzer, C. Bachewich, D. H Marcus, A. Marcil, D. Dignard, T. Iouk, R. Zito, L. Frangeul, F. Tekaiia, K. Rutherford, E. Wang, C. Munro, S. Bates, N. Gow, L. Hoyer, G. Kohler, J. Morschhauser, G. Newport, S. Znaidi, M. Raymond, B. Turcotte, G. Sherlock, M. Constanzo, J. Ihmels, J. Berman, D. Sanglard, N. Agabian, A. Mitchell, A. Johnson, M. Whiteway, and A. Nantel.** 2005. A Human-Curated Annotation of the *Candida albicans* Genome. *PLoS Genetics.* **1**:
27. **Bretagne, S., and J. Costa.** 2006. Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clinica Chimica Acta.* **363**:221-228.
28. **Bretagne, S., and J. Costa.** 2005. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *Pathogens and Disease.* **45**:361-368.
29. **Buchan, B. W., and N. A. Ledebouer.** 2013. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **51**:1359-1366. doi: 10.1128/JCM.03105-12 [doi].
30. **Buscemi, L., A. Arechavala, and R. Negroni.** 2004. Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muniz Infectious Diseases Hospital. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**:177-181. doi: 200421177 [pii].
31. **Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**:611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797 [doi].
32. **Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. S. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J. L. Reedy, I. Agrafioti, M. B. Aranaud, S. Bates, A. J. P. Brown, S. Brunke, M. C. Costanzo, D. A. Fitzpatrick, P. W. J. de Groot, D. Harris, L. L. Hoyer, B. Hube, F. M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M. E. Logue, R. Martin, A. M. Neiman, E. Nikolau, M. A. Quail, J. Quinn, M. C. Santos, F. F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K. A. T. Silverstein, M. S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M. P. H. Stumpf, P. E. Sudbery, T. Srikantha, Q. Zeng, J. Berman, J. Berriman, J. Heitman, N. A. R. Gow, M. C. Lorenz, B. W. Birren, M. Kellis, and C. A. Cuomo.** 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* **459**:657-662.
33. **Calderone, R. A., and C. J. Clancy.** 2012. *Candida* and candidiasis. American Society for Microbiology Press.
34. **Cannon, R. D., E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, P. V. Baret, M. V. Keniya, K. Tanabe, M. Niimi, A. Goffeau, and B. C. Monk.** 2009. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:291-321, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00051-08 [doi].
35. **Cano, M., J. Perz, A. Craig, M. Liu, G. Lyon, M. Brandt, T. Lott, B. Lasker, F. Barrett, and M. McNeil.** 2005. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Medical Mycology.* **43**:219-225.
36. **Cararach-Tur, M., R. C. Delgado, E. D. Armengol, E. M. García, J. C. M. Escoriza, S. P. Gil-Antuñano, and J. M. T. Rodríguez.** 2013. La vulvovaginitis candidiásica recurrente. *Progresos De Obstetricia y Ginecología.* **56**:108-116.
37. **Carrillo Muñoz, A. J., G. E. Giusiano, A. Arechavala, C. Tur Tur, E. Eraso, N. Jauregizar, G. Quindós, and R. Negroni.** 2015. La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas.
38. **Carrillo-Munoz, A., G. Quindos, C. Tur, M. Ruesga, Y. Miranda, O. d. Valle, P. Cossum, and T. Wallace.** 1999. In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:397-401.
39. **Cartwright, C. P., B. D. Lembke, K. Ramachandran, B. A. Body, M. B. Nye, C. A. Rivers, and J. R. Schwebke.** 2013. Comparison of nucleic acid amplification assays with BD affirm VPIII for diagnosis of vaginitis in symptomatic women. *J. Clin. Microbiol.* **51**:3694-3699. doi: 10.1128/JCM.01537-13 [doi].
40. **Carvalho, A., S. Costa-De-Oliveira, M. Martins, C. Pina-Vaz, A. Rodrigues, P. Ludovico, and F. Rodrigues.** 2007. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology.* **45**:619-627.
41. **Cernicka, J., and J. Subik.** 2006. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **27**:403-408. doi: S0924-8579(06)00056-2 [pii].
42. **Chagas-Neto, T. C., G. M. Chaves, and A. L. Colombo.** 2008. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia.* **166**:121-132.
43. **Chakrabarti, A., S. S. Chatterjee, K. Rao, M. Zameer, M. Shivaprakash, S. Singhi, R. Singh, and S. C. Varma.** 2009. Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. *Scand. J. Infect. Dis.* **41**:275-284.
44. **Chaturvedi, V., R. Ramani, D. Andes, D. J. Diekema, M. A. Pfaller, M. A. Ghannoum, C. Knapp, S. R. Lockhart, L. Ostrosky-Zeichner, T. J. Walsh, K. Marchillo, S. Messer, A. R. Welshenbaugh, C. Bastulli, N. Iqbal, V. L. Paetznick, J. Rodriguez, and T. Sein.** 2011. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:1543-1548. doi: 10.1128/AAC.01510-09 [doi].
45. **Chau, A. S., C. A. Mendrick, F. J. Sabatelli, D. Loebenberg, and P. M. McNicholas.** 2004. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to

azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2124-2131.

46. **Chen, C., Y. Yang, K. Tseng, H. Shih, C. Liou, C. Lin, and H. Lo.** 2009. Rep1p negatively regulating *MDR1* efflux pump involved in drug resistance in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology.* **46**:714-720.

47. **Chen, S. C., M. A. Slavin, and T. C. Sorrell.** 2011. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. *Drugs.* **71**:11-41.

48. **Chen, C. G., Y. L. Yang, H. I. Shih, C. L. Su, and H. J. Lo.** 2004. CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *CDR1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4505-4512. doi: 48/12/4505 [pii].

49. **Chittick, P., E. L. Palavecino, B. Delashmitt, J. Evans, and J. E. Peacock Jr.** 2009. Case of fatal *Blastoschizomyces capitatus* infection occurring in a patient receiving empiric micafungin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5306-5307. doi: 10.1128/AAC.00710-09 [doi].

50. **Choukri, F., M. Benderdouche, and P. Sednaoui.** 2014. In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida* spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents. *Journal De Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology.* **24**:303-307.

51. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute. .

52. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2010. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi. Approved Guideline. CLSI document M51-A. .

53. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing for yeasts; aproved Guideline. 2nd ed. CLSI document M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. .

54. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Third Informational Supplement. CLSI document M44-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute. .

55. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. .

56. **Cornely, O. A.** 2008. *Aspergillus* to Zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive fungal infections. *Infection.* **36**:296-313. doi: 10.1007/s15010-008-7357-z [doi].

57. **Corsello, S., A. Spinillo, G. Osnengo, C. Penna, S. Guaschino, A. Beltrame, N. Blasi, and A. Festa.** 2003. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* **110**:66-72.

58. **Costa, C., J. M. Costa, C. Desterke, F. Botterel, C. Cordonnier, and S. Bretagne.** 2002. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2224-2227.

59. **Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bougnoux, C. d'Enfert, J. Berman, and D. Sanglard.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell.* **6**:1889-1904. doi: EC.00151-07 [pii].

60. **Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard.** 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics.* **172**:2139-2156. doi: genetics.105.054767 [pii].

61. **Coste, A. T., J. Crittin, C. Bauser, B. Rohde, and D. Sanglard.** 2009. Functional analysis of *cis*- and *trans*-acting elements of the *Candida albicans* *CDR2* promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot. Cell.* **8**:1250-1267. doi: 10.1128/EC.00069-09 [doi].

62. **Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot. Cell.* **3**:1639-1652. doi: 3/6/1639 [pii].

63. **Cowen, L. E., D. Sanglard, D. Calabrese, C. Sirjusingh, J. B. Anderson, and L. M. Kohn.** 2000. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **182**:1515-1522.

64. **Cribby, S., M. Taylor, and G. Reig.** 2008. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perpect Infect Dis.* 1-9.

65. **Crowley, P., and H. Gallagher.** 2014. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **117**:611-617.

66. **Cuenca-Estrella, M., C. Moore, F. Barchiesi, J. Bille, E. Chryssanthou, D. Denning, J. Donnelly, F. Dromer, B. Dupont, and J. Rex.** 2003. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clinical Microbiology and Infection.* **9**:467-474.

67. **Cuenca-Estrella, M., D. Rodriguez, B. Almirante, J. Morgan, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, M. Salvado, D. W. Warnock, A. Pahissa, and J. L. Rodriguez-Tudela.** 2005. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:194-199.

68. **Dalla-Costa, L. M., L. G. Morello, D. Conte, L. A. Pereira, J. K. Palmeiro, A. Ambrosio, D. Cardozo, M. A. Krieger, and S. M. Raboni.** 2017. Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* **140**:61-66.
69. **Danby, C. S., D. Boikov, R. Rautemaa-Richardson, and J. D. Sobel.** 2012. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:1403-1406. doi: 10.1128/AAC.05025-11 [doi].
70. **D'Antonio, D., A. Mazzoni, A. Iacone, B. Violante, M. A. Capuani, F. Schioppa, and F. Romano.** 1996. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Blastoschizomyces capitatus* causing nosocomial infections in cancer patients. *J. Clin. Microbiol.* **34**:753-755.
71. **Darouiche, R. O.** 1998. Oropharyngeal and esophageal candidiasis in immunocompromised patients: treatment issues. *Clin. Infect. Dis.* **26**:259-72; quiz 273-4.
72. **de Hoog, G. S., V. Chaturvedi, D. W. Denning, P. S. Dyer, J. C. Frisvad, D. Geiser, Y. Graser, J. Guarro, G. Haase, K. J. Kwon-Chung, J. F. Meis, W. Meyer, J. I. Pitt, R. A. Samson, J. W. Taylor, K. Tintelnot, R. G. Vitale, T. J. Walsh, M. Lackner, and ISHAM Working Group on Nomenclature of Medical Fungi.** 2015. Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice *J. Clin. Microbiol.* **53**:1056-1062. doi: 10.1128/JCM.02016-14 [doi].
73. **De Marco, D., M. Perotti, C. M. Ossi, R. Burioni, M. Clementi, and N. Mancini.** 2007. Development and validation of a molecular method for the diagnosis of medically important fungal infections. *Microbiologica-Bologna.* **30**:308.
74. **de Resende, M. A., de Sousa, Lourimar Viana Nascimento Franco, de Oliveira, Rita Cássia Botelho Weikert, C. Y. Koga-Ito, and J. P. Lyon.** 2006. Prevalence and antifungal susceptibility of yeasts obtained from the oral cavity of elderly individuals. *Mycopathologia.* **162**:39-44.
75. **Dégano-Blázquez, R. M.** 2011. Acetiltransferasas de histonas en *Candida albicans*: análisis del perfil transcripcional. Universidad de Salamanca, Salamanca.
76. **Dennerstein, G. J., D. H. Ellis, C. S. Reed, and C. M. Bennett.** 2011. Pathogenicity of non-*albicans* yeasts in the vagina. *J. Low Genit Tract Dis.* **15**:33-36. doi: 10.1097/LGT.0b013e3181d94f39 [doi].
77. **Denning, D. W.** 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* **362**:1142-1151.
78. **Denning, D. W., and M. J. Bromley.** 2015. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science.* **347**:1414-1416. doi: 10.1126/science.aaa6097 [doi].
79. **Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller.** 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1298-1302.
80. **Diezmann, S., C. J. Cox, G. Schonian, R. J. Vilgalys, and T. G. Mitchell.** 2004. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5624-5635. doi: 10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004 [pii].
81. **Dismukes, W. E.** 2000. Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis.* **30**:653-657. doi: 10.1093/cid/30.4.653 [pii].
82. **Dudiuk, C., L. Theill, S. Gamarra, and G. Garcia-Effron.** 2017. Detection of Cryptic *Candida* Species Recognized as Human Pathogens Through Molecular Biology Techniques. *Current Fungal Infection Reports.* **11**:176-183.
83. **Dudiuk, C., D. Macedo, F. Leonardelli, L. Theill, M. S. Cabeza, S. Gamarra, and G. Garcia-Effron.** 2017. Molecular Confirmation of the Relationship between *Candida guilliermondii* Fks1p Naturally Occurring Amino Acid Substitutions and Its Intrinsic Reduced Echinocandin Susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**:10.1128/AAC.02644-16. Print 2017 May. doi: 10.1128/AAC.02644-16 [pii].
84. **Dun, E.** 1999. Antifungal resistance in yeast vaginitis. *Yale J. Biol. Med.* **72**:281-285.
85. **Dunkel, N., J. Blaß, P. D. Rogers, and J. Morschhäuser.** 2008b. Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol. Microbiol.* **69**:827-840.
86. **Dunkel, N., T. T. Liu, K. S. Barker, R. Homayouni, J. Morschhäuser, and P. D. Rogers.** 2008a. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot. Cell.* **7**:1180-1190. doi: 10.1128/EC.00103-08 [doi].
87. **Edgar, R. C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput *Nucleic Acids Res.* **32**:1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340 [doi].
88. **Edwards, L.** 2004. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Dermatologic Therapy.* **17**:102-110.
89. **Egbe, C. A., U. C. Onwufor, R. Omoregie, and O. I. Enabulele.** 2011. Female reproductive tract infections among vaginal contraceptive users in Benin City, Nigeria. *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences.* **3**:49-52.
90. **Ellepola, A. N., and C. J. Morrison.** 2005. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology.* **43**:65-84.
91. **Favre, B., M. Didmon, and N. S. Ryder.** 1999. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* **145**:2715-2725.
92. **Ferris, D. G., P. Nyirjesy, J. D. Sobel, D. Soper, A. Pavletic, and M. S. Litaker.** 2002. Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. *Obstetrics & Gynecology.*

99:419-425.

93. **Fidel, P. L., Jr, J. A. Vazquez, and J. D. Sobel.** 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin. Microbiol. Rev. **12**:80-96.

94. **Fling, M. E., J. Kopf, A. Tamarkin, J. A. Gorman, H. A. Smith, and Y. Koltin.** 1991. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. Molecular and General Genetics MGG. **227**:318-329.

95. **Flowers, S. A., K. S. Barker, E. L. Berkow, G. Toner, S. G. Chadwick, S. E. Gygax, J. Morschhauser, and P. D. Rogers.** 2012. Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of *ERG11* upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. Eukaryot. Cell. **11**:1289-1299. doi: 10.1128/EC.00215-12 [doi].

96. **Ford, C. B., J. M. Funt, D. Abbey, L. Issi, C. Guiducci, D. A. Martinez, T. Delorey, B. Y. Li, T. C. White, C. Cuomo, R. P. Rao, J. Berman, D. A. Thompson, and A. Regev.** 2015. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. Elife. **4**:e00662. doi: 10.7554/eLife.00662 [doi].

97. **Foxman, B., J. V. Marsh, B. Gillespie, and J. D. Sobel.** 1998. Frequency and response to vaginal symptoms among white and African American women: results of a random digit dialing survey. Journal of Women's Health. **7**:1167-1174.

98. **Foxman, B., R. Muraglia, J. P. Dietz, J. D. Sobel, and J. Wagner.** 2013. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. J. Low Genit Tract Dis. **17**:340-345. doi: 10.1097/LGT.0b013e318273e8cf [doi].

99. **Franz, R., S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly, M. Ruhnke, and J. Morschhauser.** 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. Antimicrob. Agents Chemother. **42**:3065-3072.

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

101. **Fromtling, R. A.** 1988. Overview of medically important antifungal azole derivatives. Clin. Microbiol. Rev. **1**:187-217.

102. **Gamarra, S., S. Morano, C. Dudiuk, E. Mancilla, M. E. Nardin, E. de Los Angeles Mendez, and G. Garcia-Effron.** 2014. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital Mycopathologia. **178**:251-258. doi: 10.1007/s11046-014-9780-2 [doi].

103. **Garcia-Effron, G., S. K. Katiyar, S. Park, T. D. Edlind, and D. S. Perlin.** 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:2305-2312. doi: 10.1128/AAC.00262-08 [doi].

104. **Garcia-Effron, G., D. P. Kontoyiannis, R. E. Lewis, and D. S. Perlin.** 2008. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:4181-4183. doi: 10.1128/AAC.00802-08 [doi].

105. **Garcia-Effron, G., S. Lee, S. Park, J. D. Cleary, and D. S. Perlin.** 2009. Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:3690-3699. doi: 10.1128/AAC.00443-09 [doi].

106. **Garcia-Effron, G., S. Park, and D. S. Perlin.** 2009. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:112-122. doi: 10.1128/AAC.01162-08 [doi].

107. **Garcia-Effron, G., S. Park, and D. S. Perlin.** 2009. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:112-122. doi: 10.1128/AAC.01162-08 [doi].

108. **Garcia-Ruiz, J. C., L. Lopez-Soria, I. Olazabal, E. Amutio, I. Arrieta-Aguirre, V. Velasco-Benito, J. Ponton, and M. D. Moragues.** 2013. Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy. Rev. Iberoam. Micol. **30**:248-255. doi: 10.1016/j.riam.2013.02.004 [doi].

109. **Giraldo, P., A. Von Nowaskonski, F. A. Gomes, I. Linhares, N. A. Neves, and S. S. Witkin.** 2000. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Obstetrics & Gynecology. **95**:413-416.

110. **Girmentia, C., L. Pagano, B. Martino, D. D'Antonio, R. Fanci, G. Specchia, L. Melillo, M. Buelli, G. Pizzarelli, M. Venditti, P. Martino, and GIMEMA Infection Program.** 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. J. Clin. Microbiol. **43**:1818-1828. doi: 10.1128/JCM.43.11.1818-1828.2005 [pii].

111. **Goncalves, B., C. Ferreira, C. T. Alves, M. Henriques, J. Azeredo, and S. Silva.** 2016. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors Crit. Rev. Microbiol. **42**:905-927. doi: 10.3109/1040841X.2015.1091805 [doi].

112. **Goswami, D., R. Goswami, U. Banerjee, V. Dadhwal, S. Miglani, A. A. Lattif, and N. Kochupillai.** 2006. Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. J. Infect. **52**:111-117.

113. **Goswami, R., V. Dadhwal, S. Tejaswi, K. Datta, A. Paul, R. Haricharan, U. Banerjee, and N. Kochupillai.** 2000. Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. J. Infect. **41**:162-166.

114. **Gow, N. A., M. G. Netea, C. A. Munro, G. Ferwerda, S. Bates, H. M. Mora-Montes, L. Walker, T. Jansen, L. Jacobs, and V. Tsoni.** 2007. Immune recognition of *Candida albicans* β -glucan by dectin-1. *J. Infect. Dis.* **196**:1565-1571.
115. **Grimoud, A., J. Lodter, N. Marty, S. Andrieu, H. Bocquet, M. Linas, M. Rumeau, and J. Cazard.** 2005. Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. *Oral Dis.* **11**:163-169.
116. **Guarro, J.** 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* **30**:33-39.
117. **Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, J. V. Berg, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M. Pfaller, and D. Diekema.** 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases.* **37**:1172-1177.
118. **Gümrall, R., B. Özhak-Baysan, A. Tümgör, M. A. Saraçlı, Ş. T. Yıldırım, M. Ilkit, J. Zupančič, M. Novak-Babić, N. Gunde-Cimerman, and P. Zalar.** 2016. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. *Fungal Diversity.* **76**:1-9.
119. **Hachem, R., H. Hanna, D. Kontoyiannis, Y. Jiang, and I. Raad.** 2008. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida Krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer.* **112**:2493-2499.
120. **Hall, T.** 1999. Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp.* **41**:95-98.
121. **Hamad, M., E. Muta'eb, Q. Abu-Shaqra, A. Fraij, K. Abu-Elteen, and S. R. Yasin.** 2006. Utility of the oestrogen-dependent vaginal candidosis murine model in evaluating the efficacy of various therapies against vaginal *Candida albicans* infection. *Mycoses.* **49**:104-108.
122. **Harrison, B. D., J. Hashemi, M. Bibi, R. Pulver, D. Bavli, Y. Nahmias, M. Wellington, G. Sapiro, and J. Berman.** 2014. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. *PLoS Biology.* **12**:e1001815.
123. **Hata, D. J., S. P. Buckwalter, B. S. Pritt, G. D. Roberts, and N. L. Wengenack.** 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2353-2358. doi: 10.1128/JCM.02331-07 [doi].
124. **Heilmann, C. J., S. Schneider, K. S. Barker, P. D. Rogers, and J. Morschhauser.** 2010. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive *ERG11* upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:353-359. doi: 10.1128/AAC.01102-09 [doi].
125. **Hof, H.** 2008. Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**:327-334. doi: 10.1007/s10096-007-0451-9 [doi].
126. **Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7276-7280.
127. **Holzheimer, R. G., and H. Dralle.** 2002. Management of mycoses in surgical patients -- review of the literature *Eur. J. Med. Res.* **7**:200-226.
128. **Hoot, S. J., A. R. Smith, R. P. Brown, and T. C. White.** 2011. An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:940-942. doi: 10.1128/AAC.00995-10 [doi].
129. **Hue, F. -, M. Huerre, M. Rouffault, and C. de Bievre.** 1999. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2434-2438.
130. **Hull, C. M., and A. D. Johnson.** 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science.* **285**:1271-1275. doi: 7769 [pii].
131. **Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson.** 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* **289**:307-310. doi: 8669 [pii].
132. **Hurley, R.** 1975. Inveterate vaginal thrush. *Practitioner.* **215**:753-756.
133. **Hurley, R., and J. De Louvois.** 1979. *Candida* vaginitis. *Postgrad. Med. J.* **55**:645-647.
134. **Ilkit, M., and A. B. Guzel.** 2011. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**:250-261.
135. **Jabeen, R., and I. Siddiqi.** 2014. Frequency of vaginal candidiasis amongst pregnant women & effect of predisposing factors. *Int Ophthalmol Updat.* **12**:140-143.
136. **Johnson, M. E., and T. D. Edlind.** 2012. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryot. Cell.* **11**:952-960. doi: 10.1128/EC.00082-12 [doi].
137. **Johnson, M. E., S. K. Katiyar, and T. D. Edlind.** 2011. New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:3774-3781. doi: 10.1128/AAC.01811-10 [doi].
138. **Jones, T., N. A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B. B. Magee, G. Newport, Y. R. Thorstenson, N. Agabian, P. T. Magee, R. W. Davis, and S. Scherer.** 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:7329-7334. doi: 10.1073/pnas.0401648101 [doi].
139. **Kadir, T., R. Pisiriciler, S. Akyüz, A. Yarat, N. Emekli, and A. Ipbüker.** 2002. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiological and systemic factors. *J. Oral Rehabil.* **29**:452-457.

140. **Kahn, J. N., G. Garcia-Effron, M. J. Hsu, S. Park, K. A. Marr, and D. S. Perlin.** 2007. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1876-1878. doi: AAC.00067-07 [pii].
141. **Kekeya, H., Y. Miyazaki, H. Miyazaki, K. Nyswaner, B. Grimberg, and J. E. Bennett.** 2000. Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2985-2990.
142. **Kalo, A., and E. Segal.** 1988. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosa: effect of sex hormones on adherence of yeast *in vitro*. *Can J Microbiol.* **34**:224-228.
143. **Karababa, M., A. T. Coste, B. Rognon, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3064-3079. doi: 10.1128/AAC.48.8.3064-3079.2004 [doi].
144. **Kasai, M., A. Francesconi, R. Petraitiene, V. Petraitis, A. M. Kelaher, H. S. Kim, J. Meletiadis, T. Sein, J. Bacher, and T. J. Walsh.** 2006. Use of quantitative real-time PCR to study the kinetics of extracellular DNA released from *Candida albicans*, with implications for diagnosis of invasive Candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **44**:143-150. doi: 44/1/143 [pii].
145. **Katiyar, S., and T. Edlind.** 2015. Echinocandins: resistance mechanisms, p. 55-70. In A. T. Coste and P. Vandeputte (eds.), *Antifungals. From Genomics to Resistance and the Development of Novel Agents*, 1st ed., . Caister Academic Press, Norfolk, UK.
146. **Katiyar, S., M. Pfaller, and T. Edlind.** 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2892-2894. doi: 50/8/2892 [pii].
147. **Katiyar, S. K., and T. D. Edlind.** 2009. Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:1772-1778. doi: 10.1128/AAC.00020-09 [doi].
148. **Kelly, S., D. Lamb, D. Kelly, N. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher, and H. Einsele.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5$, 6-desaturation. *FEBS Lett.* **400**:80-82.
149. **Kelly, S. L., D. C. Lamb, and D. E. Kelly.** 1999. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**:171-175.
150. **Kelly, S. L., D. C. Lamb, J. Loeffler, H. Einsele, and D. E. Kelly.** 1999. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**:174-179.
151. **Kennedy, M. A., and J. D. Sobel.** 2010. Vulvovaginal candidiasis caused by non-*albicans* *Candida* species: new insights. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **12**:465-470.
152. **Khan, Z., S. Ahmad, I. Al-Obaid, N. Al-Sweih, L. Joseph, and D. Farhat.** 2008. Emergence of resistance to amphotericin B and triazoles in *Candida glabrata* vaginal isolates in a case of recurrent vaginitis. *Journal of Chemotherapy.* **20**:488-491.
153. **Khot, P. D., and D. N. Fredricks.** 2009. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* **7**:1201-1221.
154. **Khot, P. D., D. L. Ko, and D. N. Fredricks.** 2009. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1559-1565. doi: 10.1128/AEM.02383-08 [doi].
155. **Kirkpatrick, C. H.** 1994. Chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**:S14-S17.
156. **Kleinegger, C. L., S. R. Lockhart, K. Vargas, and D. R. Soll.** 1996. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2246-2254.
157. **Kofteridis, D. P., R. E. Lewis, and D. P. Kontoyiannis.** 2009. Caspofungin-non-susceptible *Candida* isolates in cancer patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:293-295.
158. **Kudo, M., M. Ohi, Y. Aoyama, Y. Nitahara, S. Chung, and Y. Yoshida.** 2005. Effects of Y132H and F145L substitutions on the activity, azole resistance and spectral properties of *Candida albicans* sterol 14-demethylase P450 (CYP51): a live example showing the selection of altered P450 through interaction with environmental compounds. *J. Biochem.* **137**:625-632.
159. **Kurtzman, C., J. W. Fell, and T. Boekhout.** 2011. *The yeasts: a taxonomic study.* Elsevier.
160. **Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett.** 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1216-1223.
161. **Kusch, H., K. Biswas, S. Schwanfelder, S. Engelmann, P. Rogers, M. Hecker, and J. Morschhäuser.** 2004. A proteomic approach to understanding the development of multidrug-resistant *Candida albicans* strains. *Molecular Genetics and Genomics.* **271**:554-565.
162. **Lamb, D. C., D. E. Kelly, W. Schunck, A. Z. Shyadehi, M. Akhtar, D. J. Lowe, B. C. Baldwin, and S. L. Kelly.** 1997. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J. Biol. Chem.* **272**:5682-5688.
163. **Lamb, D. C., D. E. Kelly, T. C. White, and S. L. Kelly.** 2000. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob. Agents*

Chemother. **44**:63-67.

164. **Laniado-Laborín, R., and M. N. Cabrales-Vargas.** 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana De Micología.* **26**:223-227.

165. **Lass-Flörl, C.** 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* **52**:197-205.

166. **Lau, A., S. Chen, T. Sorrell, D. Carter, R. Malik, P. Martin, and C. Halliday.** 2007. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**:380-385. doi: JCM.01862-06 [pii].

167. **Lee, I., N. O. Fishman, T. E. Zaoutis, K. H. Morales, M. G. Weiner, M. Synnestvedt, I. Nachamkin, and E. Lautenbach.** 2009. Risk factors for fluconazole-resistant *Candida glabrata* bloodstream infections. *Arch. Intern. Med.* **169**:379-383.

168. **Lee, M., L. E. Williams, D. W. Warnock, and B. A. Arthington-Skaggs.** 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:217-224.

169. **Legrand, M., P. Lephart, A. Forche, F. C. Mueller, T. Walsh, P. Magee, and B. B. Magee.** 2004. Homozygosity at the *MTL* locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Mol. Microbiol.* **52**:1451-1462.

170. **Leroy, O., J. P. Gangneux, P. Montravers, J. P. Mira, F. Gouin, J. P. Sollet, J. Carlet, J. Reynes, M. Rosenheim, B. Regnier, O. Lortholary, and AmarCand Study Group.** 2009. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit. Care Med.* **37**:1612-1618. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819efac0 [doi].

171. **Leung, A., C. Chim, P. Ho, C. Cheng, K. Yuen, A. Lie, W. Au, R. Liang, and Y. Kwong.** 2002. *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. *J. Hosp. Infect.* **50**:316-319.

172. **Levin, A., S. Costa, N. Mussi, M. Basso, S. Sinto, C. Machado, D. Geiger, M. Villares, A. Schreiber, and A. Barone.** 1998. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**:243-249.

173. **Li, L., S. Redding, and A. Dongari-Bagtzoglou.** 2007. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *J. Dent. Res.* **86**:204-215.

174. **Liu, X., S. Fan, Y. Peng, and H. Zhang.** 2014. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. *Journal De Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology.* **24**:106-111.

175. **Liu, X., S. Fan, Y. Peng, and H. Zhang.** 2014. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. *Journal De Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology.* **24**:106-111.

176. **Lockhart, S., S. Joly, K. Vargas, J. Swails-Wenger, L. Enger, and D. Soll.** 1999. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J. Dent. Res.* **78**:857-868.

177. **Lockhart, S. R., S. A. Messer, M. A. Pfaller, and D. J. Diekema.** 2008. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* **46**:374-376. doi: JCM.01790-07 [pii].

178. **Loeffler, J., S. L. Kelly, H. Hebart, U. Schumacher, C. Lass-Flörl, and H. Einsele.** 1997. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**:263-268.

179. **Loeffler, J., L. Hagemeyer, H. Hebart, N. Henke, U. Schumacher, and H. Einsele.** 2000. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin. Chem.* **46**:631-635.

180. **Loeffler, J., H. Hebart, R. Bialek, L. Hagemeyer, D. Schmidt, F. P. Serey, M. Hartmann, J. Eucker, and H. Einsele.** 1999. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1200-1202.

181. **Loeffler, J., K. Schmidt, H. Hebart, U. Schumacher, and H. Einsele.** 2002. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2240-2243.

182. **Loeffler, J., P. Swatoch, D. Akhawi-Araghi, H. Hebart, and H. Einsele.** 2003. Automated RNA extraction by MagNA Pure followed by rapid quantification of cytokine and chemokine gene expression with use of fluorescence resonance energy transfer. *Clin. Chem.* **49**:955-958.

183. **Lynch, D. P.** 1994. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* **78**:189-193.

184. **Lyon, G. M., S. Karatela, S. Sunay, Y. Adiri, and Candida Surveillance Study Investigators.** 2010. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1270-1275. doi: 10.1128/JCM.02363-09 [doi].

185. **Maaroufi, Y., N. Ahariz, M. Husson, and F. Crokaert.** 2004. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3159-3163. doi: 10.1128/JCM.42.7.3159-3163.2004 [doi].

186. **Maaroufi, Y., C. Heymans, J. M. De Bruyne, V. Duchateau, H. Rodriguez-Villalobos, M. Aoun, and F. Crokaert.** 2003. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3293-3298.

187. **MacPherson, S., M. Larochele, and B. Turcotte.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:583-604. doi: 70/3/583 [pii].
188. **Magee, P. T.** 2007. Genome structure and dynamics in *Candida albicans*, p. 7-26. In C. D'Enfert and B. Hube (eds.), *Candida. Comparative and Functional Genomics*, 1st ed., . Caister Academic Press, Norfolk, UK.
189. **Maligie, M. A., and C. P. Selitrennikoff.** 2005. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2851-2856. doi: 49/7/2851 [pii].
190. **Marichal, P., L. Koymans, S. Willemsens, D. Bellens, P. Verhasselt, W. Luyten, M. Borgers, F. C. Ramaekers, F. C. Odds, and H. V. Bossche.** 1999. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* **145**:2701-2713.
191. **Martínez, M., J. Lopez-Ribot, W. Kirkpatrick, S. Bachmann, S. Perea, M. Ruesga, and T. Patterson.** 2002. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:515-524.
192. **Martino, R., M. Salavert, R. Parody, J. F. Tomas, R. de la Camara, L. Vazquez, I. Jarque, E. Prieto, J. L. Sastre, I. Gadea, J. Peman, and J. Sierra.** 2004. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. *Clin. Infect. Dis.* **38**:335-341. doi: CID31829 [pii].
193. **Mayer, F. L., D. Wilson, and B. Hube.** 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* **4**:119-128.
194. **Meira, H. C., B. M. De Oliveira, I. F. Pereira, M. D. Naves, R. A. Mesquita, and V. R. Santos.** 2017. Oral candidiasis: A retrospective study of 276 Brazilian patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* **21**:351.
195. **Mendling, W.** 2015. Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). *Mycoses.* **58**:1-15.
196. **Miller, S. E., and W. Finnerty.** 1979. Age-related physiological studies comparing *Candida albicans* chlamydospores to yeasts. *Can. J. Microbiol.* **25**:765-772.
197. **Monk, B. C., T. M. Tomasiak, M. V. Keniya, F. U. Huschmann, J. D. Tyndall, J. D. O'Connell 3rd, R. D. Cannon, J. G. McDonald, A. Rodriguez, J. S. Finer-Moore, and R. M. Stroud.** 2014. Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**:3865-3870. doi: 10.1073/pnas.1324245111 [doi].
198. **Moran, G., D. Coleman, and D. Sullivan.** 2012. An introduction to the medically important *Candida* species, p. 11-25. In R. A. Calderone and C. J. Clancy (eds.), *Candida and Candidiasis*, 2nd ed., . ASM Press, Washington DC, USA.
199. **Morio, F., C. Loge, B. Besse, C. Hennequin, and P. Le Pape.** 2010. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**:373-384. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006 [doi].
200. **Morio, F., F. Pagniez, M. Besse, F. Gay-andrieu, M. Miegerville, and P. Le Pape.** 2013. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **42**:410-415. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.013 [doi].
201. **Morschhäuser, J.** 2016. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans*—an example of microevolution of a fungal pathogen. *Journal of Microbiology.* **54**:192-201.
202. **Morschhäuser, J.** 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology.* **47**:94-106.
203. **Morschhäuser, J., K. S. Barker, T. T. Liu, J. Blaß-Warmuth, R. Homayouni, and P. D. Rogers.** 2007. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens.* **3**:e164.
204. **Naglik, J. R., P. L. Fidel Jr, and F. C. Odds.** 2008. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**:129-139.
205. **Nosek, J., Z. Holesova, P. Kosa, A. Gacser, and L. Tomaska.** 2009. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet.* **55**:497-509.
206. **Nozawa, Y., and T. Morita.** 1986. Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis, p. 111. In Anonymous .
207. **Nyirjesy, P., A. B. Alexander, and M. V. Weitz.** 2005. Vaginal *Candida parapsilosis*: pathogen or bystander? *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **13**:37-41.
208. **Odds, F. C.** 1988. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo.
209. **Odds, F. C., A. J. Brown, and N. A. Gow.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**:272-279.
210. **Odds, F. C., M. F. Hanson, A. D. Davidson, M. D. Jacobsen, P. Wright, J. A. Whyte, N. A. Gow, and B. L. Jones.** 2007. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J. Med. Microbiol.* **56**:1066-1075.

211. **Odds, F. C.** 1988. Candidosis of the genitalia, p. 124. In F. C. Odds (ed.), *Candida and Candidosis. A review and bibliography*. Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo.
212. **Okungbowa, F. I., O. Isikhuemen, and A. P. Dede.** 2003. The distribution frequency of *Candida* species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. *Revista Iberoamericana De Micología*. **20**:60-63.
213. **Onyewu, C., J. R. Blankenship, M. Del Poeta, and J. Heitman.** 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:956-964.
214. **Pappas, P. G., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, and J. Walsh.** 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**:161-189.
215. **Pappas, P. G., C. M. Rotstein, R. F. Betts, M. Nucci, D. Talwar, J. J. De Waele, J. A. Vazquez, B. F. Dupont, D. L. Horn, and L. Ostrosky-Zeichner.** 2007. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*. **45**:883-893.
216. **Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. R. Andes, C. J. Clancy, K. A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, M. G. Schuster, J. A. Vazquez, T. J. Walsh, T. E. Zaoutis, and J. D. Sobel.** 2016. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **62**:e1-50. doi: 10.1093/cid/civ933 [doi].
217. **Park, S., R. Kelly, J. N. Kahn, J. Robles, M. J. Hsu, E. Register, W. Li, V. Vyas, H. Fan, G. Abruzzo, A. Flattery, C. Gill, G. Chrebet, S. A. Parent, M. Kurtz, H. Teppler, C. M. Douglas, and D. S. Perlin.** 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3264-3273. doi: 49/8/3264 [pii].
218. **Patel, D. A., B. Gillespie, J. D. Sobel, D. Leaman, P. Nyirjesy, M. V. Weitz, and B. Foxman.** 2004. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Obstet. Gynecol.* **190**:644-653.
219. **Patil, S., R. S. Rao, B. Majumdar, and S. Anil.** 2015. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*. **6**:1391.
220. **Pelletier, R., J. Peter, C. Antin, C. Gonzalez, L. Wood, and T. J. Walsh.** 2000. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1563-1568.
221. **Pellón, A., A. Ramírez-García, I. Buldain, A. Antorán, A. Rementería, and F. L. Hernando.** 2016. Immunoproteomics-based analysis of the immunocompetent serological response to *Lomentospora prolificans*. *Journal of Proteome Research*. **15**:595-607.
222. **Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard, and T. F. Patterson.** 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2676-2684. doi: 10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001 [doi].
223. **Perlin, D. S.** 2009. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **22**:568-573. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283321ce5 [doi].
224. **Persat, F., S. Ranque, F. Derouin, A. Michel-Nguyen, S. Picot, and A. Sulahian.** 2008. Contribution of the (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1009-1013. doi: JCM.02091-07 [pii].
225. **Pfaller, M., and D. Diekema.** 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*. **10**:11-23.
226. **Pfaller, M. A.** 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment *Am. J. Med.* **125**:S3-13. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.11.001 [doi].
227. **Pfaller, M. A., and D. J. Diekema.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133-163. doi: 20/1/133 [pii].
228. **Pfaller, M. A., and D. J. Diekema.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4419-4431. doi: 42/10/4419 [pii].
229. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. Mendez, C. Kibbler, P. Erzsebet, S. C. Chang, D. L. Gibbs, and V. A. Newell.** 2006. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3551-3556. doi: 44/10/3551 [pii].
230. **Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**:320-329.
231. **Prasad, R., and K. Kapoor.** 2004. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* **242**:215-248.
232. **Quindós, G., J. C. Garcia-Ruiz, and M. A. Sanz.** 2009. Otras infecciones fungicas invasoras. *Rev. Iberoam. Micol.* **1**:79.
233. **Quindós, G., J. M. Aguirre, L. Ribacoba, P. Olaechea, E. Eraso, and R. Zaragoza.** 2015. Candidiasis, p. 87-107. In G. Quindós (ed.), *Micología Clínica*, 1st ed., . Elsevier, Barcelona, España.

234. **Quindós, G., E. Cantón, A. Espinel-Ingroff, J. L. López Ribot, J. Pemán García, E. Martín, and M. Cuenca-Estrella.** 2015. Resistencia a los fármacos antifúngicos, p. 265-280. *In* G. Quindós (ed.), *Micología Clínica*, 1st ed., . Elsevier, Barcelona, España.
235. **Quindós, G., A. J. Carrillo-Munoz, A. Rezusta-López, M. C. Díaz-Jarabrán, C. Marcos-Arias, and N. Jauregizar-Albonigamayor.** 2015. Fármacos antifúngicos de uso tópico, p. 255-263. *In* G. Quindós (ed.), *Micología Clínica*, 1ª ed., . Elsevier, Barcelona.
236. **Ramírez-Zavala, B., O. Reuß, Y. Park, K. Ohlsen, and J. Morschhäuser.** 2008. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. **4**:e1000089.
237. **Rathod, S. D., and P. A. Buffler.** 2014. Highly-cited estimates of the cumulative incidence and recurrence of vulvovaginal candidiasis are inadequately documented. *BMC Womens Health*. **14**:43.
238. **Reales-Calderón, J. A., G. Molero, C. Gil, and J. L. Martínez.** 2016. The fungal resistome: a risk and an opportunity for the development of novel antifungal therapies. *Future Medicinal Chemistry*. **8**:1503-1520.
239. **Reed, B. D.** 1992. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstet. Gynecol. Surv.* **47**:551-560.
240. **Revankar, S. G., and J. D. Sobel.** 2012. Mucosal Candidiasis, p. 419-427. *In* R. A. Calderone and C. J. Clancy (eds.), *Candida and Candidiasis*, 2nd ed., . ASM Press, Washington, DC.
241. **Rex, J. H., M. G. Rinaldi, and M. A. Pfaller.** 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1-8.
242. **Richardson, M., and C. Lass-Flörl.** 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. **14**:5-24.
243. **Richardson, M., and R. Rautemaa.** 2009. How the host fights against *Candida* infections. *Front Biosci.* **14**:4363-75.
244. **Richter, S. S., R. P. Galask, S. A. Messer, R. J. Hollis, D. J. Diekema, and M. A. Pfaller.** 2005. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2155-2162. doi: 43/5/2155 [pii].
245. **Riggle, P. J., and C. A. Kumamoto.** 2006. Transcriptional regulation of *MDR1*, encoding a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an *Mcm1p* binding site. *Eukaryot. Cell.* **5**:1957-1968. doi: EC.00243-06 [pii].
246. **Rogers, P. D., and K. S. Barker.** 2012. Multidrug resistance transcriptional regulatory networks in *Candida*, p. 403-416. *In* R. Calderone and C. J. Clancy (eds.), *Candida and Candidiasis*, 2nd edition ed., . ASM Press, Washington DC.
247. **Romeo, O., and G. Criseo.** 2008. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using *hwp1* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**:230-233. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.014 [doi].
248. **Rosentul, D., C. Delsing, L. A. Joosten, van der Meer, Jos WM, B. Kullberg, and M. G. Netea.** 2009. Polymorphism in innate immunity genes and susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal De Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. **19**:191-196.
249. **Rüping, M. J., J. J. Vehreschild, and O. A. Cornely.** 2008. Patients at high risk of invasive fungal infections. *Drugs*. **68**:1941-1962.
250. **Samaranayake, L. P.** 1997. *Candida krusei* infections and fluconazole therapy. *Hong Kong Medical J.* **3**:312-314.
251. **Sambrok, J., and D. W. Russel.** 2001. Working with synthetic oligonucleotide probes, p. 10.1-10.52. *In* J. Sambrok and D. W. Russel (eds.), *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 3rd edition ed., . Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
252. **Sanglard, D.** 2011. Resistance to antifungal drugs, p. 135-151. *In* C. A. Kauffman, P. G. Pappas, J. D. Sobel, and W. E. Dismukes (eds.), *Essentials of Clinical Mycology*, 2nd ed., . Springer Science & Business Media, New York Dordrecht Heidelberg London.
253. **Sanglard, D., and J. Bille.** 2002. Action and resistance to antifungal agents, p. 349-383. *In* R. Calderone (ed.), *Candida and Candidiasis*, 1st edition ed., . ASM Press, Washington DC.
254. **Sanglard, D.** 2016. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in Medicine*. **3**:11.
255. **Sanglard, D.** 2011. Diagnosis of antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens: transcriptional gene regulation. *Current Fungal Infection Reports*. **5**:157-167.
256. **Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille.** 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*. **143**:405-416.
257. **Sanglard, D.** 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:379-385. doi: S1369527402003442 [pii].
258. **Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (*CYP51A1*) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:241-253.
259. **Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, and J. Bille.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2378-2386.

260. **Sanguinetti, M., B. Posteraro, and C. Lass-Flörl.** 2015. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. **58**:2-13.
261. **Sanz, M. A., F. López, M. L. Martínez, G. F. Sanz, J. A. Martínez, G. Martín, and M. Gobernado.** 1996. Disseminated *Blastoschizomyces capitatus* infection in acute myeloblastic leukaemia. *Supportive Care in Cancer*. **4**:291-293.
262. **Sasse, C., N. Dunkel, T. Schäfer, S. Schneider, F. Dierolf, K. Ohlsen, and J. Morschhäuser.** 2012. The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **86**:539-556.
263. **Schauer, F., and R. Hanschke.** 1999. Zur Taxonomie und Ökologie der Gattung *Candida*: Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses*. **42**:12-21.
264. **Schubert, S., P. D. Rogers, and J. Morschhäuser.** 2008. Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4274-4280. doi: 10.1128/AAC.00740-08 [doi].
265. **Selmecki, A., M. Gerami-Nejad, C. Paulson, A. Forche, and J. Berman.** 2008. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*. *Mol. Microbiol.* **68**:624-641.
266. **Selmecki, A., A. Forche, and J. Berman.** 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*. **313**:367-370. doi: 313/5785/367 [pii].
267. **Sendid, B., P. Ducoroy, N. François, G. Lucchi, S. Spinali, O. Vagner, S. Damiens, A. Bonnin, D. Poulain, and F. Dalle.** 2013. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Medical Mycology*. **51**:25-32.
268. **Shen, H., M. An, D. J. Wang, Z. Xu, J. Zhang, P. Gao, Y. Cao, Y. Cao, and Y. Jiang.** 2007. Fcr1p inhibits development of fluconazole resistance in *Candida albicans* by abolishing *CDR1* induction. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **30**:68-73.
269. **Silva, S., M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams, and J. Azeredo.** 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**:288-305.
270. **Silver, P. M., B. G. Oliver, and T. C. White.** 2004. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryot. Cell*. **3**:1391-1397. doi: 3/6/1391 [pii].
271. **Singh, S., J. D. Sobel, P. Bhargava, D. Boikov, and J. A. Vazquez.** 2002. Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical Infectious Diseases*. **35**:1066-1070.
272. **Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller, and D. R. Soll.** 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**:189-197.
273. **Sobel, J. D.** 2016. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet. Gynecol.* **214**:15-21.
274. **Sobel, J. D.** 2007. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*. **369**:1961-1971.
275. **Sobel, J. D.** 2003. Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Drugs*. **63**:1059-1067.
276. **Sobel, J. D., S. Faro, R. W. Force, B. Foxman, W. J. Ledger, P. R. Nyirjesy, B. D. Reed, and P. R. Summers.** 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Obstet. Gynecol.* **178**:203-211.
277. **Sobel, J., and R. A. Akins.** 2015. The Role of PCR in the Diagnosis of *Candida* Vulvovaginitis—a New Gold Standard? *Curr. Infect. Dis. Rep.* **17**:33.
278. **Sobel, J. D.** 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. **369**:1961-1971. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60917-9.
279. **Soll, D.** 2014. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *Journal of Oral Microbiology*. **6**:22993.
280. **Sucher, A. J., E. B. Chahine, and H. E. Balcer.** 2009. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann. Pharmacother.* **43**:1647-1657. doi: 10.1345/aph.1M237 [doi].
281. **Sullivan, D., and D. Coleman.** 1997. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr. Top. Med. Mycol.* **8**:15-25.
282. **Tardif, K. D., and R. Schlaberg.** 2017. Development of a real-time PCR assay for the direct detection of *Candida* species causing Vulvovaginal candidiasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **88**:39-40.
283. **Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* **43**:284-292. doi: 43/1/284 [pii].
284. **Theill, L., C. Dudiuk, S. Morano, S. Gamarra, M. E. Nardin, E. Méndez, and G. Garcia-Effron.** 2016. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **48**:43-49.
285. **Theuretzbacher, U., F. Ihle, and H. Derendorf.** 2006. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin. Pharmacokinet.* **45**:649-663.
286. **Trama, J. P., E. Mordechai, and M. E. Adelson.** 2005. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. Cell. Probes.* **19**:145-152.

287. **Trofa, D., A. Gacser, and J. D. Nosanchuk.** 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin. Microbiol. Rev. **21**:606-625. doi: 10.1128/CMR.00013-08 [doi].

288. **Turin, L., F. Riva, G. Galbiati, and T. Cainelli.** 2000. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens Eur. J. Clin. Invest. **30**:511-518. doi: eci659 [pii].

289. **Uhl, M. A., M. Biery, N. Craig, and A. D. Johnson.** 2003. Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. Embo j. **22**:2668-2678. doi: 10.1093/emboj/cdg256 [doi].

290. **Valero, C., L. de la Cruz-Villar, O. Zaragoza, and M. J. Buitrago.** 2016. New Panfungal Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. J. Clin. Microbiol. **54**:2910-2918. doi: JCM.01580-16 [pii].

291. **Vale-Silva, L. A.** 2015. Molecular mechanisms of resistance of *Candida* spp. to membrane targeting antifungals, p. 1-25. In A. T. Coste and P. Vandeputte (eds.), Antifungals. From Genomics to Resistance and the Development of Novel Agents, 1st ed., . Caister Academic Press, Norfolk, UK.

292. **Valgus, J. M.** 2003. What's new in antifungals? Curr. Infect. Dis. Rep. **5**:16-21.

293. **van Asbeck, E. C., K. V. Clemons, and D. A. Stevens.** 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit. Rev. Microbiol. **35**:283-309.

294. **Vande Bossche, H., G. Willemsens, and P. Marichal.** 1987. Anti-Candida drugs—the biochemical basis for their activity. CRC Crit. Rev. Microbiol. **15**:57-72.

295. **vanden Bossche, H., P. Marichal, F. C. Odds, L. Le Jeune, and M. C. Coene.** 1992. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob. Agents Chemother. **36**:2602-2610.

296. **Vandeputte, P., G. Tronchin, T. Berges, C. Hennequin, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2007. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:982-990. doi: AAC.01510-06 [pii].

297. **Vandeputte, P., G. Tronchin, G. Larcher, E. Ernoult, T. Berges, D. Chabasse, and J. P. Bouchara.** 2008. A nonsense mutation in the *ERG6* gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:3701-3709. doi: 10.1128/AAC.00423-08 [doi].

298. **Vazquez, J. A., and J. D. Sobel.** 2002. Mucosal candidiasis. Infect. Dis. Clin. North Am. **16**:793-820.

299. **Vermitsky, J. P., M. J. Self, S. G. Chadwick, J. P. Trama, M. E. Adelson, E. Mordechai, and S. E. Gyax.** 2008. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. J. Clin. Microbiol. **46**:1501-1503. doi: 10.1128/JCM.02485-07 [doi].

300. **Vermitsky, J. P., M. J. Self, S. G. Chadwick, J. P. Trama, M. E. Adelson, E. Mordechai, and S. E. Gyax.** 2008. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. J. Clin. Microbiol. **46**:1501-1503. doi: 10.1128/JCM.02485-07 [doi].

301. **Vik, A., and J. Rine.** 2001. Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **21**:6395-6405.

302. **Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, and V. Krcmery.** 1999. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Clinical Infectious Diseases. **28**:1071-1079.

303. **Vollmer, T., M. Stormer, K. Kleesiek, and J. Dreier.** 2008. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **46**:1919-1926. doi: 10.1128/JCM.02178-07 [doi].

304. **Wächtler, B., D. Wilson, and B. Hube.** 2011. *Candida albicans* adhesion to and invasion and damage of vaginal epithelial cells: stage-specific inhibition by clotrimazole and bifonazole. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:4436-4439.

305. **Walsh, T. J., and W. G. Merz.** 1986. Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*. Am. J. Clin. Pathol. **85**:498-502.

306. **Walsh, T., A. Groll, J. Hiemenz, R. Fleming, E. Roilides, and E. Anaissie.** 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clinical Microbiology and Infection. **10**:48-66.

307. **Wang, Y., J. Liu, C. Shi, W. Li, Y. Zhao, L. Yan, and M. Xiang.** 2015. Mutations in transcription factor Mrr2p contribute to fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. Int. J. Antimicrob. Agents. **46**:552-559.

308. **Wedde, M., D. Müller, K. Tintelnot, G. De Hoog, and U. Stahl.** 1998. PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. Medical Mycology. **36**:61-67.

309. **Weissenbacher, T., S. Witkin, W. Ledger, V. Tolbert, A. Gingelmaier, C. Scholz, E. Weissenbacher, K. Friese, and I. Mylonas.** 2009. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction. Arch. Gynecol. Obstet. **279**:125-129.

310. **White, P. L., A. Shetty, and R. A. Barnes.** 2003. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. J. Med. Microbiol. **52**:229-238.

311. **White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California.

312. **White, P. L., S. Bretagne, L. Klingspor, W. J. Melchers, E. McCulloch, B. Schulz, N. Finnstrom, C. Mengoli, R. A. Barnes, J. P. Donnelly, J. Loeffler, and European Aspergillus PCR Initiative.** 2010. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1231-1240. doi: 10.1128/JCM.01767-09 [doi].
313. **White, P. L., D. W. Williams, T. Kuriyama, S. A. Samad, M. A. Lewis, and R. A. Barnes.** 2004. Detection of *Candida* in concentrated oral rinse cultures by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2101-2107.
314. **White, T. C.** 1997. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1482-1487.
315. **White, T. C.** 1997. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1488-1494.
316. **White, T. C., S. Holleman, F. Dy, L. F. Mirels, and D. A. Stevens.** 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1704-1713.
317. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402.
318. **Wiederhold, N. P., J. L. Grabinski, G. Garcia-Effron, D. S. Perlin, and S. A. Lee.** 2008. Pyrosequencing to detect mutations in *FKS1* that confer reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4145-4148. doi: 10.1128/AAC.00959-08 [doi].
319. **Wingard, J. R., and H. Leather.** 2004. A new era of antifungal therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **10**:73-90.
320. **Wingard, J. R.** 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases.* **20**:115-125.
321. **Winn, W. C., S. D. Allen, W. Janda M., E. W. Koneman, G. W. Procop, P. C. Schreckenberger, and G. L. Woods.** 2008. Microbiología molecular, p. 129-160. In Anonymous Koneman. *Diagnóstico Microbiológico*, 6th ed., . Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, Mexico, Porto Alegre.
322. **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**:309-317. doi: 10.1086/421946 [doi].
323. **Wu, C. J., H. C. Lee, Y. L. Yang, C. M. Chang, H. T. Chen, C. C. Lin, N. Y. Lee, W. L. Chu, L. Y. Hsieh, Y. L. Wang, T. L. Lauderdale, F. C. Tseng, N. Y. Ko, W. C. Ko, and H. J. Lo.** 2012. Oropharyngeal yeast colonization in HIV-infected outpatients in southern Taiwan: CD4 count, efavirenz therapy and intravenous drug use matter. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:485-490. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03655.x [doi].
324. **Xiang, H., L. Xiong, X. Liu, and Z. Tu.** 2007. Rapid simultaneous detection and identification of six species *Candida* using polymerase chain reaction and reverse line hybridization assay. *J. Microbiol. Methods.* **69**:282-287.
325. **Xiang, M., J. Liu, P. Ni, S. Wang, C. Shi, B. Wei, Y. Ni, and H. Ge.** 2013. *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research.* **13**:386-393.
326. **Yan, L., J. Zhang, M. Li, Y. Cao, Z. Xu, Y. Cao, P. Gao, Y. Wang, and Y. Jiang.** 2008. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica.* **40**:1048-1060.
327. **Yang, H., J. Tong, C. W. Lee, S. Ha, S. H. Eom, and Y. J. Im.** 2015. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. *Nature Communications.* **6**:6129.
328. **Ying, C., H. Zhang, Z. Tang, H. Chen, J. Gao, and C. Yue.** 2015. Antifungal susceptibility and molecular typing of 115 *Candida albicans* isolates obtained from vulvovaginal candidiasis patients in 3 Shanghai maternity hospitals. *Sabouraudia.* **54**:394-399.
329. **Zalar, P., M. Novak, G. De Hoog, and N. Gunde-Cimerman.** 2011. Dishwashers—a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology.* **115**:997-1007.
330. **Zhang, J., G. C. Hung, K. Nagamine, B. Li, S. Tsai, and S. C. Lo.** 2016. Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important *Candida* Species. *Microbiol. Insights.* **9**:21-28. doi: 10.4137/MBI.S38517 [doi].
331. **Znaidi, S., K. S. Barker, S. Weber, A. M. Alarco, T. T. Liu, G. Boucher, P. D. Rogers, and M. Raymond.** 2009. Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot. Cell.* **8**:806-820. doi: 10.1128/EC.00002-09 [doi].
332. **Znaidi, S., X. De Deken, S. Weber, T. Rigby, A. Nantel, and M. Raymond.** 2007. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **66**:440-452. doi: MMI5931 [pii].

7.BIBLIOGRAFIA

