

---

## Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Sub-área Microbiología

# Aplicación de marcadores moleculares a la vigilancia epidemiológica de las infecciones fúngicas invasoras en Uruguay

Lic. Victoria Bórmida

Orientadora: Dra. Lina Bettucci

Laboratorio de Micología, Facultad de Ingeniería-Facultad de Ciencias

Co-orientador: Dr. Andrés Puime

Unidad de Parasitología y Micología, Departamento de Laboratorios de Salud

Pública

Departamento de Laboratorios de Salud Pública

Montevideo, Uruguay

Marzo 2015

## ***Agradecimientos***

- *ANII- Beca de Maestría (código de beca: POS\_2011\_1\_3472)*
- *A los miembros del tribunal, por sus correcciones y aportes*
- *A mi orientadora Lina Bettucci, por la confianza y aceptarme como su estudiante*
- *A mi co-orientador Andrés Puime por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, realizar la maestría y por las enseñanzas*
- *A Dinorah Pan, compañera del laboratorio de Micología, por todas las enseñanzas y el tiempo compartido*
- *A mis compañeros del DLSP, siempre dispuestos a ayudar, y por todo el tiempo compartido en el laboratorio*
- *A mi familia, por el apoyo siempre*

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	v
INDICE DE FIGURAS .....	vi
INDICE DE ANEXOS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Infecciones fúngicas .....	1
1.2. Vigilancia epidemiológica .....	3
1.3. <i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout (1923).....	4
1.4. <i>Candida parapsilosis</i> (Ashford, 1928).....	7
1.5. Caracterización y tipificación de aislamientos .....	9
1.5.1. Microsatélites .....	10
1.5.2. Multilocus Sequence Typing .....	12
2. JUSTIFICACIÓN .....	14
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivo General.....	15
3.2. Objetivos específicos .....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Material biológico .....	16
4.1.2. Aislamientos analizados mediante microsatélites .....	17
4.1.2. Aislamientos de <i>C. albicans</i> analizados mediante MLST .....	17
4.2. Marcadores genéticos .....	18
4.2.1. Marcadores microsatélites .....	18
4.2.2. Marcadores MLST.....	19
4.3. Obtención del material genético .....	19
4.3.1. Extracción de ADN.....	19
4.3.2. Productos de PCR.....	20

4.3.3. Verificación y cuantificación de los productos de PCR .....	20
4.4. Análisis del material genético .....	21
4.4.1. Microsatélites .....	21
4.4.2. Secuenciación de productos de PCR .....	23
4.5. Análisis de datos de microsatélites .....	23
4.5.1 Análisis poblacionales .....	23
4.5.2. Análisis epidemiológicos .....	24
4.6. Análisis de datos de MLST .....	25
5. RESULTADOS. ....	26
5.1. Origen de los aislamientos de ambas especies .....	26
5.2. Caracterización de los marcadores microsatélites .....	26
5.2.1. Visualización y determinación de alelos microsatélites .....	26
5.2.2. Parámetros descriptivos de los marcadores microsatélites .....	29
5.3. Poblaciones .....	30
5.3.1. Parámetros generales de ambas poblaciones .....	30
5.3.2. Estructura poblacional .....	32
5.4. Análisis epidemiológicos .....	33
5.4.1. Aspectos epidemiológicos generales entre subpoblaciones de cada especie .....	33
5.4.2. Casos agrupados por genotipo .....	36
5.5. Análisis de aislamientos <i>C. albicans</i> mediante MLST .....	39
6. DISCUSIÓN .....	43
6.1. Características epidemiológicas generales de ambas especies .....	43
6.2. Caracterización de los aislamientos mediante microsatélites .....	44
6.2.1 Validación de la técnica .....	44
6.2.2. Elección de marcadores microsatélites .....	44
6.2.2.1. Marcadores microsatélites de <i>C. albicans</i> .....	44
6.2.2.2. Marcadores microsatélites de <i>C. parapsilosis</i> .....	45
6.3. Análisis poblacional .....	46
6.3.1. Características generales de las poblaciones .....	46

6.3.2. Estructura poblacional .....	47
6.4. Análisis epidemiológicos .....	47
6.4.1. Subpoblaciones .....	47
6.4.2. Casos agrupados .....	48
6.5. Análisis de aislamientos de <i>C. albicans</i> mediante MLST .....	49
6.6. Comparación de las técnicas de marcadores microsatélites y MLST .....	50
7. CONCLUSIONES .....	51
8. PERSPECTIVAS .....	52
9. REFERENCIAS .....	53
ANEXOS .....	62

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de aislamientos de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> por centro hospitalario de procedencia .....	22
<b>Tabla 2.</b> Características de los marcadores microsatélites de <i>C. albicans</i> descritas por Bretagne et al., 1997 y Botterel et al., 2001 .....	23
<b>Tabla 3.</b> Características de los marcadores microsatélites de <i>C. parapsilosis</i> descritas por Sabino et al., 2010 .....	23
<b>Tabla 4.</b> Características de los marcadores para MLST descritas por Bougnoux et al., 2003 .....	24
<b>Tabla 5.</b> Comparación de alelos obtenidos mediante la técnica de gel de acrilamida y mediante secuenciación .....	34
<b>Tabla 6.</b> Parámetros descriptivos de los marcadores microsatélites de <i>C. albicans</i> .....	35
<b>Tabla 7.</b> Parámetros descriptivos de los marcadores microsatélites de <i>C. parapsilosis</i>	35
<b>Tabla 8.</b> Parámetros descriptivos y poblacionales de los marcadores microsatélites de <i>C. albicans</i> .....	36
<b>Tabla 9.</b> Características resultantes de los microsatélites seleccionados para <i>C. parapsilosis</i> .....	36
<b>Tabla 10.</b> Variables epidemiológicas analizadas entre las subpoblaciones de <i>C. albicans</i> .....	39
<b>Tabla 11.</b> Variables epidemiológicas analizadas entre las subpoblaciones de <i>C. parapsilosis</i> .....	40
<b>Tabla 12.</b> Información epidemiológica de los casos agrupados de <i>C. albicans</i> .....	42
<b>Tabla 13.</b> Genotipos de los casos agrupados de <i>C. albicans</i> .....	42
<b>Tabla 14.</b> Información epidemiológica de los casos agrupados de <i>C. parapsilosis</i> .....	43
<b>Tabla 15.</b> Genotipos de los casos agrupados de <i>C. parapsilosis</i> .....	44
<b>Tabla 16.</b> Distribución de los seis alelos microsatélites de cada aislamiento de <i>C. albicans</i> seleccionado para el análisis mediante MLST .....	44
<b>Tabla 17.</b> Alelos y DSTs obtenidos para los aislamientos de <i>C. albicans</i> analizados mediante MLST .....	45

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. a.</b> Imagen de gel de acrilamida teñido con nitrato de plata.....	22
<b>Figura 1. b.</b> Imagen del gel de acrilamida siendo procesada en el programa GelCompar .....	22
<b>Figura 2.</b> Imágenes de los geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata correspondientes a los tres marcadores microsatélites de <i>C. albicans</i> .....	28
<b>Figura 3.</b> Imágenes de los geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata correspondientes a los microsatélites de <i>C. parapsilosis</i> .....	28
<b>Figura 4.</b> Árbol de expansión mínima de aislamientos de <i>C. albicans</i> en base a alelos microsatélites .....	32
<b>Figura 5.</b> Árbol de expansión mínima de aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> en base a alelos microsatélites.....	32
<b>Figura 6.</b> Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima de 5- Fluorocitosina de los aislamientos de <i>C. albicans</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima de Anidulafungina de los aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Árbol de expansión mínima de los aislamientos de Uruguay construido en el sitio pubmlst.org, en base a los alelos de MLST. ....	41
<b>Figura 9.</b> Árbol de expansión mínima de aislamientos de <i>C. albicans</i> de Argentina, Brasil, Chile, y Uruguay, construido en el sitio pubmlst.org, en base a alelos de MLST. .....	42

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo I.</b> Variables epidemiológicas de los aislamientos de <i>Candida albicans</i> .....	61
<b>Anexo II.</b> Variables epidemiológicas de los aislamientos de <i>Candida parapsilosis</i> .....	64
<b>Anexo III.</b> Protocolos .....	67
<b>Anexo IV.</b> Distribución de aislamientos de <i>Candida albicans</i> según alelos de marcadores microsatélites y probabilidad de pertenencia a una subpoblación en función del algoritmo de Structure .....	80
<b>Anexo V.</b> Distribución de aislamientos de <i>Candida parapsilosis</i> según alelos de marcadores microsatélites y probabilidad de pertenencia a una subpoblación en función del algoritmo de Structure .....	83



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AFLP: del ingles, “Amplified fragment length polymorphism”

AMOVA: del ingles, “Analysis of Molecular Variance”

ATCC: del ingles, “American Type Culture Collection”

CTI: Centro de Terapia Intensiva

DP: Poder de discriminación

DST: del ingles, “Diploid Sequence Type”

EUCAST: del ingles, “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”

$F_{is}$ : Coeficiente de Endogamia de Wright

IFI: Infecciones Fúngicas Invasoras

ITS: del inglés, “Internal Transcribed Spacer”

MLEE: del inglés, “Multilocus Enzyme Electrophoresis”

MLST: del inglés, “Multilocus Sequence Typing”

Pb: pares de bases

PCR: del inglés, “Polymerase Chain Reaction”

PFGE: del inglés, “Pulse Field Gel Electrophoresis”

RAPD: del inglés, “Random Amplified Polymorphic DNA”

RFLP: del ingles, “Restriction Fragment Length Polymorphism”

## RESUMEN

Las infecciones fúngicas invasoras han adquirido importancia a nivel global en los últimos años por el aumento en su incidencia. En muchos países se han creado sistemas de vigilancia para monitorear la incidencia, sensibilidad antifúngica y epidemiología de estas infecciones. En 2010 se creó en Uruguay la Red de Vigilancia de Infecciones Fúngicas Invasoras, coordinada por el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP).

Este trabajo consistió en el análisis de la epidemiología y de las características poblacionales de aislamientos profundos de *C. albicans* y *C. parapsilosis* por ser las especies fúngicas aisladas con mayor frecuencia en Uruguay. El análisis molecular se basó en la selección y puesta a punto de un conjunto de marcadores microsatélites para cada especie y la utilización en *C. albicans* de Multilocus Sequence Typing (MLST) para una muestra seleccionada de aislamientos.

Se analizaron mediante microsatélites aislamientos procedentes de los centros centinela de la red de vigilancia de Uruguay. Para *C. albicans* se seleccionaron los 54 aislamientos obtenidos entre agosto de 2010 y marzo de 2013 y para *C. parapsilosis* los 57 aislamientos obtenidos entre junio de 2008 y julio de 2012.

La proporción de pacientes infectados con *C. albicans* internados en CTI resultó significativamente mayor que la de los infectados con *C. parapsilosis*.

En los pacientes infectados con *C. parapsilosis*, la distribución de edades, con su mediana de 57 años fue menor que la distribución de edades de *C. albicans*, con una mediana de 67 años.

Ambas especies mostraron una gran diversidad genotípica. En *C. albicans* se encontraron 46 genotipos diferentes y en *C. parapsilosis* 49.

En ambas especies se observó un déficit de heterocigosidad significativo, siendo notoriamente mayor en *C. parapsilosis* con un  $F_{IS}$  0,728 que en *C. albicans* con un  $F_{IS}$  de 0,082.

La estructura poblacional de estas especies se analizó por primera vez con el algoritmo de Structure, destacándose que en ambas especies la misma está conformada por dos subpoblaciones claramente definidas. Esto constituye una línea de base para el análisis de la estructura poblacional de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en Uruguay y la región.

En *C. parapsilosis* se encontraron tres casos de brotes, causados por una probable transmisión intrahospitalaria. En *C. albicans* no se pudo encontrar asociación

epidemiológica entre los aislamientos con genotipo idéntico. El análisis de una selección de aislamientos de *C. albicans* mediante MLST permitió desagregar los aislamientos agrupados por microsatélites.

La metodología empleada resultó útil para agrupar genéticamente aislamientos y para diferenciar aquellos que estaban epidemiológicamente asociados.

El algoritmo de análisis propuesto en esta tesis resulta potencialmente aplicable a la vigilancia de las infecciones fúngicas invasoras en el contexto regional.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Infecciones fúngicas

Las infecciones fúngicas invasoras (IFI) constituyen una parte importante de las infecciones hospitalarias, que adquieren cada vez mayor importancia en la población como causa de morbilidad y mortalidad debido al aumento de su incidencia y a la dificultad del diagnóstico precoz (Cantón et al., 2001). Las IFI tienen particular importancia en los servicios de salud de enfermos críticos como los de terapia intensiva, neonatología, cirugía y oncología.

Estas infecciones son causadas por hongos filamentosos y levaduras en sitios habitualmente estériles del organismo, acompañadas de manifestaciones clínicas relacionadas con el órgano o sistema afectado. En los últimos treinta años las IFI han adquirido gran importancia en la salud pública y mostrado cambios en su epidemiología. Parte de esto se debe a la utilización de procedimientos terapéuticos invasivos, tratamientos inmunosupresores e inmunomoduladores, a la mayor supervivencia de los pacientes inmunodeprimidos, al aumento de los trasplantes de órganos, al empleo de dispositivos intravasculares, y a la creciente utilización de antibióticos de amplio espectro (Cantón et al., 2001; Warnock, 2007). En los enfermos críticos, existen factores de riesgo adicionales, que aumentan la probabilidad de adquirir IFI como la presencia de catéteres venosos, las internaciones prolongadas, la nutrición parenteral, la colonización de mucosas y la falla renal (Rüping et al., 2008; Nucci et al., 2010).

Los agentes más frecuentes causantes de IFI incluyen levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus* y hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Rüping et al., 2008). Las candidiasis invasivas representan cerca del 80% de todas las infecciones fúngicas nosocomiales (Nucci et al., 2010). *Candida spp* constituye la cuarta causa de infecciones hematógenas adquiridas en hospitales y representa el 10% de las sepsis nosocomiales (Warnock, 2007; Cuenca-Estrella et al., 2008). Se estima que el 5% de los pacientes hospitalizados desarrolla una infección nosocomial, y que de estas, el 5% son causadas por levaduras del género *Candida* (Cantón et al., 2001).

Las levaduras del género *Candida* pertenecen a la clase Deuteromicetes, donde se encuentran las levaduras sin ciclo sexual conocido. La forma sexual o teleomorfo corresponde a géneros de Ascomycetes y de Basidiomycetes. (McCullough et al., 1996).

Estas se distribuyen de manera universal y entre otros escenarios se pueden aislar en tierra, alimentos, vegetación, y animales. Aunque hay más de 150 especies de *Candida*, pocas son patógenas para el ser humano (García-Vidal y Carratalà, 2012). En 2007 se encontraban reportadas más de 17 especies de *Candida* capaces de causar candidiasis en humanos; sin embargo, las especies más frecuentes en las infecciones invasoras son *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, representando el 90% del total (Pfaller & Diekema, 2007).

Estas especies colonizan las mucosas gastrointestinal, genitourinaria y respiratoria, así como la piel, aunque el aislamiento en dichas localizaciones no implica siempre la presencia de infección. La transición entre colonización e infección depende mayoritariamente de la respuesta del hospedero frente al hongo. (García-Vidal y Carratalà, 2012).

Si bien todas las especies de *Candida* mencionadas pueden causar el mismo tipo de enfermedad, que varía desde una candidiasis superficial hasta una IFI, la gravedad de la enfermedad depende de la especie que la causa, y por eso es importante la correcta identificación (Canton et al, 2001). El tipo de infección también depende del estado de salud del hospedero, pudiendo ser desde infecciones a nivel de mucosas hasta candidiasis diseminadas. El desarrollo de la candidiasis depende de un balance entre la levadura y el estado inmunológico del paciente (Mishra et al., 2007).

La candidemia (aislamiento de *Candida* en sangre) es la infección fúngica más frecuente en pacientes hospitalizados y constituye la mayoría de las candidiasis invasivas (Pfaller & Diekema, 2002).

La adquisición de candidemia depende de una combinación de factores de riesgo. Entre ellos, los que se destacan son la colonización previa, la antibioterapia, la presencia de catéteres, la neutropenia y la disfunción renal, además de la prematuridad, el bajo peso al nacer y la nutrición parenteral en el caso de los recién nacidos (Cantón et al., 2001).

Las tasas de incidencia de la candidemia son variables en función de la región geográfica. Por ejemplo, en Brasil la incidencia es de 2,49 casos/1000 ingresos hospitalarios, mientras que en Estados Unidos, Canadá y Europa es de: 0,28 a 0,96; 0,45 y 0,20 a 0,38 casos/1000 ingresos hospitalarios respectivamente (Nucci et al., 2010). En Uruguay la tasa de incidencia de IFI es de 0,80 casos/1000 admisiones.

Las infecciones por *Candida* se asocian con una alta mortalidad dependiendo de varios factores como la enfermedad de base, el tipo de infección, el tratamiento aplicado y la

calidad de la atención médica. Esta mortalidad varía entre un 37 y un 61% dependiendo de la región geográfica (Tortorano et al., 2004; Colombo et al., 2007; Cuenca-Estrella et al., 2008). La candidemia prolonga en tres semanas la estancia hospitalaria y duplica el riesgo de muerte. La mortalidad atribuible a la candidemia se sitúa entre el 10 y el 49% de acuerdo a diferentes estudios (Pfaller et al., 2006; Cuenca-Estrella et al., 2008).

*C. albicans* es la especie que se encuentra en primer lugar en frecuencia a nivel mundial como agente causante de candidiasis invasiva. En América Latina el 44% de las candidemias son causadas por *C. albicans*, mientras que en Europa ésta representa el 62% (Pfaller et al., 2006). En América Latina se encuentran en segundo y tercer lugar *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* respectivamente, mientras que en el hemisferio norte *C. glabrata* ocupa el segundo lugar como agente etiológico (Nucci et al., 2010).

La candidiasis invasiva por *C. parapsilosis* ha aumentado en los últimos años, fundamentalmente en América Latina (Pfaller & Diekema, 2007). En el hemisferio norte la candidemia por esta especie ocurre principalmente en neonatos, mientras que en América Latina ésta se encuentra distribuida en todos los rangos de edad (Nucci et al., 2010). La tasa de mortalidad asociada a estas infecciones es significativamente menor respecto a otras especies de *Candida* (Tortorano et al., 2004; Pfaller & Diekema, 2007).

## **1.2. Vigilancia epidemiológica**

En los últimos años se ha impulsado el desarrollo de sistemas de vigilancia de infecciones fúngicas invasoras nacionales e internacionales, basados en los laboratorios de micología y microbiología. Existen numerosas redes de vigilancia que han sido utilizadas para monitorear la incidencia y tendencias de las infecciones fúngicas y su epidemiología (Pfaller & Diekema, 2007).

Los sistemas centinela de vigilancia que se basan en aislamientos procedentes de hospitales son los más utilizados. Estos son sistemas flexibles, que permiten el muestreo de episodios de una región geográfica amplia durante largos períodos de tiempo. Este tipo de sistema debe contar con un laboratorio central de referencia para la identificación de los microorganismos y su susceptibilidad a antimicrobianos, lo que permite reportar rápidamente los resultados a los laboratorios centinela (Pfaller & Diekema, 2002).

Desde fines de 2010 existe en Uruguay la Red de Vigilancia de Infecciones Fúngicas Invasoras, integrada por 15 centros centinela de Montevideo y del interior del país, coordinada por la Unidad de Parasitología y Micología del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP). El laboratorio de referencia de la red (DLSP) analiza todos los aislamientos notificados por los centros centinela. Los centros que integran el sistema de vigilancia cubren cerca de la mitad de los ingresos hospitalarios de todo el país. El sistema permite detectar alrededor de cien aislamientos fúngicos anuales. Los aislamientos son procedentes de muestras clínicas profundas como hemocultivos, catéteres y sitios estériles del organismo (líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, etc.).

La vigilancia de esta red incluye la identificación y el análisis de la susceptibilidad antifúngica de los aislamientos. La identificación se lleva a cabo mediante métodos fenotípicos y moleculares de rutina. La susceptibilidad antifúngica se analiza mediante el método de microdilución en placa Eucast (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

*C. albicans* y *C. parapsilosis* son las especies aisladas con mayor frecuencia en la Red, representando actualmente el 34 y 25% respectivamente. Sus características se detallarán a continuación.

### **1.3. *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923)**

La primera denominación de esta especie fue *Oidium albicans* (Robin, 1853). La denominación actual fue utilizada por primera vez en 1923 por Berkout (Kurtzman et al., 2011).

*C. albicans* es un hongo patógeno oportunista humano que se encuentra en la flora normal del tracto gastrointestinal, de la piel y las mucosas (Berman & Sudbery, 2002; Poulain, 2013). Es un asociado obligado de animales de sangre caliente (McCullough et al., 1996).

En 1995 se describió una nueva especie de *Candida*, denominada *Candida dubliniensis*, que se encuentra filogenéticamente relacionada con *C. albicans*. Ambas especies presentan características morfológicas y fisiológicas similares, lo que dificulta su

diferenciación. Por esta razón, se han desarrollado métodos basados en características genotípicas que permiten diferenciarlas (Donnelly et al., 1999; Pineda et al., 2008).

En cuanto a su genoma, es diploide y está formado por 8 cromosomas completamente secuenciados (Jones et al., 2004).

La forma de reproducción de este organismo es clonal. Carece de ciclo sexual completo conocido, ya que no se ha evidenciado la fase meiótica. A pesar de esto, *C. albicans* tiene una gran diversidad genética. Posee un locus MAT (mating-type), ubicado en el cromosoma 5, que permite diferentes combinaciones diploides y hasta tetraploides, que son reversibles por pérdida cromosómica (Jones et al., 2004; Odds et al., 2007; Odds, 2010; Poulain, 2013).

*C. albicans* es dimórfica. Sus dos formas de crecimiento son la levadura y la hifa. Estas dos formas, a su vez, pueden presentar diferentes morfologías dependiendo de las condiciones ambientales. Las blastosporas y las pseudohifas representan la forma de levadura. Las pseudohifas son células alargadas dispuestas en cadena que parecen filamentos. Las hifas se pueden formar a partir de otras hifas o por germinación de blastosporas. La primera etapa de formación de las hifas a partir de la blastospora son los tubos germinales. Por último, también pueden formar clamidosporas que son estructuras de resistencia (Molero et al., 1998).

La diversidad en sus formas de crecimiento hace que sea capaz de sobrevivir, crecer y diseminarse en el mamífero hospedero. La virulencia también se asocia a cambios en la forma de crecimiento. Mientras que la función de la hifa es la invasión de tejidos, la forma de levadura le permite la diseminación hematógena (Berman & Sudbery, 2002).

Además del dimorfismo, en *C. albicans* existen otros cambios, de regulación epigenética, que se denominan “phenotypic switching”. Este mecanismo implica cambios espontáneos y reversibles en su fisiología, que se acompañan de cambios en su morfología. Estos cambios permiten modificar diferentes rasgos relacionados con factores de virulencia, antigenicidad y resistencia a antifúngicos. Un ejemplo de este fenómeno es la transición de colonias blancas a opacas: las células de las colonias blancas son redondas mientras que las de colonia opaca son alargadas. Estas dos morfologías difieren en rasgos fisiológicos como en la adhesión a las células del hospedero, secreción de proteínas, contenido de esteroides y lípidos y sensibilidad a antifúngicos. Sin embargo, su cariotipo, ploidía y cantidad de ADN son idénticos (Soll et al., 1993)



Tanto el dimorfismo como el “phenotypic switching” permiten a *C. albicans* la adaptación a diferentes condiciones ambientales, permitiendo por ejemplo evadir la respuesta inmune de su hospedero (Mishra et al., 2007).

Otros factores de virulencia, además del dimorfismo que se considera un factor de virulencia en sí mismo (Mishra et al., 2007) son la pared celular, la adhesión y la secreción de enzimas, principalmente aspartil proteasas (SAP) y fosfolipasas. La pared celular es esencial para la patogenicidad de *C. albicans* ya que le permite su crecimiento, le brinda protección y es el sitio de contacto entre la célula y el ambiente. La adhesión a superficies mucosas permite la colonización del hospedero. Si bien algunos componentes de la pared celular (quitina, glucanos y lípidos) participan de la adhesión, los principales mediadores de la adhesión son proteínas y manoproteínas. Por último, las enzimas secretadas contribuyen a la invasión y colonización de tejidos por su acción hidrolítica (Calderone & Fonzi, 2001; McCullough et al., 1996). Las SAP, confieren a *C. albicans* actividad proteolítica extracelular. Éstas son capaces de degradar proteínas del sistema inmune del hospedero, ayudando así a evadirlo. Además contribuyen a la colonización e invasión de tejidos. Las funciones de las fosfolipasas se asocian a daños en la membrana celular del hospedero, adhesión e invasión. (Mishra et al., 2007).

Debido a la gran diversidad de factores de virulencia, la tasa de mortalidad de esta especie es del 79% (Canton et al., 2001) La tasa de mortalidad de *C. albicans* en Uruguay es del 44%.

En cuanto a su forma de transmisión en humanos, *C. albicans* se considera un patógeno endógeno, es decir, que la infección ocurre a partir de la flora del hospedero. Muchos estudios con diferentes métodos de tipificación muestran que el origen de la infección diseminada por esta especie es la propia flora del paciente, particularmente la flora intestinal (McCullough et al., 1996; Odds, 2010).

*C. albicans* es susceptible a los antifúngicos equinocandinas y anfotericina B. En cuanto a la 5-Fluorocitosina, se ha encontrado de 0 a 0,6% de resistencia y al fluconazol de 0,8 al 1,5%. (Pfaller & Diekema, 2007).

#### **1.4. *Candida parapsilosis* (Ashford, 1928)**

*C. parapsilosis* fue aislada por primera vez en Puerto Rico en 1928 (Ashford, 1928), y se la consideró una especie no patógena hasta 1940 (Trofa et al., 2008).

En 1987 Scherer & Stevens describen a *C. parapsilosis* como una especie más heterogénea que otras del género *Candida* y en 1992 se sugirió que debería ser separada en tres grupos, en base a la diversidad observada mediante la técnica de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (Lehmann et al., 1992). En 1995 Lin et al. sugieren que los tres grupos podrían ser tres especies diferentes, basados en análisis de isoenzimas y secuencias de ADN. Finalmente, en 2005, *C. parapsilosis* grupo I, II y III se definieron como tres especies diferentes: *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* (Tavanti et al., 2005). *C. parapsilosis* sensu stricto es la especie que se analizará de aquí en adelante por ser la de mayor importancia epidemiológica y la que se aísla con mayor frecuencia en humanos.

El genoma de *C. parapsilosis* es diploide y se encuentra completamente secuenciado. Por la baja diversidad nucleotídica encontrada en su genoma y la ausencia de ciclo sexual caracterizado, se cree que su forma de reproducción es clonal (Tavanti et al., 2005; Butler et al., 2009)

El crecimiento de este organismo es en forma de levadura y puede formar pseudohifas (Nosek et al., 2009).

*C. parapsilosis* puede encontrarse en otros nichos además del ser humano como suelos, ambientes marinos, plantas e insectos (Nosek et al., 2009; van Asbeck et al., 2009).

En humanos, es un patógeno exógeno que puede ser encontrado en la flora normal de la piel, aislándose frecuentemente de las manos y de las uñas. Además, es capaz de persistir en el ambiente hospitalario y de crecer en soluciones parenterales (Trofa et al., 2008). Por esto, su transmisión es predominantemente intrahospitalaria y horizontal a través de las manos del personal, catéteres y demás dispositivos médicos. Existen estudios de tipificación molecular que han demostrado similitud genética entre los aislamientos de las manos del personal de salud y los aislamientos clínicos profundos (van Asbeck et al., 2007). La transmisión de paciente a paciente también ha sido comprobada. Se destaca como la especie más ligada a la transmisión exógena asociada mediante análisis multifactorial con la hiperalimentación y la utilización de catéteres (Cantón et al., 2001)

Por esta razón, los factores de riesgo principales en los pacientes que desarrollan candidiasis por *C. parapsilosis* son la presencia de catéteres intravasculares, la alimentación parenteral y además la internación en servicios de neonatología (van Asbeck et al., 2009).

*C. parapsilosis* es menos patógena que *C. albicans* (Poulain, 2013). Es la menos patógena de las especies de *Candida*, con una tasa de mortalidad del 30%. (Canton et al., 2001). La tasa de mortalidad en Uruguay es del 32%.

Posee menos factores de virulencia que otras especies del género *Candida*, incluyendo *C. albicans*, y por eso su tasa de mortalidad y morbilidad es más baja. También se atribuye la menor virulencia a que no es capaz de formar hifas (van Asbeck et al., 2009).

El conocimiento de los factores de virulencia de *C. parapsilosis* es menor que el de *C. albicans* (Trofa et al., 2008). Estos determinantes de virulencia consisten en la adherencia selectiva a superficies sintéticas, la secreción de enzimas y la habilidad de formar biofilms en catéteres venosos, peritoneales y de hemodiálisis, y en otros dispositivos protésicos (Pfaller & Diekema, 2007; Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009). La adherencia a materiales sintéticos favorece la formación de biofilms y promueve el daño del hospedero.

Los biofilms son importantes como factor de virulencia porque confieren resistencia a antifúngicos y permiten la evasión del sistema inmune del hospedero (Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009). También se ha encontrado “phenotypic switching” en *C. parapsilosis*, aunque se desconoce el mecanismo. En este caso permite un cambio en la morfología de la colonia, que parecería relacionarse con la formación diferencial de biofilms (van Asbeck et al., 2009).

Las enzimas secretadas son aspartil proteasas (SAPs), fosfolipasas y lipasas. Las SAPs facilitarían la invasión superficial y colonización del hospedero afectando las barreras mucosas y degradando proteínas de defensa del hospedero (Trofa et al., 2008; van Asbek et al., 2009). La función de las fosfolipasas en *C. parapsilosis* es menos clara que en *C. albicans*, y se ha visto que esta actividad es variable e incluso inexistente en algunos aislamientos. Las lipasas contribuirían al daño de tejidos (Trofa et al., 2008) y a privar al hospedero de nutrientes. También favorecen el crecimiento en soluciones ricas en lípidos, como algunas soluciones parenterales de nutrición (van Asbeck et al., 2009).

En cuanto a su resistencia, se han observado bajos niveles de resistencia a azoles y polienos (van Asbeck et al., 2009). Para el fluconazol se observó resistencia en el 2 al

4.2% de los aislamientos (Pfaller & Diekema, 2007), elevadas concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) para las equinocandinas respecto a otras especies de *Candida*, y resistencia a la caspofungina (Trofa et al., 2008; Pfaller & Diekema, 2007)

## **1.5. Caracterización y tipificación de aislamientos**

La correcta identificación de los agentes etiológicos es central para la vigilancia epidemiológica (Maiden et al., 1998). Los métodos de tipificación molecular permiten determinar la relación genética entre organismos y entender su dinámica poblacional. Ejemplos de aplicaciones en problemas epidemiológicos son la detección de brotes y de transmisión cruzada, la identificación del origen de una infección y el monitoreo de la emergencia de cepas resistentes o virulentas (Maiden et al., 1998; Olive & Bean, 1999; Soll, 2000).

Los métodos de tipificación deben cumplir con las siguientes características: ser capaces de tipificar a todos los organismos de una misma especie, ser altamente discriminatorios, ser reproducibles entre laboratorios, que el método sea fácil de implementar y de interpretación sencilla (Maiden et al., 1998; Olive & Bean, 1999).

En el estudio de las infecciones fúngicas invasoras, han sido utilizados numerosos métodos de tipificación. Todos ellos han tenido múltiples ventajas y desventajas, sin haber un método unánimemente aceptado (Soll, 2000).

En el género *Candida* se han utilizado para su tipificación las técnicas de MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), hibridación con sondas específicas por Southern blot, PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). El MLEE se basa en perfiles isoenzimáticos, mientras que los demás métodos se basan en patrones de bandeo de fragmentos de ADN. Varias de estas técnicas han mostrado niveles de resolución similares entre sí (Soll, 2000; Pujol et al., 1997); sin embargo, tienen algunas desventajas, como el tiempo que requieren, el uso de elementos radiactivos, poca reproducibilidad, y bajo poder de discriminación (Spampinato & Leonardi, 2013).

Otros métodos utilizados han sido los microsatélites y el MLST (Multilocus Sequence Typing). Estos son métodos basados en el análisis de ADN, y resultaron ser los más

reproducibles y comparables entre distintos laboratorios con un alto nivel de confianza (Lyon et al., 2010). Las ventajas que tienen sobre los métodos clásicos son que ofrecen un poder de discriminación muy alto, reproducibilidad, son fáciles de usar, y brindan rápidamente información confiable (Spampinato & Leonardi, 2013).

### **1.5.1. Microsatélites**

Los microsatélites (también llamados STR, del inglés short tandem repeats o SSR, simple sequence repeats) son fragmentos de ADN repetidos en tándem, compuestos por unidades de uno a seis pares de bases. Son ubicuos en los genomas de organismos procariontes y eucariotes (Tóth et al., 2000).

Fueron descubiertos a comienzos de la década de 1980. Son altamente variables por su alta tasa de mutación. El polimorfismo en los microsatélites es causado por variaciones en el largo y no en la secuencia primaria del ADN. Estas variaciones en el largo se dan mayoritariamente por diferencias en el número de motivos repetidos, causadas por errores durante la replicación (Toth, 2000; Ellegren, 2004; Selkoe & Toonen, 2006).

La fidelidad en la replicación del ADN se mantiene gracias a un sistema que reconoce secuencias de ADN mal apareadas y las corrige. Este sistema se encuentra codificado por un conjunto de genes denominados “mismatch repair genes”. La inactivación de estos sistemas de reparación causa inestabilidad genómica. Una de las consecuencias de esta inestabilidad son las mutaciones en las regiones de microsatélites (Yamauchi & Uchiyama, 2007).

Las diferencias en el tamaño de estos fragmentos de ADN constituyen las diferencias alélicas dentro de cada marcador microsatélite.

La secuencia de la región flanqueante de los microsatélites es generalmente conservada entre individuos de una misma especie; por lo tanto, los cebadores para amplificarlos se diseñan en base a esta región (Selkoe & Toonen, 2006)

Los microsatélites poseen un nivel importante de polimorfismo entre individuos de la misma especie. Por esta razón han sido ampliamente utilizados para pruebas de paternidad, medicina forense y tipificación molecular de diversos organismos (Jubany et al., 2008). A partir del desarrollo de la PCR a fines de la década de 1980 los

microsatélites se convirtieron en importantes marcadores para estudios genéticos (Ellegren, 2004).

Los microsatélites en levaduras han mostrado ser buenos marcadores por el gran polimorfismo encontrado, permitiendo analizar su estructura poblacional, la tipificación de cepas y realizar estudios epidemiológicos (Sampaio et al., 2005). En *C. albicans* y *C. parapsilosis* han sido utilizados con éxito, permitiendo tener un alto poder de discriminación entre cepas no relacionadas. Por esta razón son útiles en el análisis poblacional y en el estudio de brotes (Bretagne et al., 1997; Botterel et al., 2001; Sampaio et al., 2003; Sampaio et al., 2005; Lasker et al., 2006; Sabino et al., 2010, Diab-Elschahawi et al., 2012).

En este trabajo se evaluarán marcadores microsatélites que se encuentran descritos en la literatura, y se seleccionarán los que se adecuen a la metodología a emplear.

La primera descripción de análisis mediante microsatélites de *C. albicans* fue hecha por Bretagne et al. (1997), donde se describió el microsatélite EF3. Este marcador es un fragmento de la secuencia promotora del gen del factor de elongación 3, presente en el cromosoma 5 de *C. albicans*. Es un marcador complejo, ya que está compuesto por dos motivos repetidos distintos.

En 2001, Botterel et al. describieron dos marcadores adicionales, que se utilizaron en conjunto con el marcador EF3. Estos marcadores son HIS3 y CDC3. HIS3 corresponde a un fragmento ubicado secuencia abajo del gen imidazol glicerol fosfato deshidratasa, ubicado en el cromosoma 2, y está formado por un motivo repetido de cuatro pares de bases. CDC3 también está formado por un motivo repetido de tetranucleótidos y corresponde a un fragmento secuencia abajo del gen que codifica para una proteína del ciclo de división celular, ubicado en el cromosoma 1. El poder de discriminación de estos tres marcadores según el índice de Simpson es de 0,97.

Posteriormente se describió otro conjunto de marcadores microsatélites para *C. albicans*. El primero de estos marcadores fue descrito por Sampaio et al. (2003). Este marcador, llamado CAI se encuentra en una región no codificante del genoma, posee un poder de discriminación de 0,97 y está compuesto por un motivo repetido complejo. Los restantes marcadores, descritos por Sampaio et al. (2005) también se encuentran en regiones del genoma no codificantes, y son: CAIII, CAV, CAVI y CAVII. CAIII y CAV contienen un motivo repetido de tres pares de bases y se encuentran ubicados en el cromosoma 5 y 3 respectivamente. CAVI tiene un motivo repetido de cuatro pares de

bases y está en el cromosoma 2. CAVII tiene un motivo repetido de cinco pares de bases y se ubica en el cromosoma 1. Este conjunto de cinco marcadores permite un poder de discriminación de 0,99.

La primera descripción de microsatélites para *C. parapsilosis* fue llevada a cabo por Lasker et al. (2006). Lasker describió un conjunto de siete marcadores, denominados de la A a la G, seis de ellos formados por un motivo repetido de dos pares de bases y uno por un motivo de tres pares de bases. El poder de discriminación descrito para este conjunto de marcadores es de 0,97.

Sabino et al. (2010) propusieron un conjunto de marcadores microsatélites, formado por 3 nuevos marcadores: CP1, CP4 y CP6 y un marcador previamente descrito por Lasker, B, al cual llamaron B5. Los tres nuevos marcadores están formados por un motivo repetido de tres pares de bases. Estos cuatro marcadores presentan un poder de discriminación de 0,99.

La descripción más reciente de microsatélites para *C. parapsilosis* es de Diab-Elschahawi et al., 2012. En este caso se utilizaron seis marcadores microsatélites, tres de ellos son 3A, 3B, y 3C, que son los ya descritos CP1, CP4 y CP6, amplificados con otros cebadores y tres nuevos marcadores: 6A, 6B y 6C, con motivos repetidos de seis pares de bases.

### **1.5.2. Multilocus Sequence Typing**

El método de multilocus sequence typing (MLST) se basa en el análisis de secuencias codificantes específicas, generalmente de seis a ocho pares de bases, ubicadas en cromosomas diferentes. Fue descrito por primera vez por Maiden et al. (1998) mostrando un alto poder de discriminación. Los datos provenientes de secuencias de ADN ofrecen un alto nivel de reproducibilidad y reducen la subjetividad del análisis. El fácil acceso a la información a través de bases de datos en internet permite comparar los resultados entre diferentes laboratorios (Odds et al., 2007).

El análisis de secuencias de varios loci permite analizar clonalidad y recombinación en poblaciones, y también permite tipificar aislamientos dentro de una especie (Odds et al., 2007).

Los estudios realizados en *C. albicans* en la última década utilizando la metodología de MLST han aportado información relevante sobre la estructura poblacional y la variabilidad geográfica de la especie (Da Matta et al., 2010).

Para *C. albicans*, así como para otras especies del género *Candida* fueron establecidos esquemas de trabajo con MLST. Sin embargo, *C. parapsilosis* no ha mostrado suficiente diversidad nucleotídica como para ser tipificada mediante este método (Odds & Jacobsen, 2008).

La primera descripción de un esquema de MLST para *C. albicans* fue realizada por Bounoux et al. (2002), seguido de Tavanti et al. (2003). Finalmente se estableció un consenso entre ambos, basado en siete secuencias, que es el actualmente aceptado y en el que se sustenta la base de datos <http://calbicans.mlst.net> (Bounoux et al., 2003). El poder de discriminación de este método es de 0,99 según la fórmula de Hunter (Hunter, 1990).

A través del MLST se determinan 5 clados principales de *C. albicans*, denominados 1, 2, 3 ,4 y 11 y otros grupos minoritarios. Estos coinciden con los clados determinados previamente mediante RAPD, MLEE e hibridación con la sonda Ca3 mediante Southern blot (Odds 2010). En estos se refleja principalmente una asociación geográfica entre los aislamientos, explicada por una evolución histórica independiente de cada clado (MacCallum et al., 2009). A pesar de esto, debido al mayor desplazamiento de las personas, se ha dado la transmisión de los aislamientos entre las distintas regiones (Odds, 2010). El clado mayoritario es el 1, abarca el 33% de los aislamientos, y se encuentra distribuido globalmente. Está asociado a una susceptibilidad reducida a la 5-fluorocitosina. También se ha visto en este una proporción mayor de aislamientos tolerantes a altas concentraciones de sales. Por sus características, los aislamientos del clado 1 serían los que evolucionaron mejor como colonizadores; sin embargo, por no haber diferencias en cuanto a la virulencia de los aislamientos en los distintos clados, una vez que colonizan tendrían la misma probabilidad de causar infección en el individuo (Odds, 2010).



## 2. JUSTIFICACIÓN

El avance de las IFI es un proceso ligado a los avances médicos y al aumento de la población de riesgo. Por esto, es de esperar que su incidencia continúe aumentando, así como su resistencia a antifúngicos.

Esta problemática ha llevado a la creación de redes de vigilancia, entre las que se encuentra la Red Latinoamericana de vigilancia de IFI. Esta red está enfocada a la vigilancia de la incidencia, distribución y susceptibilidad antifúngica de las diferentes especies. Los trabajos publicados en la región enfocan también la problemática desde el mismo ángulo epidemiológico y de sensibilidad.

No hay antecedentes sustentados en las redes de vigilancia que utilicen herramientas moleculares para el análisis poblacional y el análisis de brotes.

*C. albicans* y *C. parapsilosis* son las especies causantes de IFI predominantes en nuestro país y la región pero desconocemos el comportamiento poblacional de estas especies.

Por estas razones, nos planteamos combinar un análisis epidemiológico con técnicas moleculares para analizar el comportamiento de estas especies en nuestro país, utilizando las técnicas de marcadores microsatélites y multilocus sequence typing, que han demostrado su utilidad para analizar la estructura poblacional y la diversidad.

Este trabajo sería pionero en su tipo por la aplicación de estas técnicas a la descripción poblacional, unido con la vigilancia y el estudio de casos agrupados, tanto en nuestro país como la región.

El producto final constituiría una línea de base para el análisis de la dinámica poblacional de estas especies prevalentes en la región y una metodología epidemiológica a implementar en el análisis de las IFI.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Disponer de una herramienta epidemiológica aplicable al contexto regional y generar información molecular novedosa para el análisis epidemiológico y poblacional de las principales especies causantes de infecciones fúngicas invasoras en Uruguay.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Poner a punto una técnica de análisis de microsatélites de bajo costo operativo, mediante electroforesis en gel de acrilamida, tanto para *C. albicans* como para *C. parapsilosis*.
- Caracterizar aislamientos de ambas especies mediante microsatélites.
- Analizar comparativamente mediante MLST una muestra de aislamientos de *C. albicans*.
- Aplicar la herramienta de microsatélites al análisis epidemiológico de casos agrupados de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
- Realizar la primera descripción de la estructura poblacional de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en Uruguay.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

Todos los aislamientos analizados fueron procedentes de infecciones profundas detectadas en diferentes centros centinela de la Red de Vigilancia de Infecciones Fúngicas de Uruguay. Las infecciones profundas se definieron como aquellas que ocurren en sitios habitualmente estériles del organismo, tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, catéteres, etc).

Las identificaciones de especie se llevaron a cabo en el DLSP mediante métodos fenotípicos y moleculares de rutina. Los métodos fenotípicos utilizados fueron el cultivo en medio cromogénico y medio agar-harina de maíz para la visualización micro y macroscópica de los aislamientos. La asimilación de fuentes de carbono se analizó mediante la galería ID32c (Biomerieux) y el programa Apiweb (Biomerieux). La identificación molecular requirió la amplificación y secuenciación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer), región no codificante de espaciadores internos del ADN ribosómico y su posterior análisis en las bases de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y CBS-KNAW (<http://www.cbs.knaw.nl>). Se realizó una PCR dúplex para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Para esto se utilizaron cebadores para amplificar la región ITS y cebadores específicos para el gen de la actina de *C. dubliniensis*, según Donnelly et al. (1999).

El análisis de la susceptibilidad antifúngica de los aislamientos fue realizado mediante el método de microdilución en placa, EUCAST (Arendrup et al., 2012). Los antifúngicos analizados fueron: Anfotericina B, 5-Fluorocitosina, los azoles Fluconazol, Itraconazol, y Voriconazol, y las equinocandinas Caspofungina y Anidulagungina

Desde el momento de su identificación los aislamientos fueron conservados en glicerol al 10%, a -80° C.

La información epidemiológica fue tomada de la base de datos en línea de la Red de Infecciones Fúngicas Invasoras de Uruguay. Esta Red cuenta con información biológica de todos los aislamientos y con la información clínica relativa a estos. En base a esta información se realizó un análisis comparativo de las variables epidemiológicas entre las dos especies. Las diferencias se analizaron mediante el test de Chi cuadrado de Pearson para determinar su significación estadística.

#### 4.1.2. Aislamientos analizados mediante microsatélites

Se obtuvieron dos colecciones de aislamientos, una de *C. albicans* y otra de *C. parapsilosis*.

Para *C. albicans* se seleccionaron los 54 aislamientos notificados en la red de vigilancia entre agosto de 2010 y marzo de 2013 (Tabla 1).

Adicionalmente se utilizaron las cepas de *C. albicans* ATCC 64548 y ATCC 64550.

Para *C. parapsilosis* se seleccionaron los 57 aislamientos notificados en la red de vigilancia entre junio de 2008 y julio de 2012 (Tabla 1).

Se incluyó la cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

En los anexos I y II se encuentra detallada la información epidemiológica de los aislamientos de *C. albicans* y *C. parapsilosis* respectivamente.

**Tabla 1. Distribución de aislamientos de *C. albicans* y *C. parapsilosis* por centro hospitalario de procedencia.**

Procedencia	N (%) <i>C. albicans</i>	N (%) <i>C. parapsilosis</i>
Asociación Española	20 (37%)	18 (32%)
Hospital Maciel	13 (24%)	17 (30%)
Casmu	11 (20%)	4 (7%)
Medica Uruguaya	6 (11%)	4 (7%)
Centro Hospitalario Pereira Rossell	5 (9%)	5 (9%)
Hospital Pasteur	0	2 (4%)
Cudam	0	1 (2%)
Hospital Evangélico	0	1 (2%)
Hospital de Florida	0	3 (5%)
Hospital de Salto	0	1 (2%)
Hospital de Paysandú	0	1 (2%)
Total	54	57

#### 4.1.2. Aislamientos de *C. albicans* analizados mediante MLST

El costo operativo de esta técnica condicionó el número de aislamientos analizados. Por esta razón se seleccionó una muestra de conveniencia de ocho aislamientos, en base a los resultados de los marcadores microsatélites. Se busco abarcar una gama de alelos

compartidos, de forma tal que se obtuvieron desde aislamientos indistinguibles mediante microsatélites hasta otros completamente distintos.

## 4.2. Marcadores genéticos

### 4.2.1. Marcadores microsatélites

Los marcadores microsatélites seleccionados se encontraban previamente descritos en la literatura.

Para *C. albicans* se seleccionaron los marcadores EF3, HIS3 y CDC3 (Bretagne et al., 1997, Botterel et al., 2001).

Para *C. parapsilosis* se seleccionaron los marcadores CP1, CP4, CP6 y B5 (Sabino et al., 2010).

En las tablas 2 y 3 se muestran las características descriptivas de cada marcador microsatélite.

**Tabla 2. Características de los marcadores microsatélites de *C. albicans* descritas por Bretagne et al., 1997 y Botterel et al., 2001.**

Nombre del marcador	Motivo repetido	Tamaño (pb)	Cromosoma	Tamaño de la región constante	Poder de discriminación
EF3	(TTTC) <sub>n</sub> (TTC) <sub>n</sub>	126-146	5	101	0,86
HIS3	(ATTT) <sub>n</sub>	150-218	2	125	0,91
CDC3	(AGTA) <sub>n</sub>	113-129	1	95	0,77

**Tabla 3. Características de los marcadores microsatélites de *C. parapsilosis* descritas por Sabino et al., 2010.**

Nombre del marcador	Motivo repetido	Tamaño (pb)	Tamaño de la región constante	Poder de discriminación
CP1	(AAG) <sub>n</sub>	207-270	162	0,85
CP4	(AAC) <sub>n</sub>	240-426	209	0,89
CP6	(AAC) <sub>n</sub>	177-375	156	0,96
B5	(CA) <sub>n</sub>	95-153	75	0,86

#### 4.2.2. Marcadores MLST

Se utilizaron los siete marcadores establecidos por consenso para *C. albicans* (Bougnoux et al., 2003). En la tabla 4 se detallan las características descriptivas de estos marcadores.

**Tabla 4. Características de los marcadores para MLST descritas por Bougnoux et al., 2003**

Nombre del marcador	Gen	Tamaño del amplicón (pb)
AAT1	Aspartato aminotransferasa	478
ACC1	Acetil Co-A carboxilasa	519
ADP1	Transportador ABC	537
MPIb	Proteína PMI1	486
SYA1	Proteína ALA1	543
VPS13	Proteína VPS13	741
ZWF1b	Glucosa-G-fosfato deshidrogenasa	702

#### 4.3. Obtención del material genético

##### 4.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de todos los aislamientos se realizó a partir de cultivos de 24 hs en medio líquido YPD con agitación a 50 rpm, a 30° C. La extracción correspondiente a los aislamientos de *C. albicans* se realizó con el sistema comercial “Ultraclean microbial DNA isolation kit” (Mobio) y la de los aislamientos de *C. parapsilosis* mediante el sistema comercial “Quick-gDNA Mini Prep” (Zymo Research) y el sistema comercial “Ultraclean microbial DNA isolation kit” (Mobio Laboratories, Inc).

Los procedimientos fueron realizados en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante, y están detallados en el anexo III.

La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio. Se estimó visualmente cantidad y ausencia de degradación.

### **4.3.2. Productos de PCR**

#### **4.3.2.1 Microsatélites**

La amplificación de los marcadores de *C. albicans* requirió la puesta a punto de tres PCR individuales, basadas en las PCR multiplex descritas por Botterel et al. (2001) y Garcia-Hermoso et al. (2007) para estos marcadores (Anexo III)

En el caso de *C. parapsilosis* la amplificación requirió la puesta a punto de una PCR para cada uno de los cuatro marcadores a partir de la PCR multiplex descrita por Sabino et al. (2010) (Anexo III)

#### **4.3.2.2 MLST**

Las reacciones de PCR de cada marcador se optimizaron basándose en las reacciones descritas por Bougnoux et al. (2002) y Tavanti et al. (2003) (Anexo III).

Todos los productos de PCR se conservaron a -20° C hasta su utilización.

### **4.3.3. Verificación y cuantificación de los productos de PCR**

Todos los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5 %, teñidos con bromuro de etidio en los que se incluyó un indicador de masa molecular (Precision Molecular Mass Ruler, Bio-Rad).

La cuantificación de los productos de PCR se realizó mediante el programa de análisis de geles GelCompar II, versión 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), para estandarizar la cantidad de ADN a correr en el gel de acrilamida.

En el programa GelCompar se trabaja a partir de una imagen digital del gel. En base a la cantidad de ADN conocida del marcador de peso molecular, el programa calcula la cantidad de ADN en las bandas del gel a través de un algoritmo de cálculo basado en la intensidad de las bandas y su superficie.

## **4.4. Análisis del material genético**

### **4.4.1. Microsatélites**

#### **4.4.1.2 Electroforesis en geles de acrilamida**

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles desnaturalizantes de 0,4 mm de espesor de poliacrilamida al 5% (19:1 acrilamida:bisacrilamida) y urea 7M. La cuba utilizada fue la cuba vertical de secuenciación Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell (Bio-Rad).

Luego de ensayos con diferentes concentraciones, se determinó que la cantidad óptima de ADN a correr en el gel para una correcta visualización de las bandas al teñirlo es entre 5 y 10 ng totales. Por lo tanto en el gel se cargaron 5 µl de producto de PCR diluido hasta 1-2 ng/µl en tampón de carga STR.

Los geles fueron precalentados hasta 55°C, a una potencia de 65-70W.

Las muestras se colocaron 6 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN, e inmediatamente en hielo, donde permanecieron hasta el momento de ser cargadas en el gel.

La temperatura en que se corrió el gel fue de 50 °C y la potencia para mantener dicha temperatura osciló entre 55-65 W.

El tiempo de corrida depende del tamaño de las muestras. El tampón de carga contiene dos frentes de corrida que son el xilen cyanol y el azul de bromofenol, que corren como 140 y 35 pares de bases respectivamente. Los frentes de corrida permiten estimar donde se encuentran las bandas de ADN.

En los dos carriles laterales y el carril central de cada gel se corrieron 4 ng de un estándar de tamaño molecular de 10 pares de bases (10 bp DNA ladder, Invitrogen) que permitió posteriormente calcular el tamaño de cada banda de ADN con el programa GelCompar e inferir el número de repetidos.

En el anexo III se encuentra el protocolo detallado de la electroforesis.

#### **4.4.1.2. Visualización y análisis de los geles de acrilamida**

El método elegido para teñir los geles de acrilamida fue con nitrato de plata.

Se modificó el método de tinción con nitrato de plata descrito por Benbouza et al. (2006) (Anexo III).



Los geles teñidos y secos se escanearon para obtener una imagen digital apta para ser procesada en el programa GelCompar (Fig. 1.a). El análisis en este programa consiste en la captura de la imagen, normalización de la misma y finalmente el cálculo de los tamaños de las bandas. La normalización permite corregir defectos del gel propios de la corrida y hacer los geles comparables entre sí.

Como referencia para el cálculo se utilizó el marcador de peso molecular de 10 pb. Este marcador permitió normalizar los geles.

El programa GelCompar permite graficar las bandas del gel en función de su intensidad. Se estableció como criterio que el tamaño de la banda es el que se encuentra en el punto más alto del pico de intensidad (Fig. 1.b).

A su vez, los tamaños de las bandas obtenidos se ajustaron para lograr un tamaño esperable de cada alelo. Este resulta de la suma del tamaño de su región constante y un múltiplo de su motivo repetido.

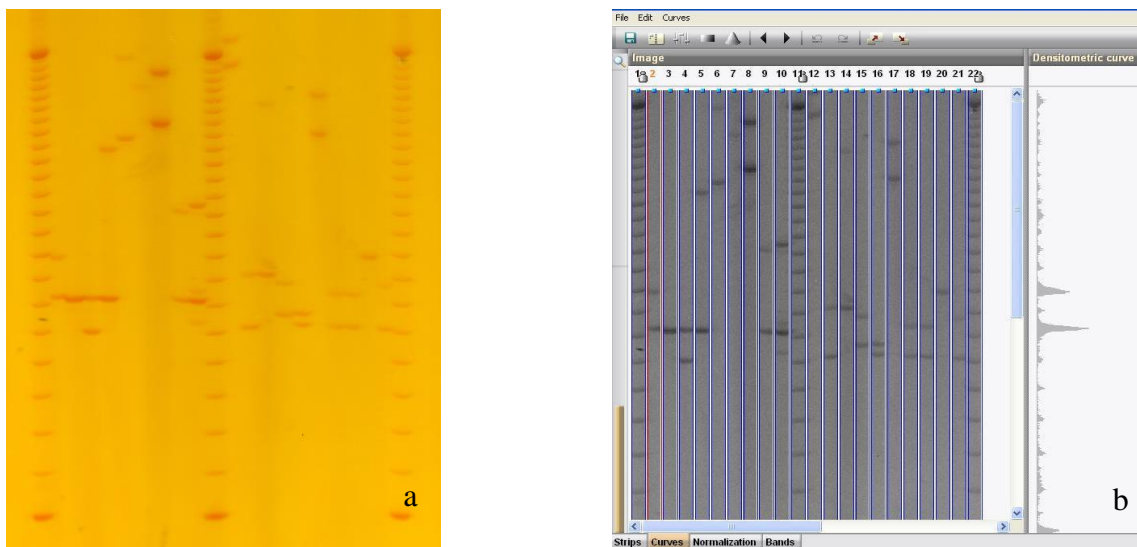


Fig. 1. **a.** Imagen de gel de acrilamida teñido con nitrato de plata. **b.** Imagen de gel de acrilamida siendo procesada en el programa GelCompar.

#### **4.4.2. Secuenciación de productos de PCR**

Los productos se purificaron mediante el kit de purificación High Pure PCR (Roche) y se enviaron a secuenciar a MacroGen (Korea). Allí se llevó a cabo la secuenciación mediante el secuenciador 3730XL de Applied Biosystems.

Las secuencias se analizaron mediante el programa SeqMan II v.5.0 (DNASTAR INC, 2001).

##### **4.4.2.1. Productos de PCR de Microsatélites**

Se seleccionaron productos de tres marcadores microsatélites (CP1, CP4 y CP6) de aislamientos homocigotas de *C. parapsilosis*, amplificados según 4.3.2.1.

Se comparó el número de repetidos encontrados en la secuencia con el número estimado con el programa GelCompar.

##### **4.4.2.2. Productos de PCR de MLST**

Se enviaron los productos de PCR de cada uno de los marcadores MLST de los ocho aislamientos seleccionados, amplificados según 4.3.2.2.

Cada secuencia se alineó y cortó en el programa Mega v.4.0 (Tamura et al., 2007) con la secuencia consenso de su gen correspondiente.

#### **4.5. Análisis de datos de microsatélites**

##### **4.5.1 Análisis poblacionales**

La información alélica de los aislamientos se utilizó para estimar los principales parámetros descriptivos poblacionales de cada especie, tales como heterocigosidad y frecuencias alélicas y genotípicas. Las frecuencias genotípicas y la heterocigosidad observada se compararon con los valores esperados mediante el Equilibrio Hardy-Weinberg (HW). Se calculó para cada marcador el coeficiente de endogamia de Wright ( $F_{is}$ ) (Wright, 1951), que indica el exceso o déficit de heterocigotas en una población respecto al esperado por el equilibrio H-W. Para esto se utilizaron los programas Arlequín v 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) y GenAlex v 6.5 (Peakall & Smouse, 2006).

Las distancias genéticas entre los aislamientos de cada especie se representaron en un árbol de expansión mínima (“Minimum Spanning Trees”), utilizando el programa SplitsTree v 4.13.1 (Huson y Bryant, 2006). El algoritmo de estos árboles realiza la mínima representación espacial de las distancias genéticas.

La estructura poblacional se analizó con los programas Structure v 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) y Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

El programa Structure se basa en un algoritmo probabilístico que no asume ningún modelo de mutación, permitiendo el análisis de una variedad de marcadores genéticos. Este infiere la estructura de una población utilizando información procedente de loci no relacionados. Estos loci son agrupados de acuerdo a sus frecuencias alélicas (Pritchard et al., 2000). El algoritmo permite simular diferentes escenarios de subdivisión poblacional, asignando probabilísticamente a los individuos a esas subpoblaciones.

El rango de subpoblaciones simuladas (K) fue desde K=1 hasta K=5, con 10 réplicas para cada subdivisión.

El programa Structure Harvester procesa los resultados del Structure, y realiza una aproximación matemática más precisa para determinar cuál es el número de subpoblaciones más probable, basándose en el modelo matemático de Evanno. Este modelo utiliza los valores de probabilidad de existencia de las distintas de subpoblaciones (K), calculadas por el Structure (Evanno et al., 2005; Russell et al., 2014). Luego, con el programa Arlequín se realizó un análisis de AMOVA (Analysis of Molecular Variance) para verificar si estas subpoblaciones son significativamente diferentes entre sí.

Una vez definido el número de subpoblaciones se asignaron los aislamientos a una de ellas en base a su probabilidad de pertenencia. Se tomó como punto de corte el valor 0.80. Los aislamientos con probabilidad inferior a 0,80 se consideraron intermedios. (Salipante & Hall, 2011).

#### **4.5.2. Análisis epidemiológicos**

Se compararon las subpoblaciones obtenidas dentro de cada especie en función de distintas variables epidemiológicas. Se utilizó el test de Chi cuadrado de Pearson para determinar el nivel de significación estadística entre las eventuales diferencias encontradas entre las subpoblaciones para cada una de las variables seleccionadas. En

aquellos casos donde el número de aislamientos fue menor o igual a cinco se aplicó la corrección de Yates. En los casos donde hubo datos perdidos, estos no fueron tenidos en cuenta.

Las variables epidemiológicas seleccionadas para este análisis fueron: procedencia, internación en CTI, material de origen del aislamiento, año de aislamiento, sexo del paciente y edad (niño/adulto). Además se compararon los valores de concentración inhibitoria mínima entre las subpoblaciones para los antifúngicos: Anfotericina, 5-Fluorocitosina, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Caspofungina y Anidulafungina.

#### **4.6. Análisis de datos de MLST**

Las secuencias de los siete marcadores MLST se analizaron en el sitio [www.mlst.net/calbicans](http://www.mlst.net/calbicans). Este sitio es una base de datos internacional de secuencias de los marcadores consenso de MSLT, correspondientes a aislamientos clínicos.

Cada secuencia específica de un marcador configura un alelo. La combinación de los siete alelos de un aislamiento define un perfil, denominado DST (“diploid sequence type”). Cada aislamiento presente en la base de datos también posee información adicional sobre su origen geográfico.

Las secuencias de los ocho aislamientos fueron subidas a la base de datos, obteniéndose el número de alelo correspondiente a cada secuencia.

Con la combinación de siete alelos se obtuvo el DST de cada aislamiento. Si esta combinación de alelos no se encuentra en la base de datos, se tratará de un nuevo DST.

## **5. RESULTADOS.**

### **5.1. Origen de los aislamientos de ambas especies**

Los 54 aislamientos de *C. albicans* procedieron de 52 pacientes. La mediana de edad en este grupo fue de 67 años, con un percentil 25 (p25) de 49 años y un percentil 75 (p75) de 77 años. De ellos, 33 (65%) se encontraban internados en CTI al momento del aislamiento.

De los aislamientos de *C. albicans*, 33 (61%) procedieron de hemocultivos, 10 (18,5%) de líquido peritoneal, y nueve (16,7%) de cultivo de catéter. Un aislamiento se originó en líquido cefalorraquídeo y otro en líquido biliar.

El grupo de *C. parapsilosis* consistió en 57 aislamientos procedentes de 50 pacientes. La mediana de edad fue de 57 años, con un p25 de 25 años y un p75 de 69 años. Al momento del aislamiento, 23 (46%) pacientes estaban internados en CTI.

En cuanto a su procedencia, 43 aislamientos (75,5%) fueron obtenidos de hemocultivos, 10 (17,5%) de cultivo de catéter, dos de tejido óseo y dos de líquido peritoneal.

La información epidemiológica completa de todos los aislamientos se encuentra en los anexos I y II.

Según estas variables epidemiológicas, las diferencias fueron significativas para las variables internación en CTI y procedencia de líquido peritoneal. La proporción de pacientes infectados con *C. albicans* que estaban internados en CTI fue significativamente mayor que aquéllos con *C. parapsilosis*, con un valor p de 0,03. La presencia de *C. albicans* en líquido peritoneal fue significativamente mayor que la de *C. parapsilosis* con un valor p de 0,01.

### **5.2. Caracterización de los marcadores microsatélites**

#### **5.2.1. Visualización y determinación de alelos microsatélites**

En la figura 2 se muestran las imágenes de los geles de acrilamida resultantes de los marcadores de *C. albicans*. Como se puede observar las bandas están bien definidas, por lo que no presentaron dificultades en su análisis.

En la figura 3 se muestran las imágenes correspondientes a los marcadores de *C.*

*parapsilosis*. En este caso se estableció un criterio para seleccionar las bandas ya que los productos de PCR presentaron “stuttering”. El stuttering es un artefacto de la PCR, generado por errores de la polimerasa cuando amplifica una secuencia altamente repetitiva, que da como resultado la amplificación de bandas secundarias, además de la banda correspondiente al producto. Este artefacto fue una característica que se observó en todos los marcadores de *C. parapsilosis*. Las bandas de stuttering se reconocen por encontrarse equidistantes, ya que difieren en una o más unidades del repetido del microsatélite. El criterio para seleccionar las bandas fue seleccionar la banda con el mayor pico de intensidad en el programa GelCompar.

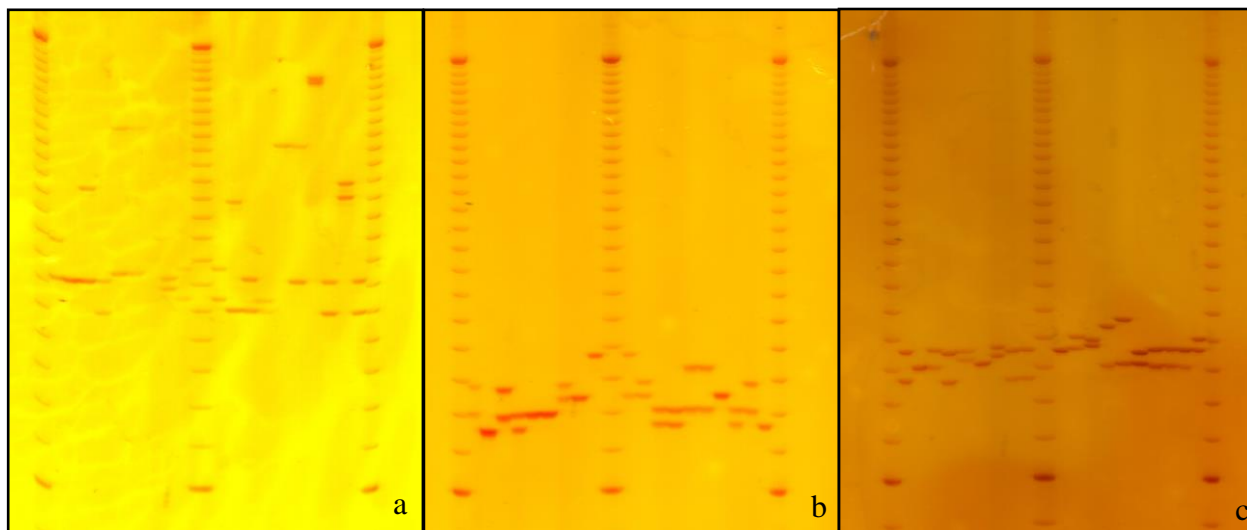
Finalmente, el número de alelos obtenidos para cada especie fue seis, ya que ambas son diploides y para cada especie se analizaron tres marcadores.

El marcador B5 de *C. parapsilosis* fue descartado ya que presentó dificultades a la hora de su análisis, y no fue posible obtener resultados. A pesar de optimizar la PCR para este marcador, su amplificación fue baja, lo cual hizo muy difícil su visualización en el gel de poliacrilamida. Adicionalmente, los escasos productos que se pudieron visualizar presentaron mucho stuttering, lo que representó una dificultad adicional para asignar la banda correcta.

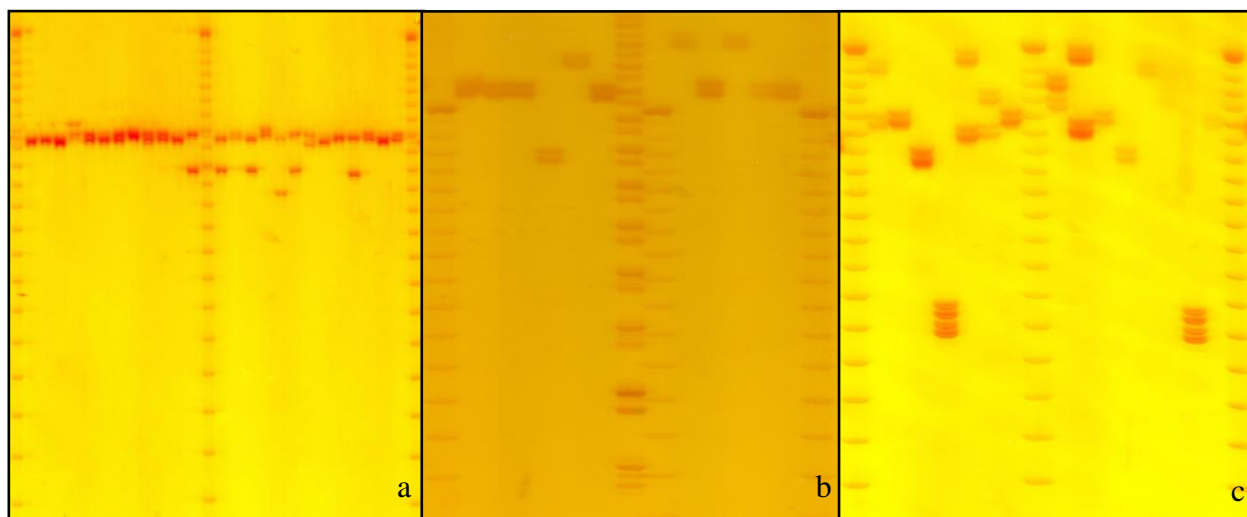
En el caso de *C. albicans*, por poseer un marcador irregular (EF3) que no permite inferir el número de repetidos presentes en el fragmento de ADN a partir de su tamaño, se utilizó para los tres marcadores el tamaño de fragmento amplificado, para que fueran comparables.

En el caso de *C. parapsilosis*, por conocerse el motivo repetido y el tamaño de la región constante, un alelo de microsatélite se definió como el número de repetidos presentes en el fragmento amplificado.

En los anexos IV y V se muestra detallado cada perfil de alelos obtenido para todos los aislamientos.



**Fig. 2.** Imágenes de los geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata correspondientes a los tres marcadores microsatélites de *C. albicans*. **a.** HIS. **b.** CDC3. **c.** EF3.



**Fig. 3.** Imágenes de los geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata correspondientes a los microsatélites de *C. parapsilosis*. **a.** CP1. **b.** CP4. **c.** CP6.

Las secuencias obtenidas para los tres marcadores tuvieron el tamaño esperado, como se observa en la tabla 5. El tamaño total del fragmento coincide con el número de repetidos inferido.

**Tabla 5. Comparación de alelos obtenidos mediante la técnica de gel de acrilamida y mediante secuenciación en aislamientos de *C. parapsilosis***

Marcador (Aislamiento)	Tamaño obtenido en el gel (N° de repetidos)	Tamaño fragmento secuenciado (N° de repetidos)
CP1 (902028)	246 (28)	246 (28)
CP4 (706031)	344 (45)	344 (45)
CP6 (223024)	258 (34)	258 (34)

### 5.2.2. Parámetros descriptivos de los marcadores microsatélites

Se calculó, tanto para cada marcador microsatélite como para cada conjunto de marcadores, el poder de discriminación. Éste se calculó mediante el Índice de Diversidad de Simpson (DP):

$$DP = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj - 1)$$

En esta fórmula,  $N$  representa el número total de aislamientos de una especie,  $s$  es el número de genotipos encontrados y  $n_j$  el número de individuos con un mismo genotipo. El cálculo representa la probabilidad de que dos aislamientos de la colección no relacionados se adjudiquen como distintos (Hunter & Gaston, 1988).

Como se puede observar en la tabla 6, el marcador más polimórfico para *C. albicans* resultó ser HIS3, con 35 alelos (38 genotipos), seguido de EF3 y CDC3 con 19 y siete alelos (21 y 15 genotipos) respectivamente. El poder de discriminación fue de 0,97 para HIS3, 0,91 para EF3 y 0,90 para CDC3. Los marcadores de *C. albicans* poseen 61 alelos (46 genotipos), con un poder de discriminación total de 0,99.

En cuanto a *C. parapsilosis*, se observa en la tabla 7 que el marcador más polimórfico resultó ser CP6, que generó 26 alelos (34 genotipos) y su poder de discriminación fue



de 0,97. Le sigue el marcador CP4, con 20 alelos (19 genotipos) y un poder de discriminación de 0,92 y CP1, con ocho alelos (10 genotipos) y un poder de discriminación de 0,72. En total, estos tres marcadores tienen 54 alelos (49 genotipos), que dan un poder de discriminación de 0,99.

**Tabla 6. Parámetros descriptivos de los marcadores microsatélites de *C. albicans***

Marcador	Nº de alelos	Rango de tamaños (pb)	Nº de Repetidos*	Nº de genotipos	Poder de discriminación
EF3	19	126-156	-----	21	0,91
HIS3	35	145-353	5-57	38	0,97
CDC3	7	115-139	5-11	15	0,90

\* Resultante de la diferencia entre el tamaño de las bandas y el de la región constante

**Tabla 7. Parámetros descriptivos de los marcadores microsatélites de *C. parapsilosis***

Marcador	Nº de alelos	Rango de tamaños (pb)	Nº de Repetidos*	Nº de genotipos	Poder de discriminación
CP1	8	216-264	18-34	10	0,72
CP4	20	293-410	28-67	19	0,92
CP6	26	189-330	11-58	34	0,97

\* Resultante de la diferencia entre el tamaño de las bandas y el de la región constante

### 5.3. Poblaciones

#### 5.3.1. Parámetros generales de ambas poblaciones

##### *C. albicans*

Cuando se analizó la frecuencia observada de los genotipos de cada marcador en la población resultó ser significativamente diferente a la esperada por el equilibrio Hardy Weinberg, con un valor  $p < 0.001$ .

La diferencia entre la heterocigosidad observada de los tres marcadores, respecto a la esperada por el equilibrio de H-W se analizó a través del coeficiente de endogamia de Wright,  $F_{IS}$ . Los marcadores EF3 y CDC3 mostraron una deficiencia de heterocigosidad, indicada por el valor positivo del  $F_{IS}$ , mientras que HIS3 mostro un leve exceso de

heterocigosidad. Las diferencias en EF3 y HIS3 no resultaron significativas, pero si lo fueron en el marcador CDC3 (Tabla 8). El  $F_{IS}$  de los tres marcadores en conjunto es de 0,082, mostrando una leve deficiencia de heterocigosidad, que resultó ser estadísticamente significativa, con un valor p de 0,008.

### ***C. parapsilosis***

La frecuencia de los genotipos de cada marcador observada en la población resultó ser significativamente diferente a la esperada por el equilibrio Hardy-Weinberg, con un valor  $p < 0.001$ .

En los tres marcadores, la heterocigosidad observada respecto a la esperada por el equilibrio H-W resultó ser menor, con una deficiencia de heterocigosidad, mostrada por los valores positivos y altos del  $F_{IS}$  (Tabla 9). El  $F_{IS}$  de los tres marcadores en conjunto es de 0,728, mostrando también una deficiencia de heterocigosidad significativa, con un valor  $p < 0,001$ .

**Tabla 8. Parámetros descriptivos y poblacionales de los marcadores microsatélites de *C. albicans***

Marcador	Nº de alelos	Nº de repetidos	Nº de genotipos	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	DP*	Heterocigosidad Ho-He**	$F_{IS}$ (valor p)
EF3	19	-----	21	0,0093-0,204	0,0185-0,22	0,91	0,81-0,87	0,06 (<0,18)
HIS3	35	5-57	38	0,0093-0,185	0,0185-0,13	0,97	0,93-0,93	-0,00075 (<0,56)
CDC3	7	5-11	15	0,028-0,352	0,0185-0,204	0,90	0,63-0,78	0,199 (<0,003)

\* Índice de diversidad de Simpson

\*\*Heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada

**Tabla 9. Características resultantes de los microsatélites seleccionados para *C. parapsilosis***

Marcador	Nº de alelos	Nº de repetidos	Nº de genotipos	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	DP*	%heterocigosidad Ho-He**	$F_{IS}$ (valor p)
CP1	8	18-34	10	0,0088-0,412	0,0175-0,368	0,72	0,26-0,73	0,63 (<0,001)
CP4	20	28-67	19	0,0175-0,19	0,0175-0,191	0,92	0,07-0,911	0,92 (<0,001)
CP6	26	11-58	34	0,0088-0,149	0,0175-0,061	0,97	0,35-0,94	0,64 (<0,001)

\* Índice de diversidad de Simpson

\*\*Heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada

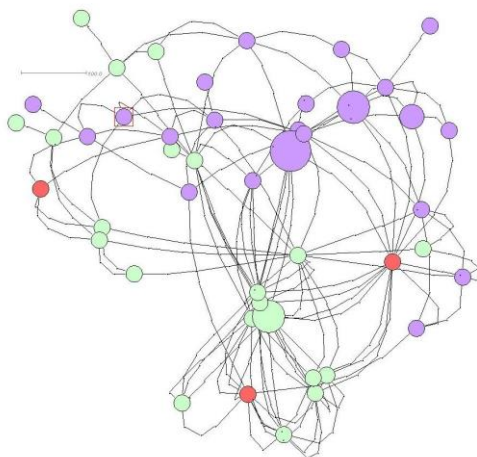
### 5.3.2. Estructura poblacional

El análisis mediante los programas Structure y Structure Harvester mostró que ambas especies están subdivididas en dos poblaciones.

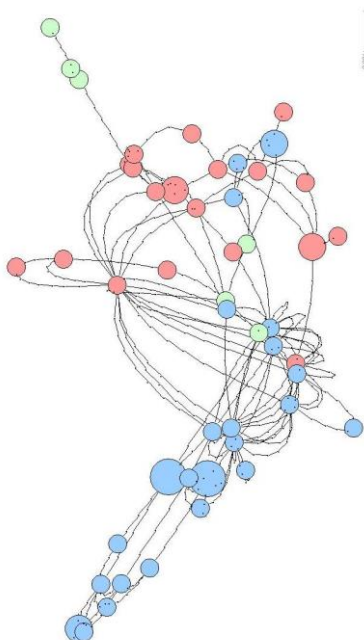
En los anexos IV y V se indica a que población pertenece cada aislamiento, con su valor de probabilidad de pertenencia a dicho grupo.

El resultado del análisis de AMOVA fue que tanto en *C. albicans* como en *C. parapsilosis*, sus dos subpoblaciones son distintas entre sí, con un valor  $p < 0,05$ .

En las figuras 4 y 5 se pueden observar los árboles construidos mediante el algoritmo de “mínimum spanning tree” para *C. albicans* y *C. parapsilosis*, donde se muestran en distinto color los aislamientos que pertenecen a cada subpoblación y los aislamientos intermedios.



**Fig. 4. Árbol de expansión mínima de aislamientos de *C. albicans* en base a alelos microsatélites.** Los círculos de color verde representan los aislamientos de la subpoblación 1, los círculos color lila representan los aislamientos de la subpoblación 2, y los de color rojo los aislamientos intermedios.



**Fig. 5. Árbol de expansión mínima de aislamientos de *C. parapsilosis* en base a alelos microsatélites.** Los círculos de color celeste representan los aislamientos de la subpoblación 1, los círculos de color rosado representan los aislamientos de la subpoblación 2, y los verdes los aislamientos intermedios

## 5.4. Análisis epidemiológicos

### 5.4.1. Aspectos epidemiológicos generales entre subpoblaciones de cada especie

En las tablas 10 y 11 se pueden observar las distintas variables epidemiológicas que se evaluaron para *C. albicans* y *C. parapsilosis*, respectivamente. Estas se compararon entre las subpoblaciones obtenidas al analizar la estructura poblacional.

Para *C. albicans*, ninguna de las variables procedencia, lugar de internación, material de origen, sexo, año de aislamiento y edad del paciente mostró diferencias significativas mediante la prueba de Chi cuadrado entre las dos subpoblaciones. Adicionalmente se graficó la distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de siete antifúngicos entre las dos subpoblaciones. En la tabla 10 se muestran únicamente aquellas que resultaron ser significativamente distintas por Chi cuadrado. Estas correspondieron a las CIMs de la 5-Fluorocitosina. En la figura 6 se muestran graficados los valores de CIM para este antifúngico.

Para *C. parapsilosis* se observó una mayor proporción de aislamientos de la subpoblación 2 que de la 1 aislados en la Asociación Española. La diferencia entre las dos subpoblaciones fue significativa con un valor p de 0,02. En cuanto a la susceptibilidad antifúngica, se encontró un mayor número de aislamientos con una CIM de 2 para la anidulafungina en el grupo 1, con un valor p de 0,02 (Tabla 11, Fig. 7).

**Tabla 10. Variables epidemiológicas analizadas entre las subpoblaciones de *C. albicans***

		Subpoblación 1	Subpoblación 2		
Variable		N	N	Chi <sup>2</sup>	Valor p
Procedencia	Hospital Maciel	4	8	0,37	0,55
	Hospital Pereira Rossell	1	4	0,51	0,48
	Asociación Española	7	10	0,16	0,70
	Casmu	7	4	1,11	0,29
	Mucam	4	2	0,48	0,49
Lugar de internación	CTI	16	15	1,03	0,31
Material de origen	Catéter	3	5	0,01	0,93
	Hemocultivo	13	18	0,32	0,57
	Líquido peritoneal	6	4	0,49	0,48
Sexo	Hombres	10	15	1,0	0,32
	Mujeres	11	9	1,0	0,32
Año de aislamiento	2010	1	2	0,10	0,75
	2011	10	12	0	0,96
	2012	12	10	1,39	0,24
	2013	0	3		
Edad	Niños	3	3	0,15	0,70
CIM 5-Fluorocitosina (µg/ml)	0,12	14	25	5,67	0,02*

\* Diferencia significativa por Chi cuadrado

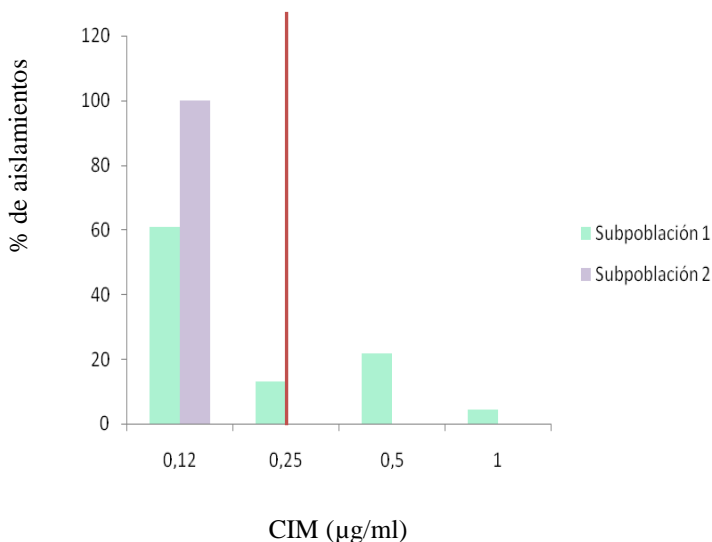
Grados de libertad: 1

**Tabla 11. Variables epidemiológicas analizadas entre las subpoblaciones de *C. parapsilosis***

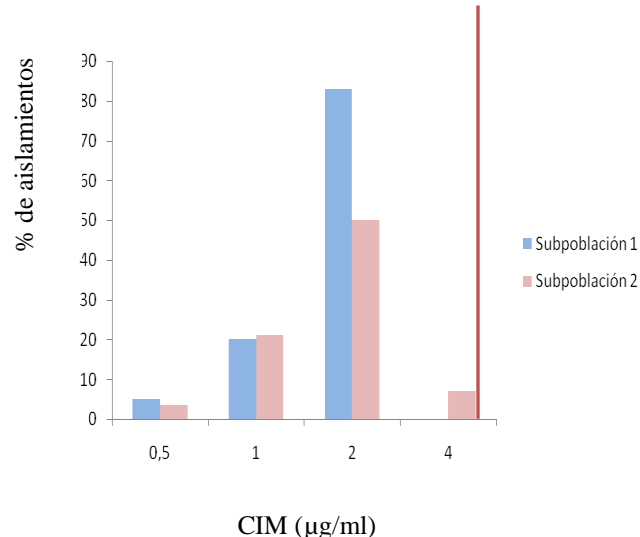
		Subpoblación 1	Subpoblación 2		
	Variable	N	N	Chi <sup>2</sup>	Valor p
Procedencia	Asociación Española	5	10	5,70	0,017*
	Casmu	2	2	0,02	0,88
	Hospital Evangélico	1	0		
	Hospital de Florida	2	1	0,10	0,75
	Hospital Maciel	8	7	0,26	0,61
	Hospital Pasteur	2	0		
	Hospital de Paysandú	1	0		
	Hospital Pereira Rossell	4	1	0,29	0,59
	Hospital de Salto	1	0		
	Mucam	4	0		
Lugar de internación	CTI	13	11	0,41	0,52
Material de origen	Catéter	7	2	0,81	0,37
	Hemocultivo	22	16	0,05	0,82
	Líquido peritoneal	0	2		
	Tejido óseo	1	1	0,22	0,64
Sexo	Hombres	18	14	0,23	0,63
	Mujeres	11	7	0,06	0,80
	2008	0	1		
	2009	3	2	0,18	0,68
Año de aislamiento	2010	6	6	0,50	0,48
	2011	13	5	2,06	0,15
	2012	8	7	0,26	0,61
Edad	Niños	7	1	1,97	0,16
CIM Anidulafungina (µg/ml)	2	24	10	5,04	0,02*

\*Diferencia significativa por Chi cuadrado.

Grados de libertad: 1



**Fig. 6.** Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima de 5-Fluorocitosina de los aislamientos de *C. albicans*. La línea roja indica el punto de corte epidemiológico para este antifúngico.



**Fig. 7.** Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima de Anidulafungina de los aislamientos de *C. parapsilosis*. La línea roja indica el punto de corte epidemiológico para este antifúngico.

#### 5.4.2. Casos agrupados por genotipo

Los aislamientos que poseen los mismos alelos para todos sus marcadores constituyen casos agrupados y posibles brotes desde el punto de vista epidemiológico.

En las figuras 4 y 5 se observan los casos agrupados como círculos más grandes, representados en un árbol de expansión mínima. En estos árboles cada círculo representa un genotipo diferente, y el tamaño de estos es proporcional al número de aislamientos con dicho genotipo.

Para verificar la existencia de un brote, los aislamientos agrupados deben además compartir algún nexo epidemiológico como ser tiempo, lugar y persona.

#### *C. albicans*

Para esta especie se encontraron cuatro casos agrupados. En la tabla 12 se observa la información epidemiológica de estos aislamientos, y en la tabla 13 su genotipo.

Los aislamientos del caso agrupado N° 4 pertenecen al mismo paciente. Estos fueron obtenidos con 14 días de diferencia, en el Hospital Pereira Rossell (Tabla 12). En los restantes casos agrupados no se encontró un vínculo epidemiológico claro que permita suponer la existencia de algún brote (Tabla 12).

En los casos agrupados N° 2 y 3 existiría como único vínculo epidemiológico compartir

la misma procedencia en parte de los aislamientos.

**Tabla 12. Información epidemiológica de los casos agrupados de *C. albicans***

Caso agrupado	N° aislamiento	Procedencia	Lugar de internación	Material de origen	Fecha	Edad	Sexo
1	1011005	Médica Uruguaya	CTI	Hemocultivo	27/09/2012	59	M
	1026017	Casmu	CTI	Catéter	15/10/2011	77	F
	1125010	Asociación Española	Transplante	Hemocultivo	18/11/2011	58	F
2	627011	Asociación Española	CTI	Líquido peritoneal	22/06/2011	62	M
	329026	Hospital Pereira Rossell	CTI	Hemocultivo	23/03/2011	2	F
	524025	Hospital Maciel	Sala	Líquido peritoneal	16/05/2012	22	M
	610021	Hospital Maciel	CTI	Líquido biliar	06/06/2011	80	M
3	123004	Asociación Española	CTI	Hemocultivo	15/01/2013	84	M
	1031013	Asociación Española	Cirugía	Líquido peritoneal	25/10/2012	74	M
	1117031	Casmu	Sala	Hemocultivo	27/10/2011	74	F
4	1021009 <sup>a</sup>	Hospital Pereira Rossell	CTI	Hemocultivo	11/09/2011		M
	908056 <sup>a</sup>	Hospital Pereira Rossell	CTI	Hemocultivo	28/08/2011		M

El superíndice indica cuando los aislamientos pertenecen al mismo paciente

**Tabla 13. Genotipos de los casos agrupados de *C. albicans***

EF3	HIS3	CDC3	Cantidad de aislamientos	Frecuencia genotípica	N° de aislamientos
127/136	161/201	119/127	3	0,056	1011005, 1026017, 1125010
131/137	149/161	115/119	4	0,074	627011, 329026, 524025, 610021
131/137	153/165	115/119	3	0,056	123004, 1031013, 1117031
137/139	165/245	119/119	2	0,037	1021009, 908056

Los restantes 42 genotipos son únicos y su frecuencia es de 0,0185

### ***C. parapsilosis***

Los casos agrupados encontrados para esta especie fueron seis. En las tablas 14 y 15 se muestra la información epidemiológica de estos aislamientos y su genotipo respectivamente.



En los casos agrupado 5 y 7 los aislamientos fueron procedentes del mismo paciente, compartiendo algunas variables epidemiológicas analizadas.

En el caso agrupado N° 8 dos aislamientos pertenecen al mismo paciente, y los tres comparten su procedencia, lugar de internación y fecha cercana de aislamiento.

En el caso agrupado N° 9, dos aislamientos eran procedentes del mismo centro, y fueron aislados con 9 meses de diferencia. No comparten ningún elemento epidemiológico con el tercer aislamiento.

En el caso N° 10, los aislamientos provienen del mismo centro de procedencia y lugar de internación, aislados en un período de ocho meses.

En el caso agrupado N° 6 los aislamientos no comparten ningún elemento epidemiológico.

**Tabla 14. Información epidemiológica de los casos agrupados de *C. parapsilosis***

Caso agrupado	N° aislamiento	Procedencia	Lugar de internación	Material de origen	Fecha	Edad	Sexo
5	325003 <sup>b</sup>	Hospital Maciel	CTI	Hemocultivo	03/2010	29	M
	330001 <sup>b</sup>	Hospital Maciel	CTI	Líquido peritoneal	03/2010	29	M
6	108009	Hospital de Florida	Sala	Hemocultivo	08/2009	62	M
	701050	Médica Uruguaya	Hematología	Catéter	06/06/2011	18	M
7	1012039 <sup>c</sup>	Hospital Maciel	Neurocirugía	Hemocultivo	20/09/2010	17	F
	1012060 <sup>c</sup>	Hospital Maciel	Neurocirugía	Hemocultivo	27/09/2010	17	F
8	706031 <sup>d</sup>	Hospital Pereira Rossell	CTI	Hemocultivo	21/06/2011	0,3	
	902027 <sup>d</sup>	Hospital Pereira Rossell	CTI	Hemocultivo	14/07/2011	0,3	
	902028	Hospital Pereira Rossell	CTI	Hemocultivo	20/07/2011		
9	211032	Asociación Española	Sala	Hemocultivo	06/02/2011	80	M
	1125009	Asociación Española	Sala	Hemocultivo	21/11/2011	57	M
	426009	Médica Uruguaya	Hematología	Hemocultivo	26/03/2012	64	F
10	223024	Asociación Española	CTI	Hemocultivo	17/02/2011	70	M
	1020004	Asociación Española	CTI	Hemocultivo	12/10/2010	68	M

El superíndice indica cuando los aislamientos pertenecen al mismo paciente

**Tabla 15. Genotipos de los casos agrupados de *C. parapsilosis***

CP1	CP4	CP6	Cantidad de aislamientos	Frecuencia genotípica	Nº de aislamientos
23/29	51/51	44/52	2	0,035	325003, 330001
27/27	45/45	40/40	2	0,035	108009, 701050
27/27	61/61	51/51	2	0,035	1012039, 1012060
28/28	45/45	42/42	3	0,051	706031, 902027, 902028
28/28	46/46	41/41	3	0,051	211032, 1125009, 426009
29/29	34/40	34/34	2	0,035	223024, 1020004

Los restantes 43 genotipos son únicos y su frecuencia es de 0,0175

### 5.5. Análisis de aislamientos *C. albicans* mediante MLST

Los aislamientos seleccionados para analizar por MLST se muestran en la tabla 16. Estos comparten cantidades variables de alelos microsátélites, de modo de abarcar la mayor diversidad posible en la muestra.

**Tabla 16. Distribución de los seis alelos microsátélites de cada aislamiento de *C. albicans* seleccionado para el análisis mediante MLST**

Aislamiento/Alelo	115	119	123	131	132	136	137	139	149	152	153	161	165	285	289	339
304010	2			1			1		1			1				
524025	1	1		1			1		1			1				
511042			2		1	1								1	1	
610021	1	1		1			1		1			1				
204030			1	1				1		1	1		1			
123004	1	1		1			1				1		1			
1031013	1	1		1			1				1		1			
912006			2	2											1	1

Como producto de la secuenciación de los marcadores MSLT se obtuvieron siete secuencias por aislamiento. En la tabla 17 se encuentran detallados los alelos asignados a estas secuencias y los DSTs resultantes de la combinación de alelos para cada aislamiento.

**Tabla 17. Alelos y DSTs obtenidos para los aislamientos de *C. albicans* analizados mediante MLST.**

N° Aislamiento	AAT1A	ACC1	ADP1	MPIB	SYA1	VPS13	ZWF1B	DST
304010	62	3	3	3	3	48	95	1299
524025	62	3	3	3	3	39	95	918
511042	33	14	38	2	78	122	15	666
610021	62	3	3	3	3	39	15	Nuevo
204030	13	28	15	6	127	37	15	Nuevo
123004	62	3	3(99%)	3	67(99%)	115	95	Nuevo
1031013	62	3	3	3	26	39	95	Nuevo
912006	33	7	6	2	106	93	15	1658

■ Alelos que no fueron encontrados en otros aislamientos de la región

Como se observa en la tabla 17, los marcadores más polimórficos resultaron ser SYA1 y VPS13, con seis alelos cada uno y el menos polimórfico ZWF1B, con dos alelos.

Dos de los alelos que se encontraron fueron nuevos para la base de datos, uno de ellos perteneciente al gen ADP1 y otro al gen SYA1. Para estos alelos se muestra un porcentaje de similitud con el alelo más parecido en la base.

Se encontraron cuatro DSTs que ya estaban registrados en la base de datos de MLST y cuatro nuevos.

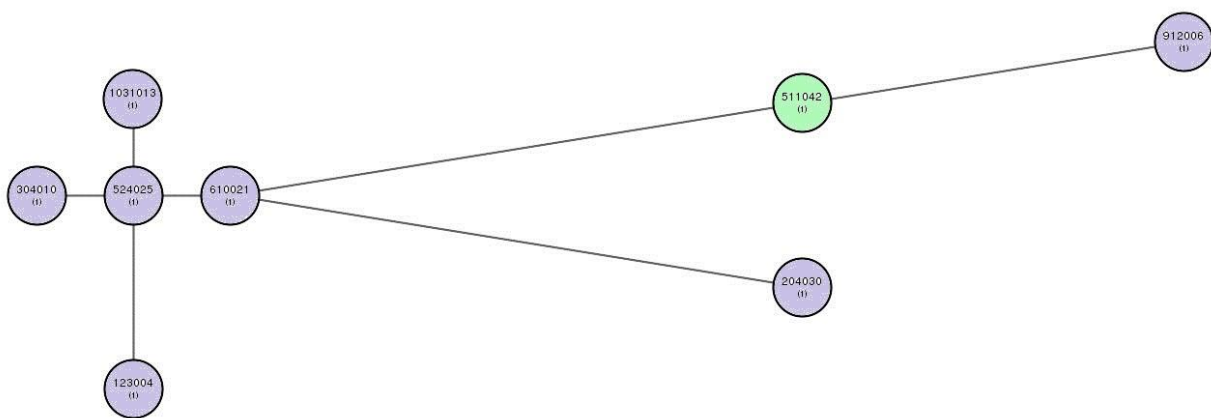
De los DSTs conocidos, todos se encontraron fuera de la región. El N° 1299 fue encontrado previamente en un aislamiento de Noruega, el N° 918 fue encontrado en tres aislamientos de Francia, dos de Estados Unidos, cinco de Australia, uno de Guyana Francesa, y dos de Irlanda. El DST N° 666 pertenece a un aislamiento procedente de México, y el DST N° 1658 a un aislamiento de Irlanda.

En la base de datos se encontraron aislamientos regionales, procedentes de Argentina (4), Brasil (80) y Chile (4). Ninguno de los DST encontrados en Uruguay coincidió con

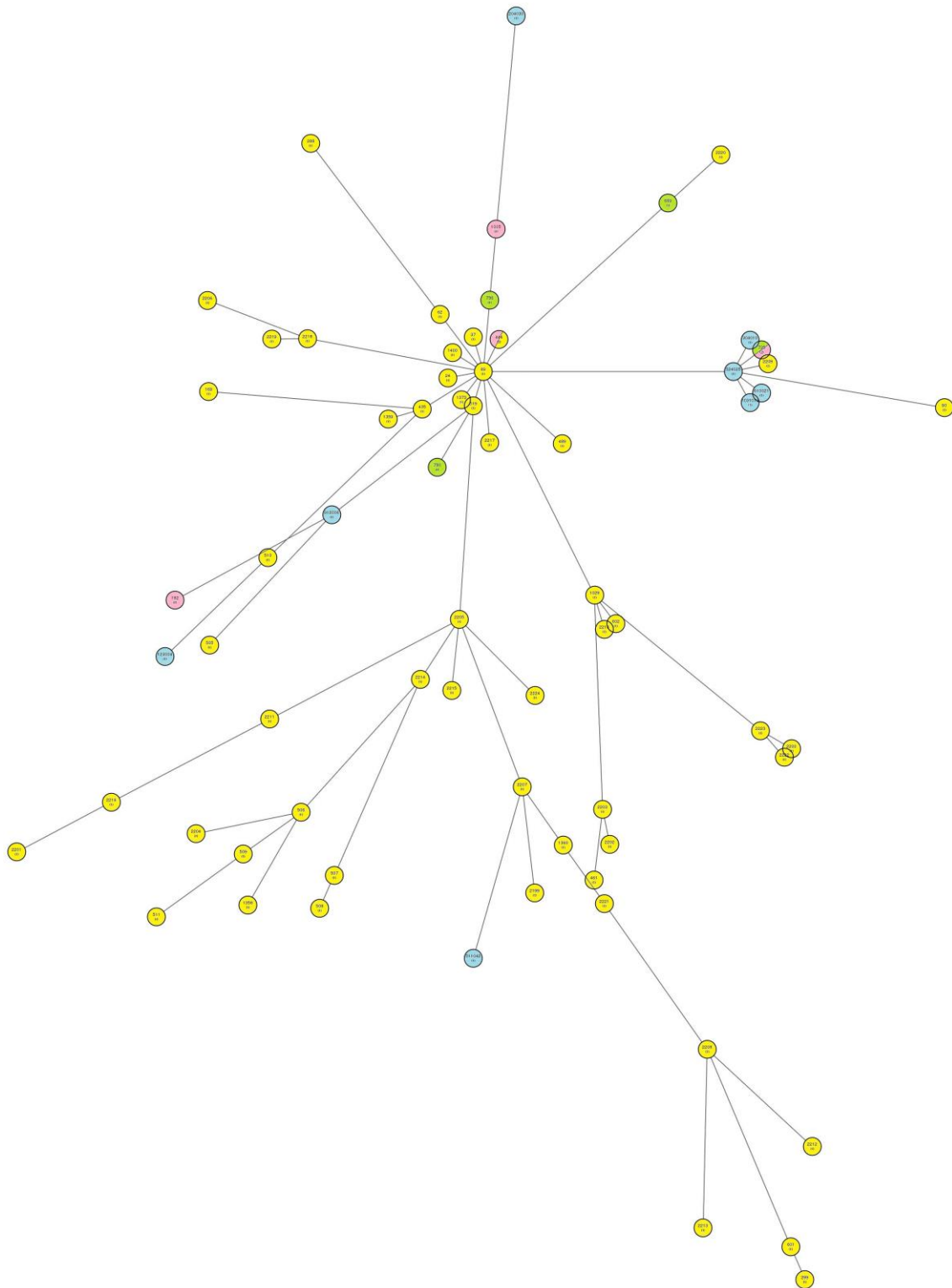
los descriptos para estos países. Adicionalmente, hubo alelos encontrados en Uruguay que tampoco se encontraron en estos países (tabla 17)

En la figura 8 se muestra un árbol de expansión mínima construido a partir de los alelos MLST para los ocho aislamientos de Uruguay.

En la figura 9 se muestra el árbol de expansión mínima de los ocho aislamientos de Uruguay junto a los aislamientos de Argentina, Brasil y Chile.



**Fig. 8.** Árbol de expansión mínima de los aislamientos de *C. albicans* de Uruguay construido en el sitio pubmlst.org, en base a los alelos de MLST. Los círculos color lila corresponden a la subpoblación 2 definida por microsatélites. Los círculos de color verde corresponden a la subpoblación 1 definida por alelos microsatélites



**Fig. 9.** Árbol de expansión mínima de aislamientos de *C. albicans* de Argentina (verde), Brasil (amarillo), Chile (rosado), y Uruguay (celeste), construido en el sitio pubmlst.org, en base a alelos de MLST (tomados de mlst.net).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Características epidemiológicas generales de ambas especies

El análisis de las edades de los pacientes muestra que la mediana de edad de aquellos infectados por *C. albicans* es mayor que la de los pacientes infectados por *C. parapsilosis*. Los percentiles 25 y 75 muestran que la distribución de edades en ambas especies mantiene esa misma tendencia. Es decir, que la infección por *C. albicans* ocurriría a edades mayores que la infección por *C. parapsilosis*. De acuerdo con la literatura, *C. albicans* se distribuye uniformemente en todos los rangos de edad. La infección por *C. parapsilosis* en el hemisferio norte predomina en neonatos y jóvenes, mientras que en Latinoamérica también se distribuye uniformemente en un rango amplio de edades (Pfaller & Diekema, 2010; Nucci et al., 2010). En este sentido, nuestro país se ubicaría en un punto intermedio, donde la infección por *C. parapsilosis* ocurre con mayor frecuencia en edades menores que las infecciones por *C. albicans*.

De los pacientes internados en CTI, se observó una mayor proporción estadísticamente significativa de aislamientos de *C. albicans* que de *C. parapsilosis*. Esto puede relacionarse con la mayor mortalidad asociada a *C. albicans* respecto a *C. parapsilosis* como se ve en la literatura y en los datos de nuestro país. Algunos autores relacionan esta mayor mortalidad con la mayor capacidad patogénica de *C. albicans*, otorgada por sus numerosos factores de virulencia. (McCullough et al., 1996; Calderone & Fonzi, 2001; Sardi et al., 2013).

En función del origen de los aislamientos, la única diferencia significativa fue la procedencia de líquido peritoneal. La proporción de aislamientos con este origen fue mayor en *C. albicans* que en *C. parapsilosis*. *C. albicans* forma parte de la flora normal del tubo digestivo, por lo que es esperable encontrar esta especie en el líquido peritoneal. Si bien *C. parapsilosis* se asocia más a catéteres, esto no se vio reflejado estadísticamente en nuestra población.

## **6.2. Caracterización de los aislamientos mediante microsatélites**

### **6.2.1 Validación de la técnica**

La visualización de las bandas en los geles de acrilamida resultó ser una técnica válida, de bajo costo para estudiar aislamientos mediante marcadores microsatélites.

El mayor problema a la hora de analizar las bandas resultó ser el “stuttering” encontrado en *C. parapsilosis*. La causa es multifactorial e inherente a la técnica de microsatélites, por lo que este problema no se solucionó cambiando el método de extracción de ADN, ni variando las condiciones de PCR. Como metodología de ajuste se estableció un criterio, que consistió en seleccionar la banda de mayor intensidad, o dos en el caso de los aislamientos heterocigotas. Adicionalmente, en los productos de PCR que se enviaron a secuenciar se obtuvieron los mismos tamaños que mediante el gel, lo que indica que los alelos fueron ajustados correctamente.

La ocurrencia de este fenómeno en *C. parapsilosis* y no en *C. albicans* posiblemente se deba a que el tamaño del motivo repetido de los marcadores microsatélites en *C. parapsilosis* es menor. El tamaño del motivo repetido es uno de los factores que influye en el stuttering. Se ha descrito que en los fragmentos de ADN de secuencia repetitiva el error de la polimerasa disminuye cuando aumenta el tamaño del motivo repetido (Ellegren, 2004).

### **6.2.2. Elección de marcadores microsatélites**

#### **6.2.2.1. Marcadores microsatélites de *C. albicans***

El conjunto de cinco marcadores descritos por Sampaio (Sampaio et al., 2003 y Sampaio et al., 2005) fue descartado por presentar problemas en cuanto a su poder de discriminación en conjunto. Dos de los marcadores tienen un poder de discriminación bajo. De los restantes, uno es un marcador compuesto, por lo que agrega un problema de homoplasia al análisis, y el poder de discriminación de los dos marcadores restantes no es suficiente. Este nuevo conjunto de marcadores no ofrece mayores ventajas frente a los tres marcadores seleccionados en este trabajo (Bretagne, 1997; Botterel et al., 2001).

Los tres marcadores seleccionados (EF3, CDC3 y HIS3) teóricamente aportan un poder de discriminación global de 0,97, aún sin poder inferir el número exacto de repetidos del marcador complejo EF3. Este marcador complejo consta de dos motivos repetidos, por

lo que el tamaño final del producto puede corresponder a un número variable de estos motivos. Si se conociera la secuencia exacta se lograría una discriminación aún mayor, aunque con la técnica de geles no es posible. A pesar de esto, EF3 fue el primer marcador microsatélite descrito para *C. albicans* y su uso continúa, mostrando su robustez. Adicionalmente, existen trabajos publicados que utilizan exitosamente el conjunto de los tres marcadores (Eloy et al., 2006; Gago et al., 2007; Shi et al., 2007; García-Hermoso et al., 2007; Paulitsch-Fuchs et al., 2012).

El poder de discriminación obtenido en este trabajo fue de 0,99, superando el descrito de 0,97. En este último caso el menor poder de discriminación obtenido podría deberse a que el estudio se basó en muestras independientes, obtenidas solo en dos hospitales (Botterel et al., 2001).

En los resultados se encontraron nuevos alelos para los tres marcadores, no descritos en la literatura (Bretagne, 1997; Botterel et al., 2001; Eloy et al., 2006; de Souza Bonfim-Mendoza et al., 2007; Gago et al., 2007; Shi et al., 2007; Adachi et al., 2009; Shimizu et al., 2011; Paulitsch-Fuchs et al., 2012; L'Ollivier et al., 2012). Se encontraron dos nuevos alelos para el marcador CDC3, seis para EF3 y 16 para HIS3 (Anexo IV)

#### **6.2.2.2. Marcadores microsatélites de *C. parapsilosis***

Se seleccionaron tres de los cuatro marcadores descritos por Sabino et al. (2010) por su mayor poder de discriminación respecto al conjunto de seis marcadores descritos por Lasker et al. (2006).

El conjunto de seis marcadores descrito por Diab-Elschahawi et al. (2012) no ofrece información en cuanto a su poder de discriminación. De los seis marcadores, tres son los mismos descritos originalmente por Sabino et al. (2010). Estos varían en el diseño de los cebadores, sin que ello resulte en amplificaciones más eficaces. Los tres marcadores nuevos no mejorarían sustancialmente el poder de discriminación de 0,99 ya descrito.

El poder de discriminación obtenido con nuestros resultados de tres marcadores (CP1, CP4 y CP6) alcanza 0,99, igualando el descrito por Sabino et al. (2010) para sus cuatro marcadores.

En los resultados se encontraron 4 nuevos alelos para el marcador CP1, 12 para CP4 y 9



para CP6 (Anexo V) (Sabino et al., 2010; Vaz et al., 2011; Pulcrano et al., 2012; Romeo et al., 2012).

### **6.3. Análisis poblacional**

#### **6.3.1. Características generales de las poblaciones**

En ambas especies la distribución de las frecuencias genotípicas observadas para cada marcador fue significativamente distinta a la esperada por el equilibrio Hardy-Weinberg. Esta observación apoya la idea ya conocida de que ambas especies tienen un modo de reproducción clonal (Tavanti et al., 2005; Polulain, 2013).

La diversidad genotípica encontrada en *C. albicans* fue alta, con una relación genotipos/aislamientos de 0,85. En estudios anteriores esta relación fue menor, variando entre 0,60 y 0,80. (Botterel et al., 2001; Amouri et al., 2012; Escribano et al., 2013).

Por otra parte, la diversidad genotípica encontrada en *C. parapsilosis* fue alta, y similar a la encontrada por Sabino et al. (2010). En su análisis se encontró una relación genotipos/aislamientos de 0,81 siendo estos independientes tanto geográfica como temporalmente. La relación encontrada en Uruguay fue de 0,86.

Vemos entonces que existe una diversidad genotípica inherente a ambas especies, independiente de su origen geográfico y de su modo de reproducción clonal.

La diferencia entre la heterocigosidad observada y esperada para el conjunto de tres marcadores de *C. albicans* resultó estadísticamente significativa, fundamentalmente debido a la diferencia encontrada en el marcador CDC3. Esta diferencia en el conjunto refleja un leve déficit de heterocigosidad, respecto a una población en equilibrio H-W. Vemos entonces que la heterocigosidad de *C. albicans* se explicaría por la recombinación a través del locus MAT, u otros mecanismos de recombinación, a pesar de su reproducción clonal.

En *C. parapsilosis* la heterocigosidad observada fue notoriamente menor a la esperada en los tres marcadores y en el conjunto, y la diferencia resultó ser estadísticamente significativa. Esto reflejaría nuevamente el modo clonal de reproducción de *C. parapsilosis* y en este sentido no se evidenciarían mecanismos de recombinación como en *C. albicans*.

### **6.3.2. Estructura poblacional**

Según el análisis de la estructura poblacional con el programa Structure, ambas especies se dividen en dos subpoblaciones, estadísticamente distintas entre sí como lo muestra el análisis de AMOVA realizado.

Este agrupamiento probabilístico se vio reflejado en el agrupamiento espacial por distancias genéticas, y en las conexiones entre aislamientos como se puede observar en los árboles de expansión mínima (Figs. 4 y 5).

La subdivisión encontrada en ambas especies podría deberse a la existencia de subpoblaciones de cepas autóctonas e introducidas, las que se conservarían diferentes en el tiempo por no existir reproducción sexual en ninguna de las dos especies. Para probar esta hipótesis sería necesario ampliar este análisis estructural con cepas de otras procedencias geográficas.

Si bien no existen antecedentes de esta herramienta aplicada a poblaciones de levaduras patógenas humanas, sí fue utilizada para el análisis de poblaciones de levaduras ambientales de aplicación biotecnológica (Antonangelo et al., 2013; Legras et al., 2014).

Al igual que sucede con otras levaduras, en *C. albicans* y *C. parapsilosis* podrían ocurrir adaptaciones a distintos ambientes que expliquen la estructura encontrada. Como corolario de esta idea se podrían realizar muestreos de los reservorios ambientales y animales de *C. albicans* y *C. parapsilosis* para ver su estructura más allá de su análisis como agentes patógenos humanos.

## **6.4. Análisis epidemiológicos**

### **6.4.1. Subpoblaciones**

El algoritmo de análisis del programa Structure permitió definir claramente dos subpoblaciones en cada una de las especies. Como se ve en las tablas 10 y 11 no se encontraron variables de tiempo, lugar y persona que se asocien a esta estructura poblacional con un valor estadísticamente significativo.

Entre las subpoblaciones de *C. albicans*, la única variable biológica que resultó significativa fue la distribución de valores de CIM para la 5-Fluorocitosina (Tabla 10). Se observa que la subpoblación 1 es más diversa, con una distribución que abarca un rango de valores de CIM por debajo y por arriba del punto de corte epidemiológico,

mientras que la distribución en la subpoblación 2 es unimodal, donde todos los aislamientos tienen el mismo valor de CIM, por debajo del punto de corte epidemiológico.

En el clado 1 descrito en la literatura para *C. albicans*, el 73% de los aislamientos poseen naturalmente susceptibilidad reducida a la 5-Fluorocitosina. Por el contrario, en los clados restantes solo el 2% de los aislamientos muestran dicho comportamiento. Esta susceptibilidad reducida se debe a un único cambio nucleotídico de citosina a timidina en el gen Uracilo fosforibosiltransferasa (FUR1) (Dodgson, A. R., et al., 2004). Observamos que en nuestra subpoblación 1, determinada con el algoritmo de Structure, hay aislamientos con un comportamiento similar a los del clado 1.

Las diferencias significativas en la CIM de la anidulafungina entre las subpoblaciones de *C. parapsilosis* (Tabla 11) podrían explicarse por el escaso tamaño muestral ya que los gráficos de distribución de CIM tienen una estructura similar (Fig. 7).

En *C. parapsilosis* hay una subpoblación estadísticamente sobrerrepresentada en un centro asistencial (Tabla 11). Esto podría reflejar la existencia de un genotipo endémico en ese centro, como se ha observado que ocurre en *C. albicans* (Escribano et al., 2013).

#### **6.4.2. Casos agrupados**

En *C. albicans* hubo cuatro genotipos que fueron compartidos por más de un aislamiento (Tabla 12). En tres de estos no se evidenció un elemento epidemiológico (tiempo, lugar, persona) que relacione a todos los aislamientos, por lo que ninguno de estos casos conformaría un brote. Respecto al cuarto genotipo, no podemos decir que se trate de un brote ya que los aislamientos que lo comparten pertenecen al mismo paciente, y fueron aislados en fechas cercanas. Para esta especie las descripciones en la literatura indican que los brotes son un evento raro, lo que iría en concordancia con nuestros resultados (Shin, et al., 2011).

El hecho de encontrar aislamientos con idéntico genotipo en lugares diferentes podría tener distintas causas. Podría tratarse de aislamientos con distinto origen que hayan evolucionado al mismo genotipo (homoplasia), o de genotipos distintos, que la técnica no alcanza a diferenciar. Como se mencionó anteriormente, el marcador EF3 es complejo y podría tener diferentes combinaciones de sus motivos repetidos con el mismo tamaño de fragmento (homoplasia molecular). En este caso sería necesario

verificar la secuencia de este marcador.

En *C. parapsilosis*, dos de los seis genotipos idénticos correspondieron a aislamientos persistentes en el tiempo de los mismos pacientes (casos agrupados N° 5 y 7), por lo que en estos casos no podríamos hablar de brotes. En el caso agrupado N°6 no hay ningún elemento epidemiológico que permita plantear la existencia de un brote. Los posibles brotes serían los casos agrupados N° 8 y 10, y dos aislamientos del caso agrupado N° 9 (211032 y 1125009). En estos tres casos se observa la persistencia de los genotipos en el mismo lugar de internación a lo largo del tiempo (tabla 14), reflejando una posible transmisión intrahospitalaria, como se ha descrito ampliamente para esta especie (Cantón et al., 2001; van Asbeck et al., 2007; Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009). De acuerdo con Escribano et al., 2013 cuando se encuentran aislamientos genéticamente indistinguibles, pero sin vínculo epidemiológico claro, se plantean tres posibilidades. Una es que se trate de aislamientos diferentes que la técnica no alcanza a diferenciar. Otra posibilidad es que exista una transferencia interhospitalaria de cepas, encontrando así un mismo genotipo en diferente ubicación geográfica. Por último se podría plantear la existencia de clones más exitosos como colonizadores de ambientes hospitalarios (genotipos endémicos), y por esto son encontrados con mayor frecuencia.

Si aplicáramos esto a nuestros casos agrupados sin nexo epidemiológico, tendríamos una transmisión interhospitalaria de cepas, que representan el 18% de los aislamientos en *C. albicans* y el 5% de los aislamientos de *C. parapsilosis*.

## **6.5. Análisis de aislamientos de *C. albicans* mediante MLST**

La base de datos global de MLST utilizada para este análisis se sustenta en la información genética de los aislamientos brindada por sus usuarios. Los trabajos de MLST en *C. albicans* en nuestra región son escasos, quedando reflejado en una subrepresentación de aislamientos regionales (Da Matta et al., 2010, Lyon et al., 2010; Spampinato & Leonardi, 2013). Posiblemente, los cuatro nuevos DSTs en Uruguay en una muestra de solo ocho aislamientos sean producto de un sesgo causado por la escasa diversidad genética representada en la base de datos para la región.

En la figura 9, se puede observar que el árbol de expansión mínima con todos los aislamientos regionales registrados en el sitio mlst.net es disperso, y ocurren escasos

agrupamientos. En uno de estos agrupamientos se observa la mitad de nuestros ocho aislamientos. Estos pertenecen a la subpoblación 2 definida por el algoritmo de Structure para microsatélites. Algunos DSTs de este agrupamiento regional son compartidos con cepas de origen europeo. Una vez más vemos que los flujos migratorios podrían estar implicados en la distribución y agrupamiento de las cepas.

Para comprender mejor la dinámica poblacional de *C. albicans* en la región, la base de datos debería incorporar un mayor número de aislamientos.

## **6.6. Comparación de las técnicas de marcadores microsatélites y MLST**

El hecho de que los aislamientos que fueron diferentes por microsatélites también lo hayan sido por MLST muestra que esta última sería, al menos, tan potente como los microsatélites. Sin embargo, dos pares de aislamientos con idéntico genotipo por microsatélites resultaron tener genotipo diferente por MLST. En uno de los casos, donde la diferencia ocurrió solo en el marcador ZWF1B podríamos pensar que se trata de un genotipo endémico, persistente en el ambiente hospitalario, en el que se produjo microevolución (Hoarau et al., 2014). En el caso de los aislamientos donde la diferencia estuvo en tres de los siete marcadores (ADP1, SYA1 y VPS13) es difícil sospechar el fenómeno de microevolución. En este caso se trataría en realidad de una falta de poder de discriminación de los microsatélites debido, entre otras posibilidades a la homoplasia del marcador EF3.

Ambas técnicas se consideran igual de potentes para la diferenciación de aislamientos y su aplicabilidad depende del objetivo buscado (García Hermoso et al., 2007; Spampinato & Leonardi, 2010). En nuestros resultados ambas técnicas fueron convergentes, por lo que parecería razonable el uso complementario del MLST en los casos de genotipos agrupados por microsatélites.

## 7. CONCLUSIONES

- Con los tres marcadores de *C. parapsilosis* se alcanzó un buen poder de discriminación. En *C. albicans* la homoplasia del marcador EF3 generó una falta de sensibilidad en la herramienta. En los casos seleccionados de genotipos de *C. albicans* agrupados por marcadores microsatélites, el MLST permitió desagregar esos genotipos.
- Ambas especies mostraron una gran diversidad genotípica. En *C. parapsilosis* se encontró un importante déficit de heterocigotas, mientras que en de *C. albicans* este déficit fue discreto, probablemente debido a su reproducción parasexual.
- En ambas especies se definieron dos subpoblaciones estadísticamente distintas, mediante la utilización por primera vez en estas especies del algoritmo de análisis del programa Structure.
- En *C. albicans* no se encontraron brotes hospitalarios. En *C. parapsilosis* se evidenciaron brotes debido a una posible transmisión hospitalaria por persistencia de cepas en el lugar de internación a lo largo del tiempo.
- El análisis mediante marcadores microsatélites en geles de acrilamida resultó ser una técnica válida y reproducible para el estudio de estas especies fúngicas. Esta técnica sería fácilmente aplicable al contexto regional por sus ventajas comparativas en términos de costos. Por esto, proponemos como metodología de trabajo el análisis mediante gel de acrilamida de los microsatélites EF3, CDC3 y HIS3 para *C. albicans* y los microsatélites CP1, CP4 y CP6 para *C. parapsilosis*. La secuenciación del microsatélite EF3 resultaría necesaria para los casos agrupados de *C. albicans* sin vínculo epidemiológico entre ellos.
- El presente trabajo constituye la primera descripción poblacional de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en Uruguay, y la primera de *C. parapsilosis* en la región. También constituye la primera aplicación de marcadores microsatélites en ambas especies para el análisis epidemiológico en un contexto de vigilancia de infecciones fúngicas invasoras.

## 8. PERSPECTIVAS

- Analizar todos los casos agrupados de *C. albicans* encontrados mediante la secuenciación del microsatélite EF3.
- Profundizar el análisis de los vínculos entre los aislamientos, representados en el árbol de expansión mínima, y agrupados por el algoritmo Structure. Evidenciar casos de microevolución y transmisión interhospitalaria.
- Para ambas especies, agregar aislamientos de otros países al análisis de la estructura poblacional. Observar si se mantienen las subpoblaciones encontradas en Uruguay.
- Aumentar el tamaño de la muestra en Uruguay para poder comparar todas las variables epidemiológicas entre subpoblaciones.
- Estandarizar la técnica de microsatélites a través de la construcción de una escalera de alelos de tamaño conocido para cada marcador y utilizarla como estándar de peso molecular en los geles de acrilamida. De esta manera, se podría intercambiar información entre laboratorios, y así contribuir al fortalecimiento de las redes regionales de vigilancia.
- Cargar en la base de datos de MLST los alelos y DSTs encontrados para los aislamientos de Uruguay.
- Aplicar la metodología propuesta al análisis de futuros casos agrupados y a la vigilancia sistemática realizada en la Red de Infecciones Fúngicas Invasoras de Uruguay.

## 9. REFERENCIAS

- Adachi, H., Shimizu, K., Hattori, H., Tanaka, R., Chibana, H., Takagi, Y., Tomita, Y., Kanbe, T.** (2009) Genotyping of *Candida albicans* by fragment analysis of microsatellites combined with 25S rDNA and RPS-based strategies. *Japanese Journal of Medical Mycology* 50: 167-174.
- Amouri, I., Sellami, H., Abbes, S., Hadrich, I., Mahfoudh, N., Makni, H., Ayadi, A.** (2012) Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal of Medical Microbiology* 61:1091-1096.
- Antonangelo A. T., Alonso D. P., Ribolla, P. E. M., Colombi, D.** (2013) Microsatellite marker-based assessment of the biodiversity of native bioethanol yeast strains. *Yeast* 30: 307-317.
- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., EUCAST-AFST** (2012) EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection* 18(7): E246-247.
- Ashford, B.** (1928). Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 8: 507–538.
- Benbouza, H., Jacquemin, J-M., Baudoin, J-P, Mergeai, G.** (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrilamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 10(2): 77-81.
- Berman, J., Sudbery, P. E.** (2002) *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews* 3(12): 918-930.
- Botterel, F., Desterke, C., Costa, C., Bretagne, S.** (2001) Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *Journal of Clinical Microbiology* 39(11): 4076-4081.
- Bougnoux, M-E., Morand, S., d'Enfert, C.** (2002) Usefulness of Multilocus Sequence Typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(4): 1290-1297.
- Bougnoux, M-E, Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N. A. R., Magnier, A., Davidson, A. D., d'Enfert, C., Odds, F. C.** (2003) Collaborative consensus for optimized Multilocus Sequence Typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(11): 5265-5266.



**Bretagne, S., Costa, J-M., Besmond, C., Carsique, R., Calderone, R.** (1997) Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1777-1780.

**Butler G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., et al.**, (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 459: 657-662.

**Calderone, R. A. & Fonzi, W. A.** (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9, 327-335.

**Cantón, E., Viudes, A., Pemán, J.** (2001) Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18: 51-55.

**Colombo, A. L., Guimaraes, T., Silva, L. R. B. F., de Almeida Monfardini, L. P., Cunha, A. K. B., Rady, P., Alves, T., Rosas, R. C.** (2007) Prospective observational study of Candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 28(5): 570- 576.

**Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L, Córdoba, S., Melhem, M. C. Szesz, M. W., Castañeda, E., Martínez, G., Gabastou, J-M.** (2008) Red Regional de Laboratorios para la Vigilancia de las Infecciones Fúngicas Invasoras y Susceptibilidad a los Antifúngicos. *Revista Panamericana de la Salud Pública* 23(2): 129-34.

**Da Matta, D. A., Melo, A. S., Colombo, A. L., Frade, J. P., Nucci, M., Lott, T. J.** (2010) Candidemia surveillance in Brazil: evidence for a geographical boundary defining an area exhibiting an abatement of infections by *Candida albicans* group 2 strains. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9): 3062-3067.

**de Souza Bonfim-Mendoza, P., Fiorini, A., Suemi Shinobu-Mesquita, C., Cristiane Baeza, L., Fernandez, M. A., Estivalet Svidzinski, T. I.** (2013) Molecular typing of *Candida albicans* isolates from hospitalized patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55(6): 385-391.

**Diab-Elschahawi, M., Forstner, C., Hagen, F., Meis, J. F., Lassnig, A. M., Presterl, E., Klaassen, C. H. W.** (2012) Microsatellite genotyping clarified conspicuous accumulation of *Candida parapsilosis* at a cardiothoracic surgery intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 50(11): 3422-3426

**Dodgson, A. R., Dodgson, K. J., Pujol, C., Pfaller, M.A., Soll, D.** (2004) Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the FUR1 gene of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6): 2223-2227.

**Donnelly, S. M., Sullivan, D. J., Shanley, D. B., Coleman, D. C.** (1999) Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology* 145: 1871-1882.

**Earl, D. A., vonHoldt, B. M.** (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

**Ellegren, H.** (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews* 5: 435-445.

**Eloy, O., Marque, S., Botterel, F., Stephan, F., Costa, J-M., Lasserre, V., Bretagne, S.** (2006) Uniform distribution of three *Candida albicans* microsatellite markers in two French ICU populations supports a lack of nosocomial cross-contamination. *BMC Infectious Diseases* 6:162.

**Escribano, P., Rodríguez-Créixems, M., Sánchez-Carrillo, C., Muñoz, P., Bouza, E., Guinea, J.** (2013) Endemic genotypes of *Candida albicans* causing fungemia are frequent in the hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 51(7): 2118-2123.

**Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J.** (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

**Excoffier, L. & Lischer H. E. L.** (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.

**Gago, S., Lorenzo, B., Gomez-Lopez, A., Cuesta, I., Cuenca-Estrella, M., Buitrago, M. J.** (2013) Analysis of strain relatedness using High Resolution Melting in a case of recurrent candiduria. *BMC Microbiology* 13:13.

**Garcia-Hermoso, D., Cabaret, O., Lecellier, G., Desnos-Ollivier, M., Hoinard, D., Raoux, D., Costa, J-M., Dromer, F., Bretagne, S.** (2007) Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-based typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 45(12): 3958.

**García-Vidal, C., Carratalà, J.** (2012) Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 30(3): 151-158.

**Hoarau, G., Bougnoux, M. E., Fily, A., François, N., Loridant, S., Jawhara, S., d'Enfert, C., Poulain, D., Sendid, B.** (2014) Genetic diversity among *Candida albicans* isolates associated with vertical transmission in preterm triplets. *Mycopathologia* 178(3-4): 285-290.

**Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988).** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 2465-2466.

**Hunter, P. R. (1990).** Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology* **28**(9): 1903-1905.

**Huson, D. H., and Bryant, D. (2006)** Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* **23**(2): 254-267.

**Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W., Scherer, S. (2004)** The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(19): 7329-7334.

**Jubany, S., Tomasco, I., Ponce de León, I., Medina, K., Carrau, F., Arrambide, N., Naya, H., Gaggero, C. (2008)** Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* **8**: 472-484.

**Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011).** *The yeast: A taxonomic study*. 5ta Edición.

**L'Ollivier, C., Labruère, C., Jebrane, A., Bougnoux, M. E., d'Enfert, C., Bonnin, A., Dalle, F. (2012).** Using a Multi-Locus Microsatellite Typing method improved phylogenetic distribution of *Candida albicans* isolates but failed to demonstrate association of some genotype with the commensal or clinical origin of the isolates. *Infection, Genetics and Evolution* **12**(8): 1949-1957.

**Lasker, B. A., Butler, G., Lott, T. J. (2006)** Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(3): 750-759.

**Legras, J-L., Erny, C., Charpentier, C. (2014)** Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome. *PLoS ONE* **9**(10): e108089.

**Lehmann, P. F., Lin, D., Lasker, B. A. (1992)** Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology* **30**(12): 3249-3254.

**Lin, D., Wu, L-C., Rinaldi, M. G., Lehmann, P. F. (1995)** Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(7): 1815-1821.

**Lyon, J. P., Moraes, K. C. M., Moreira L. M., Aimibre, F., Resende, M. A.** (2010) *Candida albicans*: genotyping methods and clade related phenotypic characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 841- 849.

**MacCallum, D. M., Castillo, L., Nather, K., Munro, C. A., Brown, A. J. P., Gow, N. A., Odds, F. C.** (2009) Properly differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryotic cell*. 373-387

**Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G.** (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3140-3145.

**McCullough, M. J., Ross, B. C. & Reade, P. C.** (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofacial Surgery* 25, 136-144.

**Mishra, N. N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D. K. & Singh, R.** (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54, 201-235.

**Molero, G., Diez-Orejas, R., Navarro-Garcia, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sanchez-Perez, M. & Nombela, C.** (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol* 1, 95-106.

**Nosek, J., Holesova, Z., Kosa, P., Gacser, A., Tomaska, L.** (2009) Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics* 55: 497-509.

**Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A., Colombo, A. L.** (2010) Epidemiology of oportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases* 51(5): 561-570.

**Odds, F. C., Bougnoux, M-E., Shaw, D. J., Bain, J. M, Davidson, A. D., Diogo, D., Jacobsen, M. D., Lecomte, M., Li, S-Y., Tavanti, A., Maiden, M. C. J., Gow, N. A. R., d'Enfert, C.** (2007) Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 6 (6): 1041–1052.

**Odds, F. C., Jacobsen, M. D.** (2008) Multilocus Sequence Typing of pathogenic *Candida* species. *Eukaryotic cell* 7(7): 1075–1084.

**Odds F. C.** (2010) Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiology* 5(1): 67-79.

**Olive, D. M. & Bean, P.** (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6): 1661-1669.

**Paulitsch-Fuchs, A. H., Heiling, B., Willinger, B., Buzina, W.** (2012). Microsatellite typing of catheter-associated *Candida albicans* strains. *Epidemiology Insights*, Ribeiro De Souza Da Cunha, M. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0565-7.

**Peakall, R. and Smouse P.E.** (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J.** (2002) Role of sentinel surveillance of Candidemia: Trends in species distribution and antifungal susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 40(10): 3551 – 3557.

**Pfaller, M. A., Pappas P. G., Wingard J. R.** (2006) Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. *Clinical Infectious Diseases* 43 (1): S3-S14

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J.** (2007) Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1): 133 – 163.

**Pfaller, M. A., Diekema, D. J.** (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology* 36(1): 1-53

**Pineda, G., Scollo, K., Santiso, G., Lehmann, E., Arechavala, A.** (2008) Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación de *Candida albicans*. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 211-217.

**Poulain, D.** (2013) *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*. [Epub ahead of print].

**Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P.** (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

**Pujol, C. Joly, S., Lockhart, S. R., Noel, S., Tibayrenc, M., Soll, D. R.** (1997) Parity among the Randomly Amplified Polymorphic DNA method, Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Southern Blot Hybridization with the moderately repetitive DNA Probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 35(9): 2348-2358.

**Pulcrano, G., Roschetto, E., Lula, V. D., Panellis, D., Rossano, F., Catania, M. R.** (2012) MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31(11): 2919-2928.

**Robin, C.** (1853). Histoire naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants. (1853). Bailliere, Paris.

**Romeo, O., Delfino, D., Cascio, A., Lo Passo, C., Amorini, M., Romeo, D., Pernice, I.** (2012) Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infection, Genetics and Evolution* 13: 105-108.

**Rüping, M., Vehreschild, J. J., Cornely, A.** (2008) Patients at high risk of invasive fungal infections. *Drugs* 68 (14): 1941-1962.

**Russel, C. L., Smith, E. M., Calvo-Bado, L. A., Green, L. E., Wellington, E. M. H., Medley, G. F., Moore, L. J., Grogono-Thomas, R.** (2014) Multiple locus VNTR analysis highlights that geographical clustering and distribution of *Dichelobacter nodosus*, the causal agent of footrot in sheep, correlates with inter-country movements. *Infection, Genetics and Evolution* 22: 273-279.

**Salipante, S. J., Hall, B. G.** (2011) Towards the molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae*: strategies, successes and shortcomings. *Infection, Genetics and Evolution*. 11(7): 1505-1513.

**Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., Mendes Giannini, M. J. S.** (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 62: 10-24.

**Sabino, R., Sampaio, P., Rosado, L., Stevens, D. A., Clemons K. V., Pais, C.** (2010) New polymorphic markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1677-1682.

**Sampaio, P., Gusmao, L., Alves, C., Pina-Vaz, C., Amorim, A., Pais, C.** (2003) Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 41(2): 552-557.

**Sampaio, P., Gusmao, L., Correia, A., Alves, C., Rodrigues, A. C., Pina-Vaz, C., Amorim, A., Pais, C.** (2005) New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *Journal of Clinical Microbiology* 43(8): 3869-3876

**Scherer, S., & Stevens, D.** (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 25(4): 675-679.

**Selkoe, K. A., Toonen, R. J.** (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.

**Shi, W-m., Mei, X-y., Gao, F., Huo, K-k., Sheng, L-l., Qin, H-h., Wu, Z-w., Zheng, J.** (2007) Analysis of genital *Candida albicans* infection by rapid microsatellite markers genotyping. *Chinese Medical Journal* 120(11): 975-980.

**Shimizu, K., Hattori, H., Adachi, H., Oshima, R., Horii, T., Tanaka, R., Yaguchi, T., Tomita, Y., Akiyama, M., Kawamoto, F., Kanbe, T.** (2011) Microsatellite-based genotyping of *Candida albicans* isolated from patients with superficial candidiasis. *Medical Mycology Journal* 52: 129-138.

**Shin, J. H., Bougnoux, M. E., d'Enfert, C., Kim, S. H., Moon, C-J., Joo, M. Y., Lee, K., Kim, M-N., Lee, H. S., Shin, M. G., Suh, S. P., Ryang, D. W.** (2011) Genetic diversity among Korean *Candida albicans* bloodstream isolates: assessment by multilocus sequence typing and restriction endonuclease analysis of genomic DNA by use of BssHII. *Journal of Clinical Microbiology* 49(7): 2572-2577.

**Soll, D. R., Morrow, B., Srikantha, T.** (1993) High-Frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends in Genetics* 9(2): 61-65.

**Soll, D. R.** (2000) The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13(2): 332-370.

**Spampinato, C., Leonardi, D.** (2013) Molecular fingerprints to identify *Candida* species. *BioMed Research International*. Volumen 2013.

**Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

**Tavanti, A., Gow, N. A. R., Senesi, S., Maiden, M. C. J., Odds, F. C.** (2003) Optimization and validation of Multilocus Sequence Typing for *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8): 3765-3776.

**Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A. R., Maiden, M. C. J., Odds, F. C.** (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1): 284-292.

**Tortorano, A. M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Klibber, C. C., Faure, O., Biraghi, E., Canton, E., Zimmermann, K., Seaton, S., Grillot, R.** (2004) Epidemiology of Candidemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23: 317-322.

**Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J.** (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

**Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuki, J. D.** (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4): 606-625

**van Asbeck, E. C., Huang, Y. C., Markham, A. N., Clemons, K. V., Stevens, D. A.** (2007). *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia* 164(6): 287–293

**van Asbeck, E. C., Clemons, K. V., Stevens, D. A.** (2009) *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology* 35(4): 283-309.

**Vaz, C., Sampaio, P., Clemons, K. V., Huang, Y. C., Stevens, D. A., Pais, C.** (2011) Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71(2): 159-162.

**Warnock, D. W.** (2007) Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology*. 48: 1-12.

**Wright, S.** (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15(4): 323-354.

**Yamauchi, M., Uchiyama, R.,** (2007) Germline and somatic mutations in colorectal cancers from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *New developments in mutation research*. Capítulo 1: 1-17.



**Anexo I. Variables epidemiológicas de los aislamientos de *Candida albicans***

Nº de aislamiento	Procedencia	Lugar de internación	Fecha de positividad del cultivo	Edad	Sexo	Material de origen del aislamiento
908042	Hospital Maciel	SD	SD	SD	F	Hemocultivo
1125025	Hospital Pereira Rossell	CTI	23/11/2010	0.1	SD	Hemocultivo
1203030	Hospital Pereira Rossell	CTI	02/12/2010	0.2	SD	Hemocultivo
107005	Asociación Española	Cardiología	29/12/2010	70	SD	Catéter
204030	Hospital Maciel	Hematología	31/01/2011	41	SD	Hemocultivo
211033	Asociación Española	CTI	08/02/2011	62	SD	Líquido peritoneal
329026	Hospital Pereira Rossell	CTI	23/03/2011	2	F	Hemocultivo
415031	Asociación Española	Sala	11/04/2011	69	M	Catéter
517026	Hospital Maciel	CTI	14/05/2011	22	F	Catéter
524010	Asociación Española	Urología	15/05/2011	52	M	Hemocultivo
610021	Hospital Maciel	CTI	06/06/2011	80	M	Líquido biliar
808076	CASMU	Sala	10/06/2011	81	M	Hemocultivo
627011	Asociación Española	CTI	22/06/2011	62	M	Líquido peritoneal
701051	Médica Uruguaya	CTI	SD	77	F	Líquido peritoneal
808079	CASMU	CTI	06/07/2011	72	F	Hemocultivo
815052	Asociación Española	CTI	09/08/2011	82	F	Hemocultivo
912048	Asociación Española	CTI	18/08/2011	0.1	M	Hemocultivo
1019031	CASMU	CTI	23/08/2011	76	M	Hemocultivo
908056	Hospital Pereira Rossell	CTI	28/08/2011	SD	M	Hemocultivo
912006	Asociación Española	Sala	05/09/2011	71	M	Hemocultivo
1220029	Hospital Maciel	Diálisis	11/09/2011	SD	M	Catéter
1021009	Hospital Pereira Rossell	CTI	11/09/2011	SD	SD	Hemocultivo
1019030	CASMU	Hemodiálisis	27/09/2011	80	M	Catéter
1006001	Asociación Española	CTI	29/09/2011	70	M	Hemocultivo
1026018	CASMU	CTI	14/10/2011	84	F	Hemocultivo

1026017	CASMU	CTI	15/10/2011	77	F	Catéter
1117031	CASMU	Sala	27/10/2011	74	F	Hemocultivo
1125010	Asociación Española	Transplante	18/11/2011	58	F	Hemocultivo
217014	Hospital Maciel	Cuidados Intermedios	13/02/2012	47	M	Hemocultivo
320033	Médica Uruguaya	CTI	06/03/2012	78	M	Hemocultivo
316019	Asociación Española	CTI	08/03/2012	33	M	Hemocultivo
322022	Hospital Maciel	CTI	16/03/2012	58	F	Hemocultivo
322024	Hospital Maciel	CTI	16/03/2012	58	F	Líquido peritoneal
323018	CASMU	CTI	SD	67	M	Hemocultivo
410005	Asociación Española	CTI	28/03/2012	59	F	Hemocultivo
426008	Médica Uruguaya	CTI	18/04/2012	SD	M	Catéter
511042	Hospital Maciel	Hematología	08/05/2012	49	M	Hemocultivo
524025	Hospital Maciel	Sala	16/05/2012	22	M	Líquido peritoneal
605015	Hospital Maciel	CTI	04/06/2012	60	M	Líquido peritoneal
620009	Asociación Española	CTI	12/06/2012	51	F	Hemocultivo
719018	Asociación Española	Sala	02/07/2012	88	M	Hemocultivo
830034	Asociación Española	Sala	26/08/2012	67	F	Catéter
831025	CASMU	Sala	SD	60	F	Hemocultivo
831028	CASMU	Cirugía	SD	80	M	Líquido peritoneal
1011008	Médica Uruguaya	CTI	12/09/2012	47	F	Hemocultivo
926015	Hospital Maciel	CTI	15/09/2012	87	F	Líquido peritoneal
1011005	Médica Uruguaya	CTI	27/09/2012	59	M	Hemocultivo
1024003	Asociación Española	CTI	18/10/2012	58	F	Líquido cefalorraquídeo
1031015	Médica Uruguaya	CTI	23/10/2012	0.1	M	Catéter
1031013	Asociación Española	Cirugía	25/10/2012	74	M	Líquido peritoneal
1108020	CASMU	CTI	02/11/2012	72	F	Líquido peritoneal
123004	Asociación Española	CTI	15/01/2013	84	M	Hemocultivo
305006	Asociación Española	Sala	22/02/2013	49	M	Hemocultivo

304010	Hospital Maciel	CTI	28/02/2013	76	F	Hemocultivo
--------	-----------------	-----	------------	----	---	-------------

Aislamientos analizados mediante MLST.

CTI: Centro de Terapia Intensiva

F: Femenino

M: Masculino

SD: Sin Dato

**Anexo II. Variables epidemiológicas de los aislamientos de *Candida parapsilosis***

N° de aislamiento	Procedencia	Lugar de internación	Fecha de positividad del cultivo	Edad	Sexo	Material de origen del aislamiento
626036	Hospital Maciel	CTI	SD	59	M	Hemocultivo
108009	Hospital de Florida	Sala	SD	62	M	Hemocultivo
401037	Hospital de Florida	Cirugía	SD	70	M	Hemocultivo
618040	Hospital Maciel	Diálisis	SD	SD	F	Hemocultivo
716003	Hospital Maciel	Hematología	SD	SD	M	Hemocultivo
827002	Hospital Evangélico	SD	SD	0,2	M	Catéter
827046	Hospital de Florida	CTI	SD	43	M	Hemocultivo
325003	Hospital Maciel	CTI	SD	29	M	Hemocultivo
330001	Hospital Maciel	CTI	SD	29	M	Líquido peritoneal
721037	Hospital de Paysandú	CTI	SD	55	F	Hemocultivo
830033	Hospital Pereira Rossell	CTI	19/08/2010	0,3	F	Hemocultivo
908043	Hospital Maciel	Sala	30/08/2010	69	F	Hemocultivo
1012039	Hospital Maciel	Neurocirugía	20/09/2010	17	F	Hemocultivo
1012060	Hospital Maciel	Neurocirugía	27/09/2010	17	F	Hemocultivo
1008026	Asociación Española	Sala	28/09/2010	61	M	Hemocultivo
1020004	Asociación Española	CTI	12/10/2010	68	M	Hemocultivo
1012061	Hospital Maciel	Neurocirugía	SD	17	F	Catéter
1103007	Asociación Española	Sala	28/10/2010	28	F	Catéter
1203004	Hospital Maciel	Diálisis	30/11/2010	25	M	Líquido peritoneal
1221005	Hospital de Salto	CTI	17/12/2010	0,1	M	Hemocultivo
211032	Asociación Española	Sala	06/02/2011	80	M	Hemocultivo
223024	Asociación Española	CTI	17/02/2011	70	M	Hemocultivo
318025	Hospital Maciel	CTI	09/03/2011	83	M	Hemocultivo
609007	Hospital Maciel	Sala	28/05/2011	64	M	Hemocultivo
701050	MUCAM	Hematología	06/06/2011	18	M	Catéter

808078	CASMU	Sala	12/06/2011	60	M	Hemocultivo
623011	Hospital Pasteur	CTI	17/06/2011	74	M	Hemocultivo
706031	Hospital Pereira Rossell	CTI	21/06/2011	0,3	SD	Hemocultivo
726043	Asociación Española	Urología	05/07/2011	52	M	Hemocultivo
902027	Hospital Pereira Rossell	CTI	14/07/2011	0,3	SD	Hemocultivo
902028	Hospital Pereira Rossell	CTI	20/07/2011	SD	SD	Hemocultivo
805067	Asociación Española	Unidad de transplante	01/08/2011	18	M	Hemocultivo
808077	CASMU	CTI	01/08/2011	0,011	F	Hemocultivo
927055	Hospital Pasteur	CTI	05/09/2011	22	M	Catéter
1007019	Asociación Española	Cardiología	03/10/2011	82	F	Hemocultivo
1025008	Asociación Española	CTI	16/10/2011	79	M	Hemocultivo
1111008	Asociación Española	Cardiología	01/11/2011	57	M	Hemocultivo
1125009	Asociación Española	Sala	21/11/2011	57	M	Hemocultivo
1125024	Hospital Maciel	Hematología	24/11/2011	SD	F	Hemocultivo
125003	MUCAM	Sala	09/01/2012	67	M	Tejido óseo
125002	MUCAM	CTI	11/01/2012	70	M	Hemocultivo
215013	Asociación Española	CTI	09/02/2012	48	M	Catéter
323019	CASMU	Emergencia	18/02/2012	27	M	Tejido óseo
316020	Asociación Española	CTI	10/03/2012	45	F	Catéter
411012	Hospital Pereira Rossell	CTI	15/03/2012	10	F	Hemocultivo
322001 L	Asociación Española	CTI	18/03/2012	45	F	Hemocultivo
322001 R	Asociación Española	CTI	18/03/2012	45	F	Hemocultivo
426009	MUCAM	Hematología	26/03/2012	64	F	Hemocultivo
504033	CASMU	Diálisis peritoneal	17/04/2012	75	M	Catéter
516011	Cudam	CTI	28/04/2012	19	M	Catéter
531010	Hospital Maciel	Hospital de día	23/05/2012	SD	F	Hemocultivo
605034	Asociación Española	CTI	30/05/2012	51	F	Hemocultivo

<b>613016</b>	Hospital Maciel	Sala	10/06/2012	59	M	Hemocultivo
<b>719017</b>	Asociación Española	Sala	03/07/2012	76	M	Hemocultivo
<b>712015</b>	Hospital Maciel	Hospital de día	09/07/2012	SD	F	Catéter
<b>725012</b>	Hospital Maciel	CTI	SD	33	F	Hemocultivo
<b>410002</b>	Asociación Española	CTI	28/3/1012	59	F	Hemocultivo

CTI: Centro de Terapia Intensiva

F: Femenino

M: Masculino

SD: Sin Dato

## **Anexo III. Protocolos**

### **Gel de agarosa 1,5% (100 ml)**

1,5 g Agarosa

100 ml tampón TBE 0,5 X (Tampón TBE 10X, 1 L: 108 g Tris, 55 g ácido bórico, 80 ml EDTA 0.5 M)

### **Extracciones de ADN**

#### **Método de extracción de ADN con “Ultraclean microbial DNA isolation kit” (MoBio)**

Día 1: Descongelar los aislamientos en medio Agar Sabouraud e incubar a 28°C.

Día 2: Repicar las cepas en medio líquido YPD y cultivar a 30°C con agitación a 50 rpm.

Día 3:

- Transferir 1,8 ml del cultivo a un tubo de colección y centrifugar 30 segundos a 10000 xg.
- Descartar el sobrenadante y centrifugar nuevamente 30 segundos a 10000 xg.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 300 µl de solución “microbead” y vortexear.
- Agregar 50 µl de solución MD1.
- Incubar 10 minutos a 70°C y transferir al tubo “microbead”.
- Vortexear el tubo horizontalmente a máxima velocidad por 10 minutos.
- Centrifugar el tubo durante 30 segundos a 10000 xg y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de colección.
- Agregar 100 µl de MD2, mezclar e incubar a 4°C durante cinco minutos.
- Centrifugar un minuto a 10000 xg y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de colección.
- Agregar 900 µl de solución MD3 y vortexear.
- Cargar la mezcla en una columna y centrifugar 30 segundos a 10000 xg.
- Descartar el contenido del tubo de colección y agregar 300 µl de solución MD4.

Centrifugar un minuto a 10000 xg.

- Colocar la columna en un nuevo tubo de colección y agregar 50 µl de solución MD5. Centrifugar 30 segundos a 10000 xg.
- Descartar la columna y guardar el ADN a -20°C.

### **Método de extracción de ADN con “Quick-gDNA Mini Prep” (Zymo Research)**

Día 1: Se descongelan los aislamientos en medio Agar Sabouraud y se incuban a 28°C.

Día 2: Se repican las cepas en medio líquido YPD y se cultivan a 30°C con agitación.

Día 3:

- Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm para quitar el medio de cultivo y resuspender el pellet en agua bidestilada estéril.
- Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm y resuspender el pellet en 200 µl de agua bidestilada estéril.
- Agregar 800 µl de solución de lisis y vortexear unos segundos.
- Incubar 30 minutos a 60°C.
- Transferir la mezcla a una columna, colocada en un tubo de colección y centrifugar 10 minutos a 10000 xg
- Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y agregar 200 µl de solución de pre lavado. Centrifugar un minuto a 10000 xg.
- Agregar 500 µl de solución de lavado y centrifugar tres minutos a 12000 xg
- Transferir la columna a un tubo eppendorf y agregar 50 µl de solución de elución.
- Incubar cinco minutos a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad 30 segundos. Agregar nuevamente 50 µl de solución de elución y repetir.
- Descartar la columna y guardar el ADN a -20°C.



## Condiciones de amplificación de microsatélites en *C. albicans*

### Cebadores:

EF3 F: 5'-TTTCCTCTTCCTTTCATATAGAA-3'

R: 5'-GGATTCACTAGCAGCAGACA-3'

HIS3 F: 5'-TGGCAAAAATGATATTCCAA-3'

R: 5'-TACACTATGCCCCAAACACA-3'

CDC3 F: 5'-CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA-3'

R: 5'-CAGTCACAAGATTTAAAATGTTCAAG-3'

### Mezcla de amplificación para marcador EF3:

(volumen final 25  $\mu$ l)

	Volumen por reacción ( $\mu$ l)	Concentración final
Tris-HCl 10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3.25	3.25 mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
EF3 F 5 $\mu$ M	0.4	2 pmol
EF3 R 5 $\mu$ M	0.4	2 pmol
Taq 5 U/ $\mu$ l	0.25	1.25 U
H <sub>2</sub> O	14.3	
ADN	2	

**Programa de PCR:**

95°C 6 min  
95°C 15 seg }  
52°C 1 min } 30 ciclos  
72°C 1 min }  
72°C 7 min

**Mezcla de amplificación para marcador HIS3:**

(volumen final 25 µl)

	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Tris-HCl 10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3	3 mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
EF3 F 5 µM	0.6	3 pmol
EF3 R 5 µM	0.6	3 pmol
Taq 5 U/ µl	0.25	1.25 U
H <sub>2</sub> O	14.05	
ADN	2	

**Programa de PCR:**

95°C 6 min  
95°C 30 seg }  
55°C 30 seg } 30 ciclos  
72°C 1 min }  
72°C 7 min

### Mezcla de amplificación para marcador CDC3:

(volumen final 25  $\mu$ l)

	Volumen por reacción ( $\mu$ l)	Concentración final
Tris-HCl 10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3	3 mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
EF3 F 5 $\mu$ M	1	5 pmol
EF3 R 5 $\mu$ M	1	5 pmol
Taq 5 U/ $\mu$ l	0.25	1.25 U
H <sub>2</sub> O	13.25	
ADN	2	

### Programa de PCR:

95°C 6 min

95°C 30 seg

50°C 1 min

72°C 1 min

72°C 7 min

} 30 ciclos

## Condiciones de amplificación de microsatélites en *C. parapsilosis*

### Cebadores:

CP1 F: 5'-AAAGTGCTACACACGCATCG-3'

R: 5'-GGCTTGCAATTCATTTTCCT-3'

CP4 F: 5'-CAAATCATCCAGCTTCAAACC-3'

R: 5'-CATCAAACAAGAATTCGATATCAC-3'

CP6 F: 5'-CAGGAACAGGACAATGGTGA-3'

R: 5'-TCTGGAGCCTCTAGGACGTTT-3'

B5 F: 5'-AGGTTTGTAGTAGTGTCCTATGG-3'

R: 5'-TATCTCTCTCGCCATTTGAACG-3'

### Mezcla de amplificación para marcadores CP1, CP4 y CP6:

(volumen final 25 µl)

	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Tris-HCl 10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
Cebador F 5 µM	1.25	0.25 µM
Cebador R 5 µM	1.25	0.25 µM
Taq 5 U/ µl	0.2	1 U
H <sub>2</sub> O	14.3	
ADN	2	

### Programa de PCR:

95°C 2 min  
94°C 30 seg }  
\*°C 30 seg } 28 ciclos  
72°C 1 min }  
72°C 7 min

\* CP1 y CP6: 55°C, CP4: 54°C

### Mezcla de amplificación para marcador B5:

(volumen final 30 µl)

	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Tris-HCl 10X	3	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.8	1.5 mM
dNTPs 2.5 mM	2.4	0.2 mM
Cebador F 5 µM	1.2	0.2 µM
Cebador R 5 µM	1.2	0.2 µM
Taq 5 U/ µl	0.4	2 U
H <sub>2</sub> O	18	
ADN	2	

### Programa de PCR:

95°C 3 min  
95°C 30 seg }  
58°C 30 seg } 30 ciclos  
72°C 1 min }  
72°C 10 min

## Condiciones de amplificación de marcadores MSLT en *C. albicans*

### Cebadores:

AAT1a	F: 5'-ACTCAAGCTAGATTTTTGGC-3' R: 5'-CAGCAACATGATTAGCCC- 3'
ACC1	F: 5'-GCAAGAGAAATTTTAATTCAATG-3' R: 5-TTCATCAACATCATCCAAGTG-3'
ADP1	F: 5'-GAGCCAAGTATGAATGATTTG-3' R: 5'-TTGATCAACAAACCCGATAAT-3'
MPIb	F: 5'-ACCAGAAATGGCCATTGC-3' R: 5'-GCAGCCATGCATTCAATTAT-3'
SYA1	F: 5'-AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG-3' R: 5'-GTTACCTTTACCACCAGCTTT-3'
VPS13	F: 5'-TCGTTGAGAGATATTCGACTT-3' R: 5'-ACGGATGGATCTCCAGTCC-3'
ZWF1b	F: 5'-GTTTCATTTGATCCTGAAGC-3' R: 5'-GCCATTGATAAGTACCTGGAT-3'

### Mezcla de amplificación:

(volumen final 50  $\mu$ l)

	Volumen por reacción ( $\mu$ l)	Concentración final
Tris-HCl 10X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5	2.5 mM
dNTPs 2.5 mM	4	0.2 mM
Cebador F 5 $\mu$ M	2	10 pmol
Cebador R 5 $\mu$ M	2	10 pmol
Taq 5 U/ $\mu$ l	0.25	1.25 U
H <sub>2</sub> O	27.75	
ADN	1	

### Programa de PCR:

95°C 5 min

95°C 30 seg

\*°C 1 min } 30 ciclos

72°C 1 min }

72°C 7 min

\* AAC1, ADP1, MPIb, SYA1, ZWF1b, y AAT1a: 54°C, VPS13: 56°C.

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

### **Tratamiento de vidrios de la cuba de electroforesis**

Lavar ambos vidrios con agua común y jabón no iónico.

Enjuagar con agua común y luego con agua bidestilada.

Una vez secos, limpiar 2 veces con 3 ml de etanol 95°C y papel tissue.

### **Vidrio grande (Tratamiento para adherir el gel)**

En campana de gases: impregnar el vidrio, usando papel tissue con: 1,7  $\mu$ l de “bind silane”+560 ml de 0,5% Acido Acético en etanol 95°C.

Dejar secar 15 minutos y retirar el exceso con tissue y 1 ml de etanol 95°C.

### **Vidrio chico (Tratamiento para despegarse del gel)**

En campana de gases: cuando el vidrio va a ser utilizado por primera vez, impregnar el vidrio con 1,6 ml de repel silane utilizando papel tissue.

Cuando el vidrio ya fue tratado previamente con “repel silane”, aplicar 1 ml.

Dejar secar 15 minutos y retirar el exceso con un papel tissue.

### **Ensamblaje de los vidrios**

Se coloca el vidrio chico con el lado tratado con “bind silane” hacia arriba.

Se limpian con etanol 95°C los separadores del gel y se colocan sobre los bordes del vidrio chico.

Se coloca el vidrio grande, con el lado tratado con “repel silane” hacia abajo, sobre el vidrio chico.

Se fijan ambos vidrios con los soportes provistos con la cuba.

### **Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5%, 7M urea**

Preparación del gel:

(volumen final 50 ml)

6,25 ml acrilamida-bisacrilamida al 40%



5 ml tampón TBE 10X\*

15 ml agua bidestilada

21 g urea

Mezclar hasta que la urea este disuelta y enrazar hasta 50ml con agua bidestilada.

Eliminar mediante bomba de vacío las burbujas de la mezcla.

Antes de verter la acrilamida en la cuba agregar 30µl de TEMED (tetrametilendiamida) y 300 µl de APS (persulfato de amonio) al 10% (1 g de APS + 10 ml H<sub>2</sub>O) para polimerizar.

Colocar los vidrios ensamblados de forma horizontal e introducir la mezcla del gel entre los dos vidrios mediante una jeringa.

Colocar el peine en la parte superior del gel y dejar polimerizar (aproximadamente 1 h).

Una vez polimerizado el gel, colocarlo de forma vertical y armar la cuba. Cubrir con tampón TBE 1X.

Conectar la cuba de electroforesis a una fuente de poder y fijar la potencia en 65-70 W.

Precalentar el gel hasta 55°C.

\*Tampón TBE 10X, 1 L: 108 g Tris, 55 g ácido bórico, 80 ml EDTA 0.5 M.

### **Preparación de las muestras**

Los productos de PCR se diluyen en tampón de carga STR hasta 1-2 ng/µl.

El marcador de peso molecular de 10 pb se diluye en tampón STR hasta una concentración de 50 ng/µl.

Las muestras se colocan 6 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN, e inmediatamente en hielo, donde deben permanecer hasta el momento de ser cargadas en el gel.

Tampón STR:

9,5 ml formamida

5 mg azul de bromofenol (0,05%)

5 mg xylen cyanol (0,05%)

100  $\mu$ l NaOH 1 M

400  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

### **Carga del gel**

Desconectar la cuba de la fuente de poder y cargar 5  $\mu$ l de cada muestra en un pocillo.

En el primer y último pocillo así como en el central, cargar 4  $\mu$ l del marcador de peso molecular.

Conectar nuevamente a la fuente de poder y correr a una temperatura entre 50 y 55°C, a una potencia entre 55 y 65°C, de modo que la temperatura sea constante.

El tiempo de corrida depende del tamaño de las muestras: hasta que el frente de corrida migre lo suficiente como para que las bandas que quiero visualizar hayan corrido.

Una vez finalizada la corrida, se deja enfriar el gel.

Se desarma la cuba y se separan los vidrios para teñir el gel, que se encuentra ahora adherido al vidrio grande.

### **Tinción del gel**

Método de Benbouza 2006 (modificado)

La tinción consta de cuatro pasos que se realizan en agitación:

1- Fijación: se sumerge el gel en la solución "Fix" durante 5 minutos

2- Tinción: se transfiere el gel a la solución de nitrato de plata y se deja durante 6-7 minutos. Luego se sumerge brevemente el gel en agua bidestilada para retirar el exceso de plata

3- Revelado: se pasa el gel a la solución de revelado hasta observar las bandas de ADN con la intensidad deseada.

4- "Stop": para finalizar el revelado, se sumerge el gel en la solución "stop" durante 2 minutos

Finalmente se enjuaga el gel con agua bidestilada.

Soluciones fix y stop:

10% de etanol absoluto

0,5% ácido acético glacial

Agua bidestilada

Solución de tinción:

1,5 g  $\text{AgNO}_3$

1,5 ml  $\text{HCOH}$  al 37%

1 l agua bidestilada

Solución reveladora:

15 g  $\text{NaOH}$

3 ml  $\text{HCOH}$  al 37%

1 l agua bidestilada

**Anexo IV. Distribución de aislamientos de *Candida albicans* según alelos de marcadores microsatélites y probabilidad de pertenencia a una subpoblación en función del algoritmo de Structure**

N° aislamiento	EF3 alelo 1	EF3 alelo 2	HIS3 alelo 1	HIS3 alelo 2	CDC3 alelo 1	CDC3 alelo 2	Subpoblación	Probabilidad
908042	131	144	153	165	139	139	2	0,987
1125025	137	140	153	169	127	131	2	0,881
1203030	127	136	161	205	119	127	1	0,980
107005	131	137	153	165	119	123	2	0,982
204030	131	152	153	165	123	139	2	0,980
211033	136	136	281	349	127	127	1	0,983
329026	131	137	149	161	115	119	2	0,983
415031	137	144	153	165	131	135	2	0,934
517026	144	144	149	197	123	127	2	0,861
524010	132	132	161	193	123	131	1	0,980
610021	131	137	149	161	115	119	2	0,982
808076	127	136	161	213	119	127	1	0,975
627011	131	137	149	161	115	119	2	0,982
701051	132	132	161	193	119	127	1	0,981
808079	131	137	153	157	119	119	2	0,983
815052	126	135	241	161	127	127	1	0,931
912048	133	136	249	329	119	127	1	0,960
1019031	131	131	145	161	119	119	2	0,964
908056	137	139	165	245	119	119	2	0,981
912006	131	131	289	339	123	123	2	0,914
1220029	134	143	157	161	123	123	Intermedia	0,350(1)/0,650(2)*
1021009	137	139	165	245	119	119	2	0,981
1019030	132	132	189	197	127	127	1	0,980

<b>1006001</b>	134	137	257	309	119	127	Intermedia	0,207(1)/0,973(2)*
<b>1026018</b>	132	132	161	185	119	119	1	0,946
<b>1026017</b>	127	136	161	201	119	127	1	0,981
<b>1117031</b>	131	137	153	165	115	119	2	0,987
<b>1125010</b>	127	136	161	201	119	127	1	0,982
<b>217014</b>	132	148	149	153	115	119	2	0,872
<b>320033</b>	131	137	161	161	115	119	2	0,972
<b>316019</b>	136	136	317	353	123	123	1	0,969
<b>322022</b>	132	136	161	233	119	135	1	0,976
<b>322024</b>	132	136	233	233	119	135	1	0,980
<b>323018</b>	131	145	157	165	123	135	2	0,975
<b>410005</b>	136	141	153	173	127	127	Intermedia	0,788(1)/0,212(2)
<b>426008</b>	137	156	149	165	127	131	2	0,905
<b>511042</b>	132	136	285	289	123	123	1	0,965
<b>524025</b>	131	137	149	161	115	119	2	0,982
<b>605015</b>	127	136	201	209	119	127	1	0,983
<b>620009</b>	137	139	173	277	119	119	2	0,940
<b>719018</b>	131	144	157	169	123	127	2	0,942
<b>830034</b>	131	147	153	157	115	119	2	0,982
<b>831025</b>	132	132	189	193	131	131	1	0,983
<b>831028</b>	127	136	157	165	131	131	1	0,844
<b>1011008</b>	127	136	205	209	119	127	1	0,982
<b>926015</b>	131	144	153	153	123	127	2	0,965
<b>1011005</b>	127	136	161	201	119	127	1	0,982
<b>1024003</b>	132	136	253	285	123	123	1	0,974
<b>1031015</b>	127	136	161	225	119	127	1	0,977
<b>1031013</b>	131	137	153	165	115	119	2	0,987
<b>1108020</b>	127	136	165	217	123	131	1	0,918

<b>123004</b>	131	137	153	165	115	119	2	0,987
<b>305006</b>	131	137	181	181	119	119	2	0,977
<b>304010</b>	131	137	149	161	115	115	2	0,985

Los alelos se expresan en número de pares de bases.

Aislamientos analizados mediante MLST.

Alelos nuevos para *C. albicans*.

\* El número entre paréntesis indica a que subpoblación corresponde la probabilidad.

**Anexo V. Distribución de aislamientos de *Candida parapsilosis* según alelos de marcadores microsatélites y probabilidad de pertenencia a una subpoblación en función del algoritmo de Structure**

N° de aislamiento	CP1 alelo 1	CP1 alelo 2	CP4 alelo 1	CP4 alelo 2	CP6 alelo 1	CP6 alelo 2	Subpoblación	Probabilidad
626036	22	28	28	28	36	36	2	0,974
108009	27	27	45	45	40	40	1	0,990
401037	28	28	62	62	40	51	1	0,916
618040	22	29	51	51	40	57	2	0,975
716003	18	28	30	30	11	13	Intermedia	0,539(1)/0,461(2)*
827002	28	28	62	62	40	52	1	0,815
827046	29	29	52	52	46	51	2	0,968
325003	23	29	51	51	44	52	2	0,991
330001	23	29	51	51	44	52	2	0,991
721037	25	25	45	45	42	42	1	0,989
830033	28	28	66	66	41	49	1	0,982
908043	22	28	57	57	43	43	2	0,908
1012039	27	27	61	61	51	51	1	0,978
1012060	27	27	61	61	51	51	1	0,978
1008026	27	29	29	29	38	45	Intermedia	0,480(1)/0,520(2)*
1020004	29	29	34	40	34	34	2	0,992
1012061	28	28	64	64	51	51	1	0,939
1103007	22	29	51	51	37	54	2	0,991
1203004	29	29	55	55	43	48	2	0,987
1221005	28	28	45	45	41	41	1	0,991
211032	28	28	46	46	41	41	1	0,991
223024	29	29	34	40	34	34	2	0,992

318025	28	28	45	45	41	50	1	0,990
609007	28	28	54	54	42	57	1	0,974
701050	27	27	45	45	40	40	1	0,990
808078	28	28	34	40	34	34	2	0,971
623011	27	27	54	54	43	58	1	0,913
706031	28	28	45	45	42	42	1	0,991
726043	27	27	29	29	45	45	Intermedia	0,744(1)/0,256(2)*
902027	28	28	45	45	42	42	1	0,991
902028	28	28	45	45	42	42	1	0,991
805067	23	34	30	30	36	36	2	0,899
808077	28	28	46	46	41	50	1	0,990
927055	27	27	54	54	47	47	1	0,976
1007019	29	29	34	40	33	33	2	0,991
1025008	28	28	51	51	52	52	2	0,964
1111008	22	28	46	46	40	40	1	0,912
1125009	28	28	46	46	41	41	1	0,991
1125024	28	28	47	47	41	41	1	0,983
125003	28	28	46	46	49	49	1	0,989
125002	27	27	45	45	46	46	1	0,951
215013	22	29	51	51	38	55	2	0,990
323019	22	28	28	28	35	35	2	0,970
316020	27	27	45	45	42	42	1	0,992
411012	29	29	55	55	54	54	2	0,992
322001 L	27	27	46	46	42	42	1	0,992
322001 R	22	29	51	51	56	56	2	0,991
426009	28	28	46	46	41	41	1	0,991
504033	28	28	60	60	45	51	1	0,894
516011	28	28	29	29	48	48	Intermedia	0,563(1)/0,437(2)*



<b>531010</b>	27	27	45	45	41	41	1	0,992
<b>605034</b>	28	28	30	30	11	13	Intermedia	0,556(1)/0,444(2)*
<b>613016</b>	22	29	67	67	46	46	2	0,982
<b>719017</b>	29	29	33	33	34	34	2	0,991
<b>725012</b>	27	27	30	30	11	13	Intermedia	0,627(1)/0,373(2)*
<b>712015</b>	27	27	46	46	41	41	1	0,992
<b>410002</b>	22	29	52	52	40	58	2	0,972

Los alelos se expresan en número de repetidos.

Alelos nuevos para *C. parapsilosis*.

\* El número entre paréntesis indica a que subpoblación corresponde la probabilidad.