



Análisis SSCP (ITS2, *ERG11*) de aislamientos clínicos de *Candida* spp. de cavidad oral en pacientes oncológicos

Mónica María Díaz-López¹, Oscar Arturo Oliveros-Garay¹ y Oscar Orozco-Díaz²

¹Posgrado Interfacultades de Microbiología, Instituto de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia y ²Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia

Resumen

La terapia antimicótica profiláctica en pacientes oncológicos ha favorecido la mayor incidencia de diversas especies de *Candida*. En el presente trabajo se analizaron 32 aislamientos clínicos de *Candida* spp. de cavidad oral de pacientes oncológicos, evaluando la sensibilidad a diversos antimicóticos mediante el método de microdilución en caldo de acuerdo al documento M-27A del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). La respuesta a antimicóticos se comparó con los genotipos SSCP del gen *ERG11*, en un intento de identificar la participación de mutaciones de este gen en la resistencia a los azoles. Se encontraron tres genotipos SSCP que se distribuyen entre los aislamientos con diferentes respuestas a los antimicóticos, sugiriendo que no existen mutaciones *ERG11* en *Candida albicans* que puedan asociarse directamente con la sensibilidad a estos antifúngicos. Adicionalmente, los aislamientos se clasificaron por métodos convencionales y se evaluó su diversidad genética mediante análisis SSCP de la región ITS2, observándose la presencia de ocho genotipos. Esta técnica puede ser un método más sensible de clasificación taxonómica.

Palabras clave

Candidosis Oral, Resistencia Antimicótica, PCR-SSCP, *ERG11*, ITS2

SSCP analysis (ITS2, *ERG11*) in clinical *Candida* isolates from oral cavity in oncology patients

Summary

Antifungal prophylactic therapy in oncology patients has favors the emergence of diverse species of *Candida*. In the present study 32 clinic isolates of *Candida* spp., recovered from oral cavity, were evaluated testing their susceptibility to diverse antifungals by means of the microdilution method according with the document M-27A of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The response to antifungals was then compared with SSCP patterns of the gene *ERG11*, hoping to find mutations in this gene linked to resistance to the azole antifungals from samples of clinical origin. Three SSCP genotypes with diverse response to different antifungals were found. This study suggested that a link of mutations in the *ERG11* gene of *Candida albicans* and antifungal resistance was not supported by this data. In addition, the isolates were also classified by conventional methods and their genetic diversity evaluated by means of SSCP analysis and evaluation of their ITS2 regions, identifying eight SSCP genotypes. This technique has the potential to be a more sensitive method for taxonomic classification.

Key words

Oral candidosis, Antifungal resistance, PCR-SSCP, *ERG11*, ITS2

Dirección para correspondencia:

Dra. Mónica María Díaz-López
Laboratorio Biología Molecular
Universidad de La Sabana
Autopista Norte Km. 21
Chía, Cundinamarca, Colombia
Tel: +57 1 8615555, Ext. 2623. Fax +571 8615555 Ext. 2626
Correo electrónico: monica.diaz1@unisabana.edu.co,
mmdiaz@unal.edu.co, oaoliveros@unal.edu.co

Aceptado para publicación el 30 de septiembre de 2004

La candidosis oral es una de las infecciones fúngicas más comunes en pacientes oncológicos sometidos a tratamiento antineoplásico. El Comité Nacional para la estandarización de Pruebas de Laboratorio Clínico (NCCLS) publicó en el año de 1997 un método de microdilución (M-27A) para evaluar la sensibilidad *in vitro* a anfotericina B, flucitosina, fluconazol y ketoconazol con el fin de buscar una correlación con la respuesta [5,6,11]. El uso de esta prueba en el caso de candidosis oral y orofaríngea recalcitrante es muy útil, debido a que proporcionan información sobre las posibles fallas en los tratamientos instaurados con antimicóticos, como por ejemplo, la conformación, absorción del medicamento, interacciones medicamentosas e interacción con cambios de los microambientes de las mucosas de cavidad oral y orofaríngea [7,12]. Este tipo de candidosis puede ser causada por una sola cepa de *Candida albicans* que habría adquirido resistencia a través del tiempo [7,9,17,18]. Sin embargo, otros factores pueden estar implicados, como la resistencia intrínseca de cepas endógenas, el reemplazo por una especie más resistente (*Candida krusei*, *Candida glabrata*) [17,22] o la alteración en el tipo celular (transformación levadura/hifa, cambio en el fenotipo) [3,7]. La capacidad de adaptación genética y fenotípica de *Candida* spp. le permiten mejorar sus estrategias de supervivencia especialmente en la cavidad oral cuando la respuesta inmune es deficiente [7,18,22].

La enzima blanco de los azoles es la lanosterol 14 α -demetilasa, que inhibe la síntesis del ergosterol, alterando la estructura y funcionalidad de la membrana celular [20]. El gen que codifica esta proteína, se designa genéricamente como *ERG11* en todas las especies de hongos, aunque ha sido previamente referido como *ERG16* o *CYP51A1* en *C. albicans* [19]. Las alteraciones genéticas que han sido identificadas en *ERG11* de *C. albicans* incluyen mutaciones puntuales en la región codificante, sobreexpresión del gen, amplificación del gen (que lleva a la sobreexpresión) y conversión génica o recombinación mitótica [18-20].

El mecanismo más frecuente de resistencia incluye la reducción en la incorporación del medicamento dentro de la célula [18]. Además, se han encontrado otros mecanismos que influyen, como los cambios en la interacción del medicamento con la enzima blanco, cambios en otras enzimas en la misma vía; alteraciones en los transportadores ABC o en los facilitadores mayores de las bombas de eflujo [18,19].

El análisis de polimorfismo conformacional de banda simple (SSCP) muestra la migración de fragmentos de DNA amplificados por PCR en función de su estructura conformacional y su peso molecular; la sensibilidad de la técnica permite la diferenciación de fragmentos de DNA que presentan una mutación puntual [8,16]. En el presente estudio se aplicó la técnica de SSCP para la identificación de variantes del gen *ERG11* de *Candida* spp. provenientes de la cavidad oral de pacientes oncológicos y su posible relación con la respuesta antimicótica a los azoles que se emplean con mayor frecuencia en el tratamiento de este tipo de candidosis. Las técnicas de ribotipificación han sido usadas ampliamente para diferenciar cepas de bacterias y hongos, y para determinar su frecuencia en los brotes epidemiológicos [16]. El segmento de ADN amplificado por PCR empleando iniciadores de la región ITS2, permite distinguir posibles diferencias inter e intra-específicas que pueden asociarse a un comportamiento clínico y/o una diferente sensibilidad a los antimicóticos [16,21].

Pacientes y métodos

Pacientes. Un total de 26 pacientes oncológicos del Instituto Nacional de Cancerología (Enero de 1999 y Diciembre de 2001) con signos clínicos de candidosis oral fueron sometidos a un frotis de la zona lesionada que se inoculó inmediatamente en medio líquido de tioglicolato. Para el cultivo e identificación de aislamientos de *Candida* las muestras se sembraron en agar glucosado de Sabouraud y agar Sangre y se incubaron a 37 °C 24 h. En el momento de la siembra, se realizó un montaje con KOH y una tinción de Gram. La identificación de género y especie se llevó a cabo a partir de cultivos puros de 24-48 h, mediante las pruebas de producción de tubo germinal, producción de clamidosporas y el método de MicroScan Walk Away-96 (Dade Behring, EE.UU.). Los aislamientos se mantuvieron en tubos con agar glucosado patata (PDA) a -70 °C hasta el momento de su uso.

Estudio de sensibilidad antimicótica *in vitro*. Los siguientes antimicóticos se emplearon en este estudio: anfotericina B (AMB) (Fungizone, Bristol-Myers, Squibb, EE.UU.), fluconazol (FLC) (Pfizer, EE.UU.), itraconazol (ITC) (Janssen Pharmaceutica, EE.UU.) y ketoconazol (KTC) (Janssen Pharmaceutica, EE.UU.). El estudio de la sensibilidad antimicótica *in vitro* fue realizado de acuerdo a las normas establecidas en el documento M-27A del NCCLS [6]. Se utilizaron como controles las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 de la American Type Culture Collection [6,9].

PCR. Para la extracción de ADN, las muestras fueron lisadas según el método previamente descrito [16]. Los productos de PCR de ITS se obtuvieron bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94 °C por 5 min, 30 ciclos de: 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 90 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los iniciadores utilizados fueron: ITS3: 5'GCATCGATGAAGAACGCAGC3' e ITS4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' [11,16].

Para el diseño de los iniciadores del gen *ERG11*, se buscaron en el GenBank las secuencias depositadas para este gen de *Candida* y mediante Clustal W [15] se alinearon varias secuencias (AF153850, AF153849, AF153848, AF153847, AF153846, AF153845, AF153844, CDU012573, AB006856, AB006855, AB006854, CGP450L, CAERG16). Los iniciadores diseñados, fueron: ERG11-F: 5'GGAACTCTTAGAATGCATATGCCA3' y ERG11-R: 5'GCTGGTTC AGTAGGTAACCACCA3' [1]. Para los iniciadores ERG11 se establecieron las siguientes condiciones de amplificación: una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de: 94 °C por 30 s, 45 °C por 45 s y 72 °C por 45 s, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

SSCP. Al protocolo convencional [8] se le realizaron algunas modificaciones con el fin de obtener la mayor resolución posible de las variantes: (i) Los productos de PCR fueron purificados antes de ser sometidos al análisis de SSCP, (ii) Calentamiento de la muestra por 15 min a 94 °C y enfriamiento en hielo por 15 min [14], (iii) Las bandas de ADN fueron separadas en gel no desnaturalizante de poliacrilamida (39:1, acrilamida: bis) al 10% para el caso de ITS2 y al 12% para ERG11, debido a que estudios previos sugieren que las concentraciones altas de poliacrilamida aumentan el poder de resolución de la técnica [13], (iv) La electroforesis se realizó en una cámara miniprotean a 10 °C con circulación de agua, empleando tampón TBE y un voltaje constante de 110 V durante 9 h para los productos PCR ITS, y un voltaje constante de 90 V y 15 h para los productos PCR ERG11. El gel se reveló por la técnica de nitrato de plata [2].

Resultados

Se estudiaron 32 aislamientos de *Candida* spp. procedentes de 26 pacientes: 21 fueron aislamientos únicos, cuatro dobles aislamientos (lesiones clínicas con diferente aspecto macroscópico o con localizaciones diversas) y en un solo caso se obtuvieron tres aislamientos diferentes.

Los 32 aislamientos se clasificaron como S (susceptible), R (resistente), SDD (sensible dependiente de la dosis) y S* (crecimiento *trailing*), que se reporta como sensible (Figura 1). La evaluación de respuesta a AMB mostró 29 aislamientos sensibles y tres resistentes. Con el ITC se reportó resistencia en 14 aislamientos, sensibilidad dependiente de la dosis en un aislamiento y sensibilidad en 17 aislamientos; con el KTC se encontró una resistencia en tres aislamientos, sensibilidad dependiente de la dosis en dos aislamientos, y sensibilidad de 27 aislamientos. Con el FLC se reportó una resistencia en cinco aislamientos, sensibilidad dependiente de la dosis en tres aislamientos, y sensibilidad en 24 aislamientos.

La evaluación SSCP del producto de PCR del gen *ERG11* mostró tres genotipos (Figura 2A), cuya distribución de frecuencias se presenta en la tabla 1. La variante más frecuente es el tipo A, en donde encontramos la mayoría de los aislamientos sensibles a los azoles (10/20); así mismo, este genotipo es presentado por las cepas ATCC evaluadas en el presente estudio, incluyéndose *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*), una especie para la cual no se ha informado la secuencia del gen *ERG11*.

Con la técnica PCR-SSCP se realizó una identificación de los ribotipos en la muestra estudiada (Figura 2B), encontrándose ocho genotipos diferentes del producto de PCR de ITS2. La identificación y frecuencia de los genotipos exhibidos por los aislamientos son presentadas en la tabla 2. El genotipo A fue el de mayor frecuencia (18 aislamientos clínicos y cepa ATCC 64548 de *C. albicans*), el B se encontró en cuatro aislamientos clínicos y el E en tres. Los genotipos C, D y E se observaron en dos aislamientos cada uno. El C correspondió a dos aislamientos de *C. tropicalis*; el genotipo E se observó en la cepa ATCC 6258 de *C. krusei* y el genotipo H se asoció con la cepa ATCC 22019 de *C. parapsilosis*. Finalmente, el genotipo G se observó en un aislamiento. Los aislamientos pertenecientes a los genotipos A, B, D, F y G fueron identificados como *C. albicans* mediante las técnicas convencionales empleadas.

Discusión

Se ha propuesto que la candidosis oral y orofaríngea es mixta, siendo *C. albicans* la única especie patógena. Las otras especies son colonizadoras y se consideran un índice indirecto del consumo de azoles del paciente [5]. La elucidación de los mecanismos de resistencia antimicótica puede ser relevante para el tratamiento de la enfermedad. La búsqueda de mutaciones puntuales en genes regulatorios de la respuesta a los azoles, puede servir para identificar los mecanismos de resistencia a antimicóticos [3,5,16,18]. En este sentido, se han identificado por PCR-SSCP mutaciones puntuales en el gen *ERG11* de aislamientos de *C. albicans* que están asociadas a resistencia a los azoles [18,20]. El presente estudio muestra que los aislamientos con resistencia a ITC, KTC y FLC no exhiben un patrón específico de SSCP del gen *ERG11*, hecho que sugiere que el fenotipo de resistencia a azoles es el resultado de mutaciones o sobreexpresión de los varios genes implicados en la respuesta a estos fármacos, siendo *ERG11* uno de ellos. Por lo tanto la evaluación del polimorfismo de otros genes

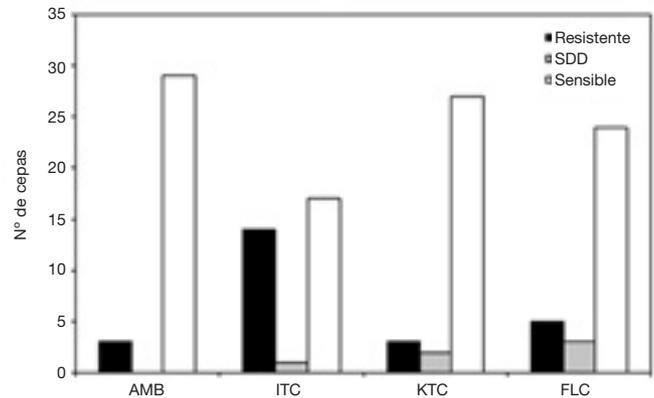


Figura 1. Sensibilidad antimicótica en aislamientos clínicos de candidosis oral. Medicamentos evaluados: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) y ketoconazol (KTC).

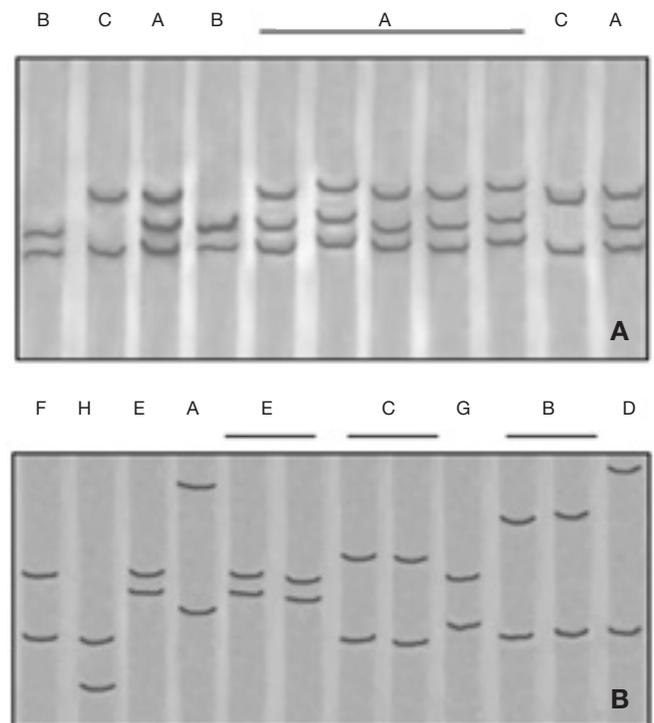


Figura 2. Análisis SSCP de productos de PCR en aislamientos clínicos de *Candida* spp., obtenidos con iniciadores: A. ERG11: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, tinción de nitrato de plata. B. ITS-3, ITS-4 para la región ITS2: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, tinción de nitrato de plata.

involucrados podría aportar una mayor discriminación de cambios nucleotídicos asociados a una respuesta de resistencia. El efecto *trailing* es definido como la inhibición parcial del crecimiento de las levaduras sobre un rango extendido de concentraciones de antimicóticos, presentándose como un cambio en el crecimiento in vitro en aislamientos reportados como sensibles a las 24 h pero resistentes a las 48 h [9]. No han sido informados cambios nucleotídicos asociados a tal comportamiento o si se trata de la selección in vitro de una subpoblación que inicialmente era minoritaria en el paciente. En el presente estudio se observó que los aislamientos con efecto *trailing* se distribuyeron en tres genotipos SSCP identificados para el gen *ERG11* (Tabla 1) que pertenecen a cepas de *C. albicans* (9 de 10 de los aislamientos) y *C. tropicalis* (un aislamiento). La metodología M-27A permite determinar la

Tabla 1. Distribución de genotipos SSCP del gen *ERG11* de aislamientos de *Candida* spp.

Genotipo	Cepas ATCC ¹	Aislamientos clínicos	Frecuencia absoluta aislamientos clínicos
A	<i>C. albicans</i> 64548 <i>C. krusei</i> 6258 <i>C. parapsilosis</i> 22019	KIF: 1, 3, 5, 6 ² , 10, 14, 15, 19, 22, 23 KF: 4, 9, 13, 16, 24, 25, 27, 29 ³ IF: 7 ² , 27 KI: 29	20
B	–	KIF: 2, 20, 32 KF: 8, 12, 30 ³ , 31 KI: 17	8
C	–	KIF: 28 KF: 18, 21 KI: 11	4

KIF: Sensibles a todos los azoles (KTC, ITC y FLC); IF: Sensibles a ITC y FLC; KF: Sensibles a KTC, FLC; KI: Sensibles a KTC e ITC.

1: Controles positivos; 2: Aislamientos de *C. tropicalis*; 3: Aislamientos de *C. krusei*; los demás aislamientos clínicos pertenecen a la especie *C. albicans*. Los aislamientos subrayados presentaron efecto *trailing*.

Tabla 2. Distribución de genotipos SSCP de la región ITS de aislamientos de *Candida* spp.

Genotipo	Cepas ATCC ¹	Aislamientos clínicos	Frecuencia absoluta aislamientos clínicos
A	<i>C. albicans</i> 64548	1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 24, 25, 31	18
B	–	21, 26, 27, 28	4
C	–	6 ² , 7 ²	2
D	–	20, 32	2
E	<i>C. krusei</i> 6258	29 ³ , 30 ³	2
F	–	3, 23, 13	3
G	–	19	1
H	<i>C. parapsilosis</i> 22019		

1: Controles positivos; 2: Aislamientos de *C. tropicalis*; 3: Aislamientos de *C. krusei*; los demás aislamientos clínicos pertenecen a la especie *C. albicans*.

sensibilidad de un solo aislamiento, pero no detecta la presencia de mezcla de aislamientos minoritarios [10] condición previamente informada en poblaciones de *C. albicans* dentro de la cavidad oral y orofaringe [5,19].

El análisis SSCP de ITS2 permitió discriminar varios genotipos y sugiere una alta diversidad dentro de *C. albicans*. Bajo la presión continua de un agente antimicótico, puede ocurrir la selección de una cepa altamente resistente [18-20]. La diversidad de aislamientos de *Candida* encontrada en el presente estudio podría ser consecuencia de la presión ejercida por los azoles. Secuenciar

los genotipos SSCP de la región ITS2 de los aislamientos podría tener importancia para poder establecer relaciones evolutivas en *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* o *C. tropicalis* mediante análisis de identidad nucleotídica y de relaciones filogenéticas.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, DIB, en el año 2001-2002. Agradecemos a Pilar Rivas Pinedo, investigadora del Instituto Nacional de Cancerología, por la asesoría en la técnica de sensibilidad a los antimicóticos.

Bibliografía

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. BLAST: Basic local alignment search tool. *J Biol Mol* 1990; 215: 403-410.
2. Beidler LL, Hilliard PR, Rill RL. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 1982; 126: 374-380.
3. Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA. Trends of antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 531-537.
4. Berrouane YF. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Bodey GP (Ed.) *Candidiasis* (2nd Ed) New York, Raven Press, 1993.
5. Bunetel L, Bonneure-Mallet M, France R. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 161-165.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard, NCCLS Document M 27-A. Wayne, NCCLS, 1997.
7. Odds FC. *Candida* and Candidosis. London, Tyndall, 1988.
8. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Seylka T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Nat Acad Sci* 1989; 86: 2776-2780.
9. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MF, Patterson TF. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 153-156.
10. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chatuverdi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-658.
11. Rex JH, Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* 2002; 35: 982-989.
12. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd Ed.). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
13. Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acid Res* 1992; 20: 6741-6742.
14. Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4009-4010.
15. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
16. Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chaanock SJ. PCR and Single-Strand Conformational Polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J. Clin Micr* 1995; 33: 3216-3220.
17. Walsh TJ. Correlation between in vitro and in vivo antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2369-2373.
18. White TC, Marr KS, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microb Rev* 1998; 11: 382-402.
19. White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1482-1493.
20. White TC. The presence of an R₄₆₇K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14a demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1488-94.
21. White TJ., Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 1990.
22. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in Oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 115-25.