

# Genotipos de *Candida dubliniensis* en aislamientos clínicos

Sonia Brena<sup>1</sup>, María del Carmen Rubio<sup>2</sup>, Ricardo Salesa<sup>3</sup>, Isabel Iglesias<sup>4</sup>, Joaquina Gil<sup>2</sup>, Antonio Rezusta<sup>5</sup>, María Dolores Moragues<sup>6</sup> y José Pontón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco; <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza; <sup>3</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Valdecilla, Santander; <sup>4</sup>Servicio Microbiología, Hospital Xeral Cies, Vigo; <sup>5</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, Universidad de Zaragoza; <sup>6</sup>Departamento de Enfermería I, EUE, Universidad del País Vasco

**Resumen** El análisis mediante PCR de las regiones ITS que flanquean el gen 5,8S ARNr ha permitido la descripción de cuatro genotipos distintos en *Candida dubliniensis*. Utilizando iniciadores que amplifican fragmentos de ADN específicos de cada genotipo, se ha estudiado la prevalencia de los genotipos en 68 aislamientos clínicos procedentes, en su mayoría, de pacientes españoles infectados por el VIH. El 97% de los aislamientos estudiados pertenecían al genotipo 1, habiéndose observado únicamente un aislamiento del genotipo 2 (1,5%) y otro del genotipo 3 (1,5%) en la cavidad oral de dos pacientes con infección por el VIH.

**Palabras clave** *Candida dubliniensis*, Genotipos, Aislamientos clínicos

## Genotypes of *Candida dubliniensis* in clinical isolates

**Summary** Amplification of specific sequences of the ITS1 and ITS2 regions and the intervening 5.8S rRNA gene has led to the identification of four separate genotypes in *Candida dubliniensis*. Using primers specific for each genotype, we have studied the prevalence of these genotypes among 68 clinical isolates, mostly from Spanish patients infected by HIV. The majority of the isolates tested belonged to genotype 1 (97%), while only one isolate each from genotypes 2 (1.5%) and 3 (1.5%) were detected in the oral cavity of two patients with HIV infection.

**Key words** *Candida dubliniensis*, Genotypes, Clinical isolates

*Candida dubliniensis* es una especie descrita recientemente que presenta una gran similitud fenotípica y genotípica con *Candida albicans* [9]. La diferenciación entre ambas especies se realiza utilizando pruebas que analizan la asimilación de hidratos de carbono [7], la temperatura de crecimiento [8], el color de las colonias en CHROMagar *Candida* [6], la producción de clamidosporas [5], las diferencias antigénicas [2] y las diferencias en la secuencia de ADN [1,10]. Utilizando una sonda de ADN específica para *C. dubliniensis*, denominada Cd25, Joly *et al.* [4] describieron dos grupos, denominados I y II, en 57 aislamientos independientes de *C. dubliniensis* procedentes de 11 países. El desarrollo de iniciadores específicos que amplifican las regiones *Internal Transcribed Spacer* 1 y 2

(ITS1 e ITS2, respectivamente) que se encuentran flanqueando la secuencia del gen que codifica para la subunidad 5,8S de RNA ribosómico, ha permitido a Gee *et al.* [3] describir cuatro genotipos distintos en *C. dubliniensis*, coincidiendo el primero de los genotipos con el grupo I descrito por Joly *et al.* [4]. En este trabajo hemos utilizado los iniciadores descritos por Gee *et al.* [3] para estudiar la distribución de los genotipos en un grupo de aislamientos clínicos de *C. dubliniensis*.

Se analizaron un total de 68 cepas de *C. dubliniensis* procedentes en su mayoría de aislamientos clínicos enviados desde hospitales españoles, siendo un pequeño número de ellas remitido desde otros países (Tabla 1). Se utilizaron como controles 21 cepas de *C. dubliniensis* y tres cepas de *C. albicans* (Tabla 2). La reacción de amplificación fue llevada a cabo con las parejas de iniciadores G1F/G1R, G2F7/G2R, G3F/G3R y G4F/G4R descritos por Gee *et al.* [3] (Tabla 3), que habían sido diseñados basándose en las diferencias observadas en la secuencia nucleotídica de las regiones ITS1 e ITS2 de cepas pertenecientes a cada uno de los cuatro genotipos de *C. dubliniensis*. La pareja G4F/G4R presenta una base *mismatch* en el extremo 3' para incrementar la especificidad en la reacción de amplificación. Cada pareja de iniciadores fue utilizada para amplificar por separado un fragmento de aproximadamente 330 pares de bases.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 50 µl incluyendo los siguientes reactivos y concentraciones finales: dNTPs (400 µM; Bioline, Reino Unido), oligonu-

### Dirección para correspondencia:

Dr. J. Pontón  
Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Facultad de Medicina y Odontología  
Universidad del País Vasco  
Apartado 699, E-48080 Bilbao, Vizcaya  
Teléfono: 94-6012855  
Fax: 94-6013400  
Correo electrónico: oipposaj@lg.ehu.es

Aceptado para publicación el 28 de enero de 2004

cleótid (400 nM; Life Technologies, Reino Unido), *Taq* ADN polimerasa (2,5 U/μl; Bionline), MgCl<sub>2</sub> (3 mM; Bionline), tampón (1x; Bionline) y ADN sin purificar de levadura. El ADN se obtuvo tocando una colonia crecida en agar de Sabouraud a 24 °C durante 24-48 h con una punta de micropipeta y resuspendiendo el contenido en la mezcla de reacción. Los ciclos de PCR para los genotipos 1, 2 y 3 incluían un paso de desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 50 °C, 20 s a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 min. En el caso del genotipo 4, la temperatura de anillamiento fue de 55 °C. La mezcla amplificada de los distintos genotipos fue separada por electroforesis en geles de agarosa al 2% (peso/volumen) y visualizada en un transiluminador de luz UV. Como marcadores de peso molecular se utilizó el DNA Molecular Weight Marker X (Roche, Alemania) (Figura).

El 97% de los aislamientos estudiados pertenecían al genotipo 1, mientras que se detectó un único aislamiento de los genotipos 2 (1,5%) y 3 (1,5%) (Tabla 1). El genotipo 2 se aisló de la cavidad oral de un paciente de Huesca infectado por el VIH y el genotipo 3 de un paciente de Bilbao infectado también por el VIH. No se observaron aislamientos del genotipo 4. Los resultados obtenidos coinciden parcialmente con los publicados por Gee *et al.* [3], ya que en su estudio detectaron un 61,4% de aislamientos del genotipo 1, pero los aislamientos del genotipo 2 representaron el 30%, los del 3 el 7,1% y los del 4 el 1,5%. Dado que el número de aislamientos estudiados en cada caso fue similar (68 vs. 70), las diferencias podrían atribuirse al diferente origen geográfico de los aislamientos, ya que en nuestro caso procedían mayoritariamente de España (95,6%; Bilbao 44,2%, Huesca 23,5%, Granada 14,7%, Vigo 7,3%, Santander 4,4%, Barcelona 1,5%) mientras que en el estudio de Gee *et al.* [3] los aislamientos procedían mayoritariamente de Irlanda, Reino Unido, Israel, Suiza, Canadá, Holanda, Alemania y Australia, y solamente se incluyeron siete aislamientos españoles.

En relación al tipo de paciente, el 94% de los aislamientos fueron obtenidos de pacientes con infección por el VIH, siendo la gran mayoría (96,6%) aislamientos orales (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los publicados por Joly *et al.* [4] y Gee *et al.* [3], en los que observaron que los aislamientos del grupo I, que incluye al genotipo 1 [3], se aislaban fundamentalmente de pacientes con infección por el VIH. De nuevo, la limitada distribución geográfica de los aislamientos estudiados en este trabajo puede haber condicionado los resultados. En tres pacientes se estudiaron más de un aislamiento (97-462, 97-463 y 97-464; 97-513 y 97-518; 99-208 y 99-209), perteneciendo todos ellos al genotipo 1.

En lo que respecta a la especificidad y reproducibilidad de la PCR, los resultados fueron excelentes. Los iniciadores demostraron ser altamente específicos, no amplificando los aislamientos de *C. albicans* y solo una de las cepas analizadas fue positiva para más de un genotipo. La reproducibilidad fue del 100%.

Los resultados de este estudio demuestran que los aislamientos españoles de *C. dubliniensis* pertenecen mayoritariamente al genotipo 1 y que es posible, y técnicamente asequible, la detección de los genotipos de *C. dubliniensis* mediante PCR para la realización de estudios epidemiológicos.

*Este trabajo ha sido financiado con los proyectos 9/UPV 0093.327-13550/2001 de la Universidad del País Vasco e IE019 ETORTEK, subproyecto Diamolfun, del Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco. Los autores desean agradecer al Dr. D. Coleman el envío de las cepas control de C. dubliniensis y a todos los colegas que han enviado las cepas de C. dubliniensis estudiadas en este trabajo.*

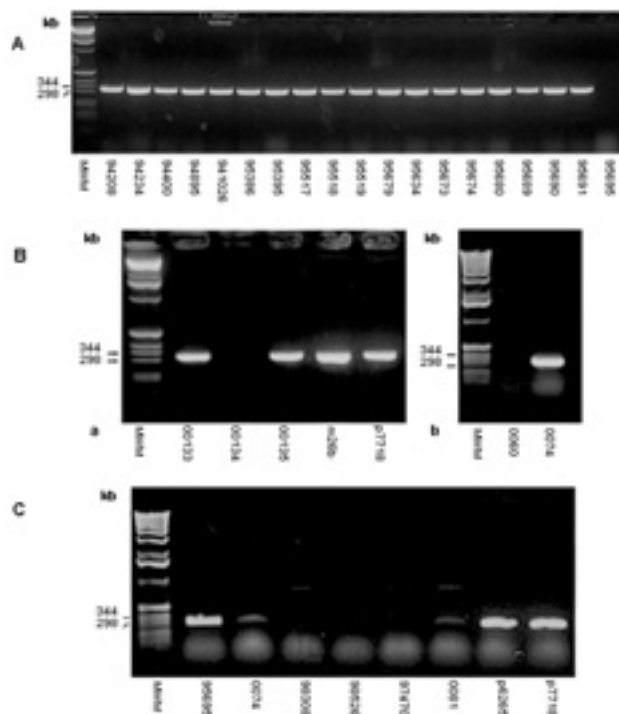


Figura. Aislamientos amplificados con la pareja de iniciadores G1F/G1R (A); aislamientos amplificados con la pareja de iniciadores G2F/G2F (B, a y b); aislamientos amplificados con la pareja de iniciadores G3F/G3R (C).

Tabla 1. Aislamientos clínicos estudiados en este trabajo.

Nº colección	Genotipo	VIH	Tipo de muestra	Origen
UPV 94-208	1	+	Oral	Bilbao
UPV 94-234	1	+	Oral	Bilbao
UPV 94-400	1	+	Oral	Bilbao
UPV 94-895	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-345	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-353	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-386	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-395	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-517	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-518	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-519	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-579	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-634	1	+	Hemocultivo	Santander
UPV 95-673	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-674	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-680	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-689	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-690	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-691	1	+	Oral	Bilbao
UPV 95-695	3	+	Oral	Bilbao
UPV 97-223	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-385	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-462	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-463	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-464	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-469	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-487	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-495	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-513	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-518	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-519	1	+	Oral	Bilbao
UPV 97-539	1	+	Oral	Granada
UPV 98-010	1	+	Oral	Granada
UPV 98-026	1	+	Oral	Granada
UPV 98-168	1	+	Oral	Granada
UPV 98-171	1	+	Oral	Granada
UPV 98-258	1	-	Oral	Granada
UPV 98-262	1	-	Oral	Granada
UPV 98-277	1	-	Oral	Granada
UPV 98-299	1	-	Oral	Granada
UPV 98-329	1	+	Oral	Turín
UPV 98-366	1	+	Oral	Turín
UPV 98-588	1	+	Oral	Barcelona
UPV 99-208	1	+	Hemocultivo	Santander
UPV 99-209	1	+	Hemocultivo	Santander
UPV 00-19	1	+	Oral	Vigo
UPV 00-20	1	+	Oral	Vigo
UPV 00-21	1	+	Oral	Vigo
UPV 00-35	1	-	Oral	Vigo
UPV 00-60	1	+	Oral	Granada
UPV 00-74	2	+	Oral	Huesca
UPV 00-75	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-76	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-77	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-78	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-79	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-80	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-81	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-82	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-83	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-84	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-85	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-86	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-87	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-88	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-89	1	+	Oral	Huesca
UPV 00-129	1	+	Vaginal	Vigo
UPV 00-209	1	+	Vaginal	Buenos Aires

**Tabla 2.** Cepas control estudiadas en este trabajo.

Nº colección	Genotipo
<i>Candida dubliniensis</i>	
CD1	1
CD33	1
CD-36	1
CD130	1
CD507	1
CD2005	1
CD2007	1
CBS8500	1
CBS8501	1
UPV 96-169	1
CD2	2
CD2006	2
CBS2747	2
UPV 96-170	2
UPV 96-171	2
UPV 96-172	2
UPV 96-173	2
UPV 96-175	2
m26b	2
p6265	3
p7718	4
<i>Candida albicans</i>	
UPV 97-470	-
UPV 98-308	-
UPV 98-526	-

**Tabla 3.** Secuencia de los iniciadores empleados en las reacciones de amplificación.

G1F: 5'-TTGGCGGTGGGCCCTG-3'	Iniciador directo genotipo 1
G1R: 5'-AGCATCTCCGCCTTATA-3'	Iniciador reverso genotipo 1
G2F: 5'-CGGTGGGCCTCTACC-3'	Iniciador directo genotipo 2
G2R: 5'-CATCTCCGCCTTACC-3'	Iniciador reverso genotipo 2
G3F: 5'-TTGGTGGTGGGCTTCTG-3'	Iniciador directo genotipo 3
G3R: 5'-GCAATCTCCGCCTTACC-3'	Iniciador reverso genotipo 3
G4F: 5'-GGCCTCTGCCTGCCGCCAGAGGATG-3'	Iniciador directo genotipo 4
G4R: 5'-AGCAATCTCCGCCTTACT-3'	Iniciador reverso genotipo 4

## Bibliografía

- Alonso-Vargas R, Garaizar J, Pontón J, Quindós G. Utilidad de la amplificación aleatoria de ADN en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 10-13.
- Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, Cebas G, Clarke M, Coleman DC, Sullivan DJ, Quindós G, Pontón J. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. J Clin Microbiol 1998; 36: 2428-2433.
- Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JFGM, Verweij PE, Polacheck I, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution *in vitro* and *in vivo*. J Clin Microbiol 2002; 40: 556-574.
- Joly S, Pujol C, Rysz M, Vargas K, Soll DR. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1035-1044.
- Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman DC, Pontón J. Casein agar: a useful medium to differentiate *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2003; 41: 1259-1262.
- Odds, FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1923-1929.
- Pincus, DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. J Clin Microbiol 1999; 37: 3533-3539.
- Pinjon, E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2093-2095.
- 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.
- Tamura M, Watanabe K, Imai T, Mikami Y, Nishimura K. New PCR primer pairs specific for *Candida dubliniensis* and detection of the fungi from the *Candida albicans* clinical isolates in Japan. Clin Lab 2000; 46: 33-40.