



Utilidad de la amplificación aleatoria de ADN en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

Rocío Alonso-Vargas, Javier Garaizar¹, José Pontón y Guillermo Quindós

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología y ¹Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

Resumen

Candida dubliniensis es una especie recientemente descrita y estrechamente relacionada con *Candida albicans*. La separación de ambas especies por los métodos micológicos convencionales no es sencilla, razón por la cual numerosos investigadores han recurrido a técnicas relacionadas con el ADN para la correcta identificación de *C. dubliniensis*. En el presente estudio, proponemos el uso de la amplificación aleatoria de segmentos de ADN (RAPD) con un oligonucleótido comercial capaz de separar ambas especies. Dicho oligonucleótido, AB1-12, permitió además separar los aislamientos de *C. albicans* en cuatro genotipos diferentes entre sí y del genotipo único observado en *C. dubliniensis*.

Palabras clave

C. albicans, *C. dubliniensis*, ADN, PCR

Utility of Random Amplified Polymorphic DNA in the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*

Summary

Candida dubliniensis is a recently described species closely related to *Candida albicans*. Since the discrimination between both species by conventional mycological methods is not easy, many researchers have been trying DNA-related techniques in order to identify *C. dubliniensis* correctly. In this study, we propose the use of the random amplification of polymorphic DNA (RAPD) with a commercialized short primer which discriminates between both species. This oligonucleotide, AB1-12, allowed also separating *C. albicans* isolates into four different genotypes. These genotypes were different from the unique genotype observed in *C. dubliniensis*.

Key words

C. albicans, *C. dubliniensis*, DNA, PCR

Los métodos de estudio del ADN genómico o extracromosómico se han convertido en una de las herramientas de mayor interés para la tipificación de hongos patógenos [1,2]. Dentro de estos métodos, una técnica de gran utilidad es la amplificación de segmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Williams *et al.* [3] y empleada por múltiples investigadores con *Candida albicans* y otras especies del género *Candida*. La PCR es una técnica sencilla y rápida que puede ir dirigida tanto a la amplificación específica como aleatoria (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) de segmentos de ADN.

Candida dubliniensis es una especie descrita recientemente por Sullivan *et al.* [4] asociada a la colonización e infección de la cavidad oral de personas infectadas por el VIH [5]. Esta especie presenta características fisiológicas (ausencia de crecimiento a 45°C, producción de clamidosporas, asimilación de fuentes de carbono) diferenciales con *C. albicans*, especie que es difícil de separar de *C. dubliniensis* por los métodos micológicos convencionales. También se ha descrito la existencia de aislamientos de *C. dubliniensis* resistentes a algunos antifúngicos, como el fluconazol [6,7], hecho que ha genera-

Dirección para correspondencia:

Dr. Guillermo Quindós
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina y Odontología,
Universidad del País Vasco
Apartado 699, E-48080 Bilbao, España.
Tel: +34 94 6012854, Fax: +34 94 4649266;
E-mail: oipquang@lg.ehu.es

Aceptado para publicación el 18 de enero de 2000

do un gran interés por la importancia que podría tener en el fracaso terapéutico que se observa en muchos de estos pacientes. La correcta identificación de esta especie se basa en métodos genotípicos y fenotípicos, entre los que destacan la hibridación de fragmentos de restricción de ADN con la sonda específica de *C. albicans* 27A [4] y la inmunofluorescencia indirecta con un antisuero anti-*C. dubliniensis* [8].

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la utilidad del método RAPD en la identificación y tipificación de aislamientos de *C. dubliniensis* y *C. albicans*.

La evaluación del método se realizó empleando 36 aislamientos clínicos, entre los que se encontraban 30 *C. albicans* procedentes de 28 pacientes y seis *C. dubliniensis* de cuatro pacientes. La caracterización serológica de todos los aislamientos se realizó empleando el anticuerpo monoclonal B9E, que permite diferenciar entre los serotipos A y B de *C. albicans* al unirse a la superficie de las blastosporas del serotipo A pero no a las del B [9]. Los aislamientos se incubaron a 30°C en placas de agar glucosado de Sabouraud durante 24-48 h, extrayendo el ADN según una modificación del método de Lehman *et al.* [10]. Para la elección del oligonucleótido a emplear, se probaron en un ensayo previo un total de diez oligonucleótidos con secuencias al azar (Advanced Biotechnologies LTD, Reino Unido). Se seleccionó finalmente el oligonucleótido AB1-12, que discriminaba entre los aislamientos en función de la posición e intensidad de las bandas. En la tabla 1 se muestra la secuencia de bases de los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
AB1-01	5' GTTTCGCTCC 3'
AB1-02	5' TGATCCCTGG 3'
AB1-05	5' TGCGCCCTTC 3'
AB1-09	5' TGGGGGACTC 3'
AB1-11	5' GTAGACCCGT 3'
AB1-12	5' CCTTGACGCA 3'
AB1-13	5' TTCCCCCGCT 3'
AB1-17	5' AGGGAACGAG 3'
AB1-18	5' CCACAGCAGT 3'
AB1-20	5' GGACCCTTAC 3'

La RAPD se llevó a cabo en un volumen de 25 µl, incluyendo los siguientes reactivos y concentraciones finales: dNTPs (0,2 mM; Advanced Biotechnologies LTD), oligonucleótido (0,8 µM; Advanced Biotechnologies LTD), Taq ADN polimerasa (0,046 U/µl; Bioline, Reino Unido), MgCl₂ (3 mM; Bioline), tampón 10x NH₄ (1x; Bioline), ADN (0,4 ng/µl). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Linus (Teknovas, España) con las condiciones de amplificación siguientes: un ciclo de 94°C (4 min.), 40 ciclos de 94°C (1 min.), 36°C (1 min.) y 72°C (2 min.), un ciclo de 72°C (10 min.) y, finalmente, un ciclo de 30°C (30 s).

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2% con tampón TBE 0,5x (Tris 44,5 mM - ác. bórico 44,5 mM - EDTA 1 mM [pH 8,0]). Al gel sin polimerizar se le añadió bromuro de etidio (0,3 µl/ml) para la posterior visualización de las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 123 pares de bases (pb) (Sigma, EE.UU.). Las muestras se hicieron correr a un voltaje constante de 75 V con una fuente BioRad (EE.UU.) durante dos horas

y media antes de la lectura de las bandas. Las fotografías de los geles se sacaron con cámara Polaroid y película 667 en blanco y negro (Polaroid, EE.UU.).

Para el análisis de semejanzas de los perfiles electroforéticos obtenidos con el oligonucleótido AB1-12, las fotografías de los geles fueron escaneadas por densitometría y analizados los perfiles con el programa informático GelCompar® ver. 4.0 (Applied Maths, Bélgica). La comparación y normalización de los geles se realizó por análisis de los marcadores de peso molecular presentes en cada gel. Para calcular la semejanza entre los perfiles y las distancias genéticas entre los aislamientos se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson y se trazó el dendrograma usando el agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

El examen visual de los perfiles permitía distinguir cinco diferentes, a los que se denominaron A, B, C, D y E, en base a la posición e intensidad de las bandas. Estos perfiles mostraban entre cuatro y seis bandas de mayor intensidad y un número menor de bandas menos intensas, con un rango de peso molecular entre 150 y >1000 pb. La presencia o ausencia de las bandas (una o dos) de peso molecular cercano a 500-550 pb establecían las diferencias entre los perfiles A, B, C y D. El perfil E era manifiestamente diferente del resto de los perfiles encontrados en la posición de las bandas (Figura 1).

En la figura 2 se muestra un dendrograma de semejanza de estos cinco genotipos o perfiles electroforéticos después de haber empleado el programa informático GelCompar® 4.0 (la semejanza entre los aislamientos se obtiene de la comparación densitométrica de un análisis completo de cada perfil y no únicamente de la presencia o ausencia de bandas). Los perfiles A, B, C y D presentaban una semejanza del 45% y agrupaban a los aislamientos de *C. albicans*, mientras que el perfil E, que agrupaba a los aislamientos de *C. dubliniensis*, tenía una semejanza del 5% con los otros perfiles observados. En la figura 3 se muestran todos los perfiles electroforéticos obtenidos con los 36 aislamientos estudiados. Los seis aislamientos de *C. dubliniensis* están representados en las calles 1 a 6.

El análisis computerizado permitía establecer subdivisiones dentro de estos genotipos y al situar el nivel de semejanza en el 75% se obtuvieron siete grupos, cinco pertenecientes a los aislamientos de *C. albicans* (con los genotipos o perfiles visuales A, B, C y D) y dos a los de *C. dubliniensis* (dentro del genotipo o perfil visual E), donde los dos aislamientos de un paciente quedaron en uno de los grupos y los cuatro aislamientos de tres pacientes en el segundo. Por otro lado, dos aislamientos de *C. albicans* de un paciente quedaron separados en grupos distintos al detectar el programa informático intensidades diferentes en una banda de peso molecular entre 615 pb y 738 pb.

Los aislamientos de *C. albicans* del serotipo B se agrupaban mayoritariamente en el genotipo denominado B. Dicho genotipo agrupaba a diez de los once aislamientos del serotipo B (90,9%) y a ocho de los 25 aislamientos del serotipo A (32%, $p=0,0015$). Este genotipo B obtenido por lectura visual de los geles estaba formado por dos grupos, B1 y B2, cuando la lectura se realizaba con la ayuda del programa informático. El grupo B1 era menos homogéneo puesto que estaba formado por cuatro aislamientos del serotipo B y seis del serotipo A. Sin embargo, el genotipo B2 comprendía seis aislamientos del serotipo B y dos del A ($p=0,0078$). Así pues, el serotipo B de *C. albicans* mostró, genotípicamente, una mayor homogeneidad que el serotipo A, hecho que concuerda con lo observado por del Castillo *et al.* [11]. Esto puede explicarse porque el seroti-

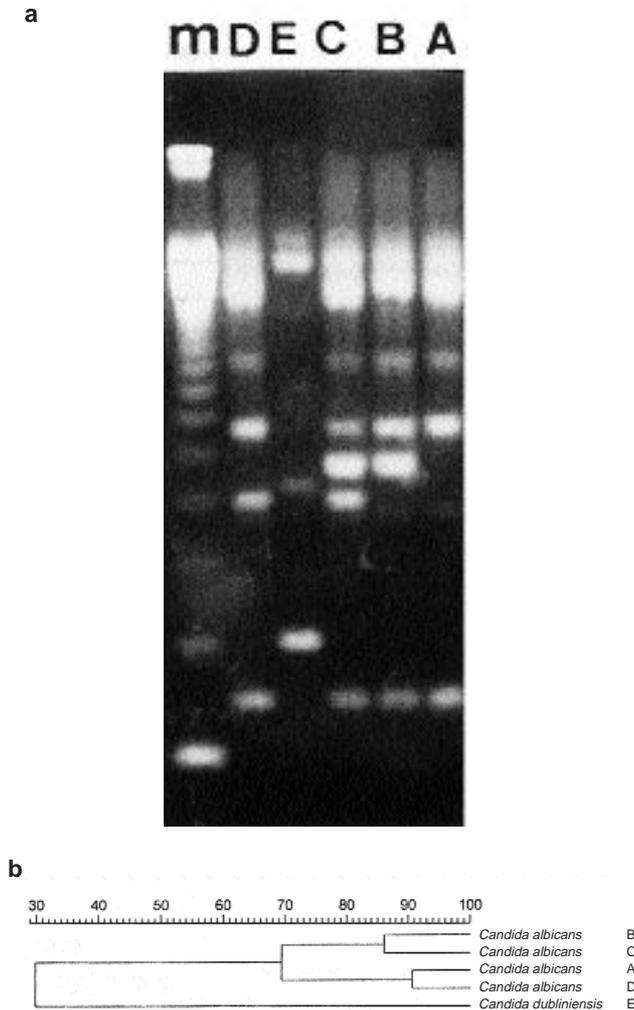


Figura 1. a) Diferentes perfiles de amplificación RAPD de *C. albicans* (A, B, C y D) y *C. dubliniensis* (E) seleccionados visualmente en base a las diferencias de intensidad y/o posición de las bandas. m = marcador de peso molecular (123 pb). b) Dendrograma por análisis computarizado aplicando el coeficiente de correlación de Pearson y el agrupamiento UPGMA, de las semejanzas entre los diferentes perfiles RAPD (A - E) obtenidos con el oligonucleótido AB1-12 de los aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

po A de *C. albicans* incluye la mayoría de los aislamientos de dicha especie (74,4%), además de los de la especie *C. dubliniensis*. Estos resultados deben confirmarse con un número mayor de aislamientos debido a que la técnica de amplificación aleatoria de ADN puede presentar cierta variabilidad. Los genotipos A y C estaban constituidos por diez aislamientos del serotipo A y uno del B, mientras que el genotipo D incluía un único aislamiento con serotipo A.

La amplificación aleatoria por PCR no produce una colección aleatoria de amplificadas del ADN, sino que su nombre está relacionado con la utilización de oligonucleótidos cortos cuya secuencia de bases se ha determinado al azar pero que selecciona fragmentos de ADN de una manera característica y repetitiva [10]. La técnica de amplificación de ADN mediante oligonucleótidos arbitrarios permite detectar variaciones en los genotipos microbianos, es fácil de realizar, tiene un coste reducido y tecnológicamente es asequible a la mayoría de los laboratorios de microbiología. Con una adecuada selección de oligonucleótidos sería posible tanto la identificación a nivel de especie como la realización de subdivisiones en la misma, en grupos, clones o cepas.

En nuestro estudio, todos los aislamientos de

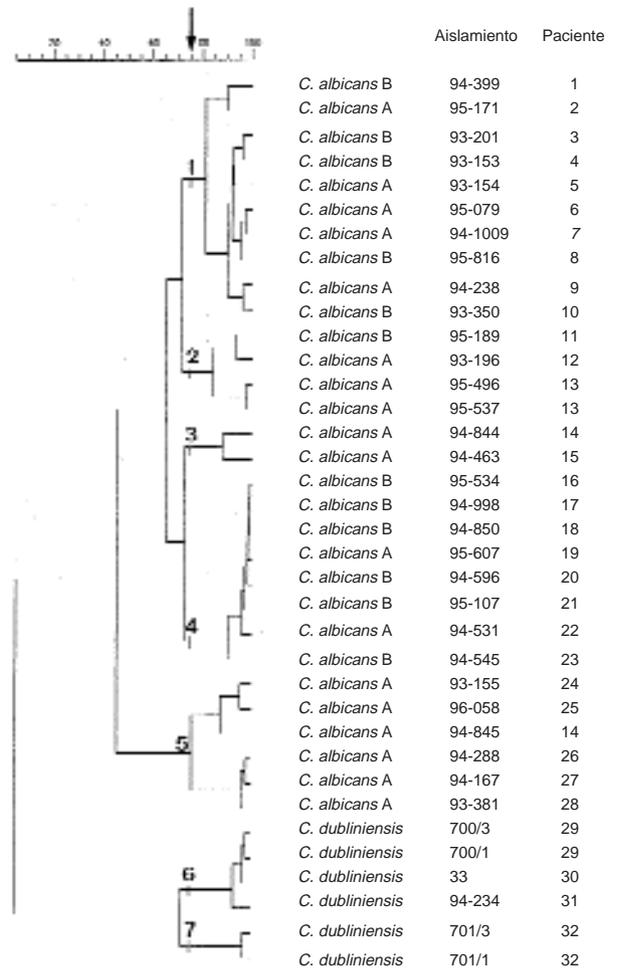


Figura 2. Dendrograma por análisis computarizado aplicando el coeficiente de correlación de Pearson y el agrupamiento UPGMA, de las semejanzas entre los perfiles RAPD obtenidos con el oligonucleótido AB1-12 de los aislamientos de *C. dubliniensis* y *C. albicans*. A - E = perfiles asignados por análisis visual.

C. dubliniensis se agrupan en el genotipo denominado E. Sullivan *et al.* [4] propusieron esta nueva especie al encontrar determinados aislamientos de *C. albicans* con características fenotípicas y genotípicas diferentes de las esperadas. Las diferencias genómicas observadas entre estos aislamientos y cepas de referencia de *C. albicans* (serotipos A y B) y la variedad *stellatoidea* de *C. albicans* eran evidentes por métodos de cariotipificación en campo pulsado, polimorfismo de ADN con enzimas de restricción y análisis del polimorfismo de fragmentos amplificadas de ADN (PCR). Los estudios filogenéticos realizados por estos autores con amplificaciones del ARN ribosómico de esta especie y de especies relacionadas, han demostrado que hay una semejanza casi absoluta entre las cepas de *C. albicans* y *C. albicans* variedad *stellatoidea* empleadas. *C. dubliniensis* tiene una divergencia del 2,25% en la secuencia de nucleótidos con *C. albicans* variedad *stellatoidea* y del 2,25 al 2,48% con otras cepas de *C. albicans*. Las diferencias con otras especies de *Candida* u otros hongos son bastante más marcadas [4].

En el presente estudio, la utilización del oligonucleótido AB1-12 ha permitido separar genéticamente los aislamientos de *C. dubliniensis* de los de *C. albicans*.

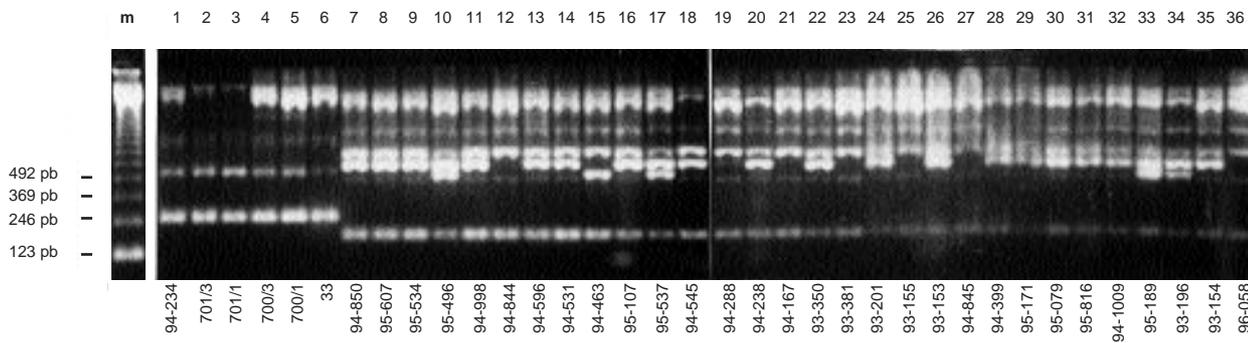


Figura 3. Perfiles RAPD obtenidos mediante amplificación con el oligonucleótido AB1-12 de aislamientos de *C. dubliniensis* (calles 1 a 6) y *C. albicans* (calles 7 a 36). m = marcador de peso molecular (123 pb).

Además, los aislamientos de *C. albicans* se agruparon en diferentes genotipos aparentemente relacionados con los serotipos A y B de esta especie. Sin embargo, la utilización de este oligonucleótido como medio para identificar

o, incluso, tipificar adecuadamente los aislamientos de *C. dubliniensis* requiere ensayar un mayor número de aislamientos de esta especie.

Rocío Alonso-Vargas es becaria predoctoral de la Universidad del País Vasco. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos 97/2052 del Ministerio de Sanidad y Consumo/Fondo de Investigación Sanitaria-Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico, modalidad C para 1997 y UPV 093.327-EC233/97 de la Universidad del País Vasco.

Bibliografía

- Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1535-1539.
- Espinel-Ingróff A, Vazquez JA, Boikov D, Pfaller MA. Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33: 231-239.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507-1521.
- Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, et al. *Candida dubliniensis*: An update. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 72-76.
- Moran GP, Sanglard D, Donnelly SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification and expression of multi-drug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1819-1830.
- Pfaller MA, Messer SA, Gee S, et al. *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 870-872.
- Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* germ tubes. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2428-2433.
- Barturen B, Bikandi J, San Millán R, et al. Variability in expression of antigens responsible for serotype specificity in *Candida albicans*. *Microbiology* 1995; 141: 1535-1543.
- Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3249-3254.
- Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindós G, Sentandreu R, Pontón J. Comparison of morphotypic and genotypic methods for strain delineation in *Candida*. *Mycoses* 1997; 40: 445-450.