



Caracterización fenotípica y molecular de *Candida africana* en una colección de aislamientos clínicos de origen genito/urinario de *Candida albicans*

Sara Alejandra Cadena Berdugo

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología
Bogotá, Colombia
2016

Caracterización fenotípica y molecular de *Candida africana* en una colección de aislamientos clínicos de origen genito/urinario de *Candida albicans*

Sara Alejandra Cadena Berdugo

Trabajo de grado para optar por el título de bacteriologa

Director:

Claudia Marcela Parra Giraldo MSc PhD



Codirector:

Andrés Ceballos Garzón Bact

Línea de Investigación: Proteómica y micosis humanas

Grupo de Investigación: Enfermeades infecciosas

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2016

Si no hay dudas no hay progreso.

Charles Darwin

Agradecimientos

A mis padres y hermanos incondicionales
siempre

A mi gran amiga y compañera de vida

A Claudia Marcela Parra directora y Andres
Ceballos codirector

Resumen

Candida es el hongo oportunista más frecuentemente encontrado causante de enfermedades nosocomiales en el ámbito hospitalario y la especie que más se relaciona con infecciones en pacientes en estado de inmunocompromiso. El género *Candida* presenta aproximadamente 200 especies las cuales deben ser identificadas correctamente para asegurar que se tomen medidas de control apropiadas y que se le da el tratamiento adecuado para cada especie. El reto que se presenta actualmente con esta levadura es diferenciar las especies atípicas emergentes como *C. dubliniensis* y *C. africana* . El propósito de este trabajo fue comparar fenotípica y molecularmente muestras tomadas de mujeres diagnosticadas con vulvovaginitis, en las cuales se identificó como microorganismo patógeno *C. albicans*, en búsqueda de especies atípicas (*C. africana*).

Abstract

Candida is the most frequently encountered opportunistic fungus causing nosocomial infections in hospitals and the species most closely related to infections in patients immunocompromised state. The genus *Candida* has about 200 species which must be correctly identified to ensure that appropriate control measures are taken and that it is given the appropriate treatment for each species.

The challenge now presented with this yeast is differentiate atypical species such as *C. dubliniensis* and *C. africana*. The purpose of this study was to compare phenotypic and molecular samples taken from women diagnosed with vulvovaginitis, in which was identified as a pathogenic microorganism *C. albicans*, in search of atypical species (*C. African*).

Contenido

Agradecimientos	v
Resumen	vii
1. Planteamiento del Problema	2
2. Marco teórico	3
2.1. Rasgos de virulencia asociados a la fase patogénica de <i>C. albicans</i>	3
2.2. Transición dimórfica como factor de virulencia	3
2.3. <i>C. albicans</i> y especies relacionadas	4
2.4. Identificación de especies atípicas	5
2.5. Candidiasis Vulvovaginal	6
2.6. Diferenciación de <i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> y <i>C. africana</i> utilizando el Gen HWP1	6
3. Objetivos	8
3.1. Objetivo general:	8
3.2. Objetivos específicos	8
4. Metodología	9
4.1. Cepas de referencia	9
4.2. Medios de cultivo Utilizados en el estudio	9
4.3. Aislamientos suministrados para el estudio	10
4.4. Reactivación de cepas de <i>C. albicans</i> de la colección	11
4.5. Evaluación de tubo germinal y formación de Clamidosporas	11
4.5.1. Evaluación de tubo germinal	11
4.5.2. formación de Clamidosporas	11
4.6. Evaluación de asimilación de azúcares	12
4.7. Identificación por espectrometría de masas y comparación global del proteoma	12
4.8. Caracterización molecular	13
5. Resultados	15
5.1. Evaluación fenotípica y bioquímica de las levaduras recuperadas	15
5.1.1. Pruebas fenotípicas	15

5.2. Evaluar el gen HWP1 de los asilamientos de <i>C. albicans</i> que exhiban características atípicas a nivel fenotípico y bioquímico.	16
5.3. Comparación de los proteomas globales de las cepas atípicas de <i>C. albicans</i> .	16
6. Discusión	24
7. Conclusiones y recomendaciones	26
7.1. Conclusiones	26
7.2. Recomendaciones	26

Lista de Tablas

2-1. Características de diferenciación entre especies relacionadas de <i>C. albicans</i>	5
4-1. Cepas de referencia utilizadas como control para todos los experimentos.	9
4-2. Medios utilizados en el estudio.	10
4-3. iniciadores específicos gen HWP1	13

Lista de Figuras

4.1. Aislamientos Clínicos	10
4.2. malditof biotyper laboratorio de proteómica y micosis humanas PUJ	13
5.1. Consolidado de resultados: pruebas fenotípicas bioquímicas y Molecular.	18
5.2. Crecimiento en CHROMagar.	19
5.3. Tubo germinal	19
5.4. Formación de clamidosporas	20
5.5. resultados trehalosa	20
5.6. electroforesis HWP1	21
5.7. Espectros de masas	22
5.8. Análisis por Multicomponentes (PCA) de las muestras establecidas como atípicas y las cepas de referencia.	23
5.9. Dendograma de las muestras establecidas como atípicas y las cepas de referencia.	23

1 Planteamiento del Problema

Candida albicans forma parte de la microbiota humana y se comporta como patógeno oportunista en pacientes en estado crítico, uno de los factores de virulencia que expresa en las primeras fases de la infección está asociado a la capacidad de hacer transición fenotípica a diferentes formas. Estos cambios son regulados multifactorialmente e incluyen variaciones en el pH, hormonas esteroideas y glucógeno entre otros. Las formas a las cuales puede transformarse son: tubo germinal, hifas, pseudo-hifas, y clamidosporas [1] estas características son estudiadas regularmente con el propósito de identificar a nivel de especie el género *Candida*. De hecho hasta hace un tiempo, en los laboratorios clínicos, se emitía el resultado de identificación como *Candida albicans* con la evaluación exclusivamente de la formación de tubo germinal, incluso su identificación llegaba hasta diferenciar *Candida albicans* de *Candida no-albicans*. Hoy en día este nivel de identificación no cubre las necesidades de los clínicos en el momento de instaurar una terapia antifúngica.

En la actualidad estamos viviendo un aumento vertiginoso de especies emergentes de *Candida*, incluso hay descripciones de procesos de especiación de *C. albicans*. La primera descripción de estos procesos de especiación, fue con la descripción de *Candida dubliniensis*, descrita en Dublín en candidiasis mucocutánea oral en pacientes con SIDA, *C. dubliniensis* tiene la capacidad de formar tubo germinal. Luego se describió *Candida stellatoidea*, hoy en día volvió a ser *C. albicans* [2] pero con un fenotipo, resistente a la anfotericina B. En 2001 fue descrita *Candida africana* en mujeres con candidiasis vulvo-vaginal recurrente. *C. africana* exhibe características atípicas que la diferencian de *Candida albicans*, hasta el momento han sido descrito: la incapacidad de formar clamidosporas, así como de asimilar tanto trehalosa como D-glucosamina, y a nivel molecular, el tamaño del gen HWP1 (hyphal wall protein 1) [1]. Más recientemente por trabajos realizados en el laboratorio de Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana, también se han encontrado cambios en proteínas citoplasmáticas, que son detectadas por MALDI-TOF MS y esto hace posible diferenciarla tanto de *C. albicans* como de *C. dubliniensis* [3]

Teniendo en cuenta este escenario, el objetivo de este proyecto fue buscar *Candida africana*, en una colección de aislamientos de origen genito/urinario identificados como *Candida albicans*, mediante el uso de herramientas tanto fenotípicas y bioquímicas, como la espectrometría de masas (MALDI-TOF.-MS) y pruebas moleculares como la detección del gen HWP1 por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) convencional.

2 Marco teórico

C. albicans es la especie más patógena dentro del género *Candida* [4]. adicionalmente es el principal agente etiológico aislado en infecciones fúngicas en humanos, y se relaciona en mayor frecuencia con infecciones a nivel de mucosas: cavidad oral y genitourinaria. Se han descrito recientemente otras especies o variantes de *C. albicans* como *C. dubliniensis* y *C. africana* las cuales han sido identificadas como patógenos causantes de candidiasis [5]

2.1. Rasgos de virulencia asociados a la fase patogénica de *C. albicans*

C. albicans como patógeno exhibe múltiples factores de virulencia que le permiten causar infección en el hospedero [6]. Dichos factores de virulencia incluyen: La transición morfológica de levadura a la formación de hifas, la expresión de adhesinas en la superficie celular, tigmotropismo, la formación de biopelículas, el cambio fenotípico y la secreción de enzimas hidrolíticas. Además, *C. albicans* muestra una rápida adaptación a las fluctuaciones en el pH del medio ambiente, flexibilidad metabólica, sistemas de adquisición de nutrientes potentes y robustos mecanismos de respuesta al estrés [7]. Estas características le permiten el paso de comensal a patógeno. Además, son rasgos que se utilizan en el proceso de identificación por el laboratorio de microbiología y donde se han encontrado las especies atípicas que posteriormente fueron descritas como *C. dubliniensis* y *C. africana*.

2.2. Transición dimórfica como factor de virulencia

C. albicans es capaz de cambiar de forma reversible entre las formas levadura, pseudohifas, y el crecimiento hifal [8])

. La capacidad de cambiar de levadura a crecimiento de las hifas es esencial para la virulencia en *C. albicans*. La superficie de la célula es el punto inicial de contacto entre el hongo y el hospedero y ambas formas morfológicas son importantes durante la infección. Es probable que su forma levaduriforme le permita diseminarse a través del torrente sanguíneo, mientras que la forma hifal es invasiva y le permite evadir las células fagocíticas, además de facilitarle la entrada y fijación a los tejidos [9].

La formación de hifas juega un papel clave en el proceso de infección, ya que puede promover

la penetración del tejido y escapar de las células del sistema inmunológico. En este proceso de formación de hifas se encuentran involucrados genes que controlan la morfogénesis y se regulan de forma conjunta con otras vías de señalización que gobiernan otros factores de virulencia, como producción de fosfolipasas, adhesinas, aspartilproteasas, adaptación a ambiente microaerofílico, entre otros. Los genes específicos Ume6 y HGC1 (G1 de hifa ciclina tipo 1) son reguladores de la transcripción de las hifas y morfogénesis; los niveles de factor de transcripción Ume6 controlan los niveles y la duración de la transcripción específica de la hifa, estudios de dosificación de Ume6 sugieren que las pseudohifas son un estado intermedio entre células de levadura e hifas. Hgc1-Cdc28 es responsable del crecimiento polarizado en las puntas de las hifas y la formación de células en cadena. Por otro lado dentro de los genes específicos de las hifas se encuentra el gen HWP1 (Hyphal Wall Protein 1), ALS3 (aglutinina proteína 3), y RBT5 (reprimida por la proteína Tup1 5) los cuales codifican para proteínas de la pared celular que son importantes tanto para la adhesión a las células como para la adquisición de hierro en el hospedero [8])

2.3. *C. albicans* y especies relacionadas

C. albicans es un hongo que ha evolucionado como un microorganismo comensal presente en aproximadamente el 80 % de la población del mundo, es una levadura diploide que carece de un ciclo sexual completo; estas características hacen que *C. albicans* sea un microorganismo altamente adaptable a una infinidad de ecosistemas. Por muchos años se han observado características especiales de esta levadura donde se ha descrito su capacidad de inducir cambios profundos en su genoma [10].

Es así como *C. dubliniensis* y *C. africana*, se proponen como variantes de *C. albicans*. También han existido equivocaciones, donde en algún momento fue descrita *C. stellatoidea* como nueva especie dentro del género *Candida* pero tiempo después siguió siendo *C. albicans*, al no reunir la suficiente evidencia para describirla como una nueva especie [10].

C. dubliniensis fue descrita desde el año 1993, en aislamientos orales atípicos de *Candida* en pacientes con VIH (virus de Inmunodeficiencia Humana), estos informes describen aislamientos recuperados de personas infectadas en Irlanda, Australia, Suiza e Inglaterra; con base en pruebas micológicas clásicas, tales como tubo germinal y la producción de clamidosporas. Se encontró que estas cepas a pesar de ser muy similares a *C. albicans* tenían algunas propiedades fenotípicas y genéticas que no eran correspondientes con su identificación definitiva. A la luz de estos resultados se sugirió que los aislamientos inusuales correspondían, ya sea a un subgrupo de *C. albicans* atípica como *C. stellatoidea*, o a una especie hasta el momento no descrita. Finalmente *C. dubliniensis* fue descrita en 1995 como la primera especie relacionada con *C. albicans*, la cual se encontraba en pacientes que presentaban VIH como enfermedad

Característica	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. africana</i>
<i>crecimiento en CHROMagar</i>	<i>verde</i>	<i>verde</i>	<i>verde</i>
<i>Producción de clamidosporas</i>	+	+	-
<i>Formación de tubo germinals</i>	+	+	+
<i>Formación de tubo germinal</i>	+	+	+
<i>Fermentación de Trehalosa</i>	+	+	-
<i>Formación de tubo germinal</i>	+	+	+

Tabla 2-1: Características de diferenciación entre especies relacionadas de *C. albicans* (+ resultado positivo, - resultado negativo)

de base y candidiasis en cavidad oral [2] .

En el año 2001 se propuso como una nueva variedad de *C. albicans*, *C. africana*, la cual pese a ser tubo germinal positivo presenta características que difieren con las presentadas por *C. albicans*, como lo es la producción de clamidosporas, fermentación de azúcares y morfología en agar sabouraud [11] . Esta especie está asociada a infecciones vaginales. *C. africana* es una levadura esférica u ovoide de 3 – 5 a 2 – 7 μ , presenta pseudomicelio en algunos aislamientos después de 3-10 días de incubación, no produce clamidosporas, forma tubo germinal en fresco, su crecimiento es lento a 30 °C y a 37 °C , las colonias en agar sabouraud son de color crema, suaves, lisas y no presentan bordes miceliales. Son capaces de asimilar 2-keto-gluconate, D-xylosa, glucosa, galactosa, sucrosa, maltosa, manitol y sorbitol; pero no asimilan N-acetilglucosamina, glucosamina, DL-lactato, ribosa, rhamnosa, threalosa, lactosa entre otros. Teniendo en cuenta la morfología especial y el perfil de utilización de sustratos; se sugiere que este tipo de cepa representa una nueva especie [1] (Tabla 2-1) .

2.4. Identificación de especies atípicas

Las especies de *Candida* son clasificadas por sus características morfológicas principalmente formación de tubo germinal, la capacidad de formar clamidosporas, utilización y fermentación de diferentes fuentes de carbono y crecimiento en chromagar. Debido a que *C. dubliniensis* y *C. africana* comparten muchas características con *C. albicans*; se hace necesaria la aplicación de pruebas que permitan una correcta identificación de estas. Ya que cada una difiere con la otra en ciertos aspectos, la aplicación de pruebas como cultivo en chromagar *Candida*, la observación de formación de clamidosporas y la capacidad de formar tubo germinal, así como la fermentación de ciertos azúcares; son pruebas fenotípicas y bioquímicas que ayudan a dirigir la identificación del microorganismo, sin embargo, no son suficientes para llegar a un resultado preciso de especie y género del microorganismo en cuestión. Es por esto que adicionalmente a las pruebas de laboratorio convencionales que se realizan, es necesaria la

aplicación de técnicas más sensibles y específicas como la biología molecular y el uso de identificación por espectrometría de masas.

2.5. Candidiasis Vulvovaginal

Es una infección causada por diferentes especies de *Candida* y se caracteriza por presencia de prurito vulvar y vaginal, con presencia de secreción blanquecina, grumosa, que cubre la vulva y las paredes de la vagina, además con prurito y edemas difusos [12] .

Las levaduras pertenecientes al género *Candida* son organismos oportunistas que causan candidiasis vaginal que tiene una alta frecuencia, sin embargo, por su difícil tratamiento se ha convertido en un problema a nivel sanitario y epidemiológico. [13].

Se sabe que cerca de 75 % de las mujeres pueden llegar a tener un episodio de infección vaginal durante su vida y, de ellas la mitad presentan, al menos dos o tres episodios infecciosos en un año. Se estima que 15 % de las mujeres sin factores predisponentes conocidos podrían tener episodios repetitivos en los tres meses siguientes al tratamiento [14] .

Cuando se diagnostican más de 4 episodios de candidiasis a lo largo de un año, se establece que es una candidiasis vulvovaginal recurrente y esto ocurre en el 5 % de los casos donde la enfermedad se vuelve crónica. *C. albicans* es la especie principal que causa vaginitis en un porcentaje que va desde 70 % y 90 % [15] *C. africana* se considera patógeno emergente asociada a candidiasis vulvovaginal recurrente.

2.6. Diferenciación de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* utilizando el Gen HWP1

Aunque entre *C. albicans* y *C. africana* existen algunas diferencias fenotípicas mencionadas anteriormente, la identificación de *C. africana* se dificulta en el laboratorio debido a que las diferencias entre estas son muy pequeñas y las pruebas utilizadas convencionalmente en el laboratorio no son muy sensibles; lo cual conlleva a dar resultados positivos para *C. albicans* cuando se trata de *C. africana*. Una de las diferencias que puede ayudar a que las especies de esta levadura sean identificadas correctamente es el gen HWP1

HWP1 es un gen que codifica para una proteína expuesta en la superficie celular, que expresa el desarrollo de tubo germinal y ciertas hifas de *C. albicans*. Esta proteína actúa como un sustrato para las transglutaminasas de los mamíferos, permitiendo el entrecruzamiento *C.*

2.6 Diferenciación de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* utilizando el Gen HWP17

albicans a células epiteliales [16] . En la actualidad los métodos moleculares diagnosticos como la PCR (polymerase chain reaction) del gen HWP1 o secuenciación de la región de espaciador transcrito interno 2 se pueden utilizar para lograr una identificación definitiva de *C. africana* [17] . Ya que ha sido reportado como el indicado para la diferenciación de *C. albicans*, *C. africana* y *C. dubliniensis*.

La técnica de PCR es una reacción enzimática in vitro que permite amplificar fielmente millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, utilizando unos iniciadores o primers específicos para la fracción que se quiere amplificar. Para el caso de la amplificación del gen HWP1 se utilizaran los primers descritos por (Romeo, Criseo 2008) [16].

3 Objetivos

3.1. Objetivo general:

Identificar cepas de *C. africana* en una colección de cepas clínicas de origen genito/urinario de *C. albicans* del laboratorio de Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípica y Bioquímicamente cepas conservadas como *C. albicans* de origen vulvovaginal de la colección de hongos clínicos del laboratorio de micosis humanas.
- Evaluar el tamaño del gen HWP1 en cepas atípicas de *C. albicans* que exhiban características atípicas a nivel fenotípico y bioquímico.
- Comparar los proteomas globales de las cepas atípicas y típicas de *C. albicans*.

4 Metodología

4.1. Cepas de referencia

Las cepas de referencia utilizadas en este trabajo se detallan en la(Tabla 4.1). Como cepas de referencia se utilizaron 5 cepas ATCC de diferentes especies de *Candida*; dentro de las que se encuentran cuatro *C. africanas*, dos *C. albicans*, una *C. dubliniensis* y una *C. glabrata*.

Estas cepas se utilizaron como controles en todas las técnicas realizadas a los aislamientos a estudiar.

4.2. Medios de cultivo Utilizados en el estudio

Los medios de cultivo utilizados fueron los suministrados por la casa comercial Becton Dickinson (DB); (CRHOMagar y Sabouroud dextrosa), el medio para la identificación de fermentación de trehalosa fue preparado en el laboratorio de proteómica y micosis humanas de la universidad Javeriana. Para la evaluación de formación de clamidosporas se utilizó agar maíz preparado en el laboratorio y la formación de tubo germinal se realizó en caldo BHI suministrado por una casa comercial OXOID. (Tabla 4.2)

Especie	ATCC
<i>Candida albicans</i>	SC5314
<i>Candida albicans</i>	90028
<i>Candida africana</i>	MYA 2969
<i>Candida africana</i>	CAAF 1
<i>Candida africana</i>	CAAF 2
<i>Candida africana</i>	CAAF 3
<i>Candida dubliniensis</i>	MYA 646
<i>Candida glabrata</i>	2001

Tabla 4-1: Cepas de referencia utilizadas como control para todos los experimentos.

Medio de cultivo	Composición	Utilidad
<i>CHROMagar</i>	Estandar casa comercial BD	Medio cromogenico para diferenciar especies de <i>Candida</i>
<i>Sabouroud dextrosa</i>	Estandar casa comercial BD	favorece el crecimiento de Levadura, inhibe el crecimiento de bacterias
<i>Medio líquido trhealosa</i>	300 μ de trehalosa por cada 1700 μ de agua destilada para obtener una concentración final de 5.6X	permite la observación de utilización o no del azúcar trehalosa por el microorganismo en estudio
<i>Agar harina de maíz</i>	17 g/L agar maíz, 5g/L agar agar y 3mL tween 80	diferenciar especies de <i>Candida</i> basándose en las características miceliales.

Tabla 4-2: Medios utilizados en el estudio.

4.3. Aislamientos suministrados para el estudio

Se partió de una colección de 167 muestras clínicas de origen genito/urinario conservadas en agua destilada a temperatura ambiente de mujeres atendidas en centros de salud de Chia Zipaquirá Cáqueza y Uvate, diagnosticadas con vulvovaginitis recurrente producida por *C. albicans*. Las muestras fueron suministradas por el laboratorio de Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana (Figura 4.1)

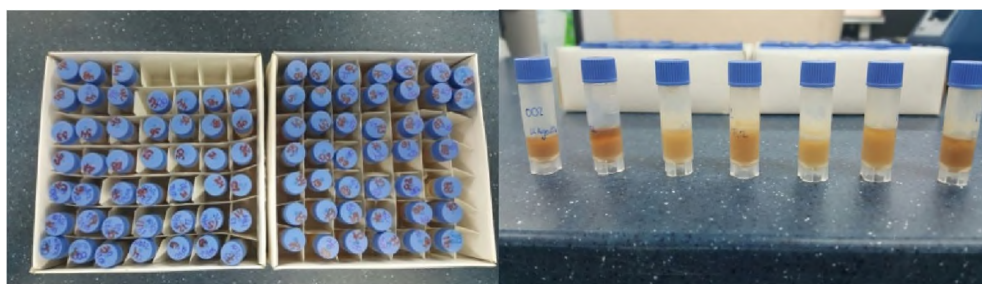


Figura 4.1: Aislamientos clínicos de origen genito/urinario de *Candida albicans*, del laboratorio de Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana, obtenidas de pacientes procedentes de Cundinamarca-Colombia.

4.4. Reactivación de cepas de *C. albicans* de la colección

A partir de los viales que contenían las muestras en agua estéril a temperatura ambiente en el laboratorio, se tomaron 0.5mL de la suspensión y se inocularon en medio líquido durante 24 horas a 35°C; con el fin de reactivar los microorganismos.

Las cepas se incubaron a 35 °C hasta que se observaba turbidez en el medio, lo que sugería crecimiento. Una vez se determinó crecimiento en el medio, se procedió a comprobar la presencia microbiana utilizando la tinción de Gram y posteriormente se cultivó en agar sabouraud-dextrosa y en agar cromogénico para *Candida*, medios provenientes de la casa comercial Becton Dickinson.

A partir de estos crecimientos se tomaron para procesar únicamente los compatibles con *C. albicans* es decir aquellos aislamientos que tuvieron crecimiento de color verde.

4.5. Evaluación de tubo germinal y formación de Clamidosporas

4.5.1. Evaluación de tubo germinal

El tubo germinal es una extensión filamentososa que presenta *C. albicans* cuando se encuentra en condiciones de temperatura y medio apropiado.

Para la evaluación de tubo germinal se llevó a incubación por 2 horas a 37°C una colonia aislada de la levadura tomada de agar sabouraud en caldo BHI (Infusión cerebro corazón), para su posterior visualización por microscopía óptica con objetivo de (40X), donde se utilizó como control positivo la cepa de *C. albicans* ATCC 90028 y como control negativo la cepa *C. glabrata* ATCC 2001

4.5.2. formación de Clamidosporas

Las clamidosporas son una estructura de membrana gruesa que le confiere resistencia a la levadura. Para la evaluación de la formación de clamidosporas se realizó cultivo de esta en medio sólido (agar harina de maíz suplementado con tween 80).

Para inducir la formación de clamidosporas se tomó una colonia aislada de agar sabouraud la cual se sembró sobre el medio de cultivo agar harina de maíz con tween 80 preparado según protocolo referenciado en la revista iberoamericana de Micología; y se llevó a incubación durante 10 días a 37°C. Pasados los 10 días de incubación se realizó la lectura por microscopía óptica con objetivo de (40X), donde se utilizó como control positivo la cepa de *C. albicans* ATCC 90028 y como control negativo la cepa *C. glabrata* ATCC 2001.

4.6. Evaluación de asimilación de azúcares

Se realizó evaluación de la asimilación de Trehalosa, para esto se utilizó el medio preparado en el laboratorio ya descrito en la (Tabla 4.2) . Se realizó una suspensión de una colonia aislada tomada de agar sabouroud dextrosa en 1 ml de suero fisiológico; a partir de esta suspensión se tomaron $25\mu\text{l}$ y se agregaron en tubos con 1 ml de medio líquido de Trehalosa. Durante tres días se realizó el seguimiento de cada una de las muestras con el fin de evaluar la asimilación del azúcar en cada uno de los tubos.

Los resultados fueron consignados teniendo en cuenta los obtenidos por las cepas de referencia en la figura 5.1 (Figura 5.5)

4.7. Identificación por espectrometría de masas y comparación global del proteoma

Se realizó la identificación de los microorganismos utilizando la tecnología MALDITOF-MS Siguiendo las especificaciones (Bruker Daltonyk GmbH, Bremen, Germany).

Procedimiento de extracción con Ácido Fórmico

En tubos eppendorf se agregaron $300\mu\text{l}$ de agua grado HPLC, al cual se transfirió una colonia grande y bien aislada del microorganismo levaduriforme, esta suspensión se llevó a vórtex hasta homogenizar completamente la muestra, a continuación se agregaron $1900\mu\text{l}$ de etanol grado HPLC, para llevar a vórtex seguido de centrifugación a 13000 rpm durante dos minutos. El siguiente paso fue decantar el etanol y centrifugar nuevamente durante dos minutos, posterior a eliminar el restos de etanol se añadieron $50\mu\text{l}$ de ácido fórmico, se llevó a vórtex y se dejó reposar durante cinco minutos, luego se agregan $50\mu\text{l}$ de acetonitrilo, se llevó a vórtex nuevamente y se centrifugó durante dos minutos. Finalmente se transfirió $1\mu\text{l}$ del sobrenadante a la placa de acero, la cual se dejó secar a temperatura ambiente, una vez se encontraba completamente seca se adicionó $1\mu\text{l}$ de MATRIX (Cyano-4-hydroxycinnamic acid), para analizarlo en el equipo MALDI-TOF (Figura 7.2).

Para el análisis de los resultados se tuvo en cuenta: los valores (score) de identificación donde los resultados obtenidos con un score $<1,7$ son asociados a una identificación poco fiable, valores $>1,7$ y $<2,0$ se asocian a la identificación a nivel de género y valores $>2,0$ son asociados a identificación a nivel de especie. Utilizando el software FlexAnalysis se realizó una comparación de los espectros de masas obtenidos a partir del análisis del proteoma global de las cepas estudiadas. Los resultados fueron consignados teniendo en cuenta los obtenidos por las cepas de referencia en la (Tabla 4.1). Adicionalmente se realizó ilustración de resultados a partir de los datos obtenidos en el espectrómetro de masas mediante un análisis de Multicomponentes y un Dendograma haciendo uso del software MALDI Biotyper 3 y Flex



Figura 4.2: malditof biotyper laboratorio de proteómica y micosis humanas PUJ

Sentido	secuencia
Forward	5-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3
Reverse	5 GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3

Tabla 4-3: iniciadores específicos gen HWP1

análisis, permitiendo apreciar las relaciones mediante agrupación de datos por similitud, que en este caso obedecen a la homología espectral de las cepas analizadas y determinadas como atípicas, figuras (5-7, 5-8, 5-9).

4.8. Caracterización molecular

Se realizó una PCR convencional para la evaluación de presencia y tamaño del gen HWP1, utilizando iniciadores específicos del gen HWP1 (Romeo Criseo, 2008) (tabla 4-3). Para esta PCR se usaron como controles las cepas de *C. albicans* SC5314, *C. dubliniensis* MYA 646, Y *C. Africana* CAAF 1, 2 Y 3.

Para la amplificación del gen se tuvo en cuenta la programación que se describe a continuación: 35 ciclos que comprendían, denaturación (94° C 10 segundos), anillaje (60° C 30 segundos) y elongación (72 °C 35 segundos).

Para visualizar los productos obtenidos por PCR, se realizaron geles de agarosa 1.5X pre-

parados con buffer TAE 1x (biorad) para la visualización de las bandas se utilizó el agente intercalante fluorescente HydraGren 1x (ACTGen). Como patrón de longitud molecular, se utilizó zymoresearch de 100 bp para comparar los fragmentos obtenidos. Los corridos electroforéticos se llevaron a cabo con un voltaje constante de 110 V POR 45 minutos, resultados evidenciados en la (figura **5.6**)

5 Resultados

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas a cada una de las cepas proporcionadas para el estudio (figura 5.1).

5.1. Evaluación fenotípica y bioquímica de las levaduras recuperadas

De las 167 cepas que se encontraban a temperatura ambiente, luego de la recuperación de microorganismos presentes en estas muestras obtuvimos: 35 con crecimiento compatible con *C. albicans*, 4 tuvieron crecimiento compatible con *C. glabrata* y de las muestras restantes no se recuperaron microorganismos. Estas 35 muestras que mostraron crecimiento típico de *C. albicans* en CHROMagar (figura 5.2) inicialmente fueron sometidas a 2 pruebas fenotípicas y una bioquímica para buscar diferenciar *C. albicans* de Candidas atípicas. Las pruebas realizadas se enuncian a continuación.

5.1.1. Pruebas fenotípicas

Formación de tubo germinal

El test de filamentación para comprobar la producción de tubos germinales, realizado en caldo BHI fue positivo para las cepas utilizadas como control positivo de *C. africana* CAFF1 Y *C. albicans* SC 5314 y fue negativo para la cepa utilizada como control negativo *C. glabrata* ATCC 2001 (figura 5.1) .

Los 35 aislamientos estudiados exhibieron la formación de tubo germinal en caldo BHI, por tal razón se tiene como resultado positivo el 100% de las cepas evaluadas.

Producción de clamidosporas

La prueba de producción de clamidosporas realizado en agar de harina de maíz suplementado con teewn 80, arrojó los siguientes resultados: Las cepas de *C. albicans* presentaron formación de clamidosporas al igual que la cepa de *C. dubliniensis*; por el contrario las colonias de *C.*

africana y *C. glabrata* no fueron capaces de formar clamidosporas (figura 5.4). Para las 35 cepas evaluadas en este estudio 25 fueron clamidosporas positivas y 10 clamidosporas negativas es decir sin capacidad de formar dichas estructuras, tras incubación a 37°C durante 10 días.

Asimilación de threalosa

Para el análisis de asimilación, los resultados fueron determinados teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los controles: positivo (*C. albicans* SC5314) y negativo (*C. africana*) (figura 5.5). De las 35 cepas evaluadas, 20 tuvieron un patrón positivo, 11 un patrón negativo y 3 un patrón variable para la asimilación de trehalosa (figura 5.1).

5.2. Evaluar el gen HWP1 de los asilamientos de *C. albicans* que exhiban características atípicas a nivel fenotípico y bioquímico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la fermentación de trehalosa y producción de clamidosporas se tomaron 22 muestras dentro de las cuales 12 fueron presuntivas de *Candidas* atípicas y otras 10 se tomaron como control. Los resultados obtenidos por la electroforesis se muestran en la (figura 5.6)

Se obtuvieron 3 cepas con bandas compatibles con el peso molecular para el gen HWP1 reportado para *C. africana* (700bp), 2 cepas con doble banda (700/900pb) y 10 cepas con bandas correspondientes a (900pb) tamaño descrito para el mismo gen en *C. albicans*.

5.3. Comparación de los proteomas globales de las cepas atípicas de *C. albicans*

Se puede observar una diferencia en los espectros obtenidos para las cepas de *C. albicans* en comparación con los obtenidos para *C. africana* y las cepas atípicas (con resultados diferentes a lo establecido para *C. albicans*, en pruebas fenotípicas, bioquímica y/o molecular).

A partir de los espectros obtenidos para las cepas evaluadas, se realizó un análisis por multi componentes y un dendograma, en el primero se observó que las cepas de referencia de *C. africana* (Rojo) y las cepas de referencia de *C. albicans* (Verde) se agruparon en lugares diferentes dentro del mismo cuadrante, *C. dubliniensis* (Amarillo) en cuadrante diferente al de las cepas de *C. albicans*, *C. africana* y para las cepas consideradas atípicas (Azul) la agrupación se observó en cuadrante diferente al de todas las anteriores (figura 5.8); en el dendograma se pudo observar la división entre las especies *C. albicans*, *C. africana* y *C.*

dublinsiensis en donde las cepas atípicas comparten origen desde mismo brazo de origen de *C. albicans* (figura 5.9).

Cepa/Muestra	MALDI-TOF MS	Pruebas Fenotípicas			Tamaño del Gen
		Tubo germinal	Formación Clamidosporas	Asimilación Trehalosa	HWP1
<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	+	-	+	No Aplica
SC 5314	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	500pb
ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
MYA 2669	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
CAAF1	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
CAAF2	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
CAAF3	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
4	<i>C. albicans</i>	+	+	-	No Aplica
6	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
7	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700/900pb
8	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
9	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
10	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700/900pb
11	<i>C. albicans</i>	+	+	-	No Aplica
12	<i>C. albicans</i>	+	-	+/-	900pb
13	<i>C. albicans</i>	+	-	+/-	900pb
14	<i>C. albicans</i>	+	-	+	900pb
15	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
16	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
17	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
19	<i>C. albicans</i>	+	+	-	No Aplica
24	<i>C. albicans</i>	+	-	-	900pb
53	<i>C. albicans</i>	+	-	-	700pb
95	<i>C. albicans</i>	+	+	+/-	No Aplica
99	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
102	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
103	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
105	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
106	<i>C. albicans</i>	+	+	+	900pb
107	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
108	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
109	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
115	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
116	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
117	<i>C. albicans</i>	+	-	+	900pb
118	<i>C. albicans</i>	+	+	-	No Aplica
119	<i>C. albicans</i>	+	+	+/-	No Aplica
120	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
121	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
123	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
160	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
167	<i>C. albicans</i>	+	+	+	No Aplica
	Figura 5.4 - 5.5	Figura 5.1	Figura 5.2	Figura 5.4	Figura 5.3

Figura 5.1: Consolidado de resultados: pruebas fenotípicas bioquímicas y Molecular.



Figura 5.2: Crecimiento en CHROMagar.

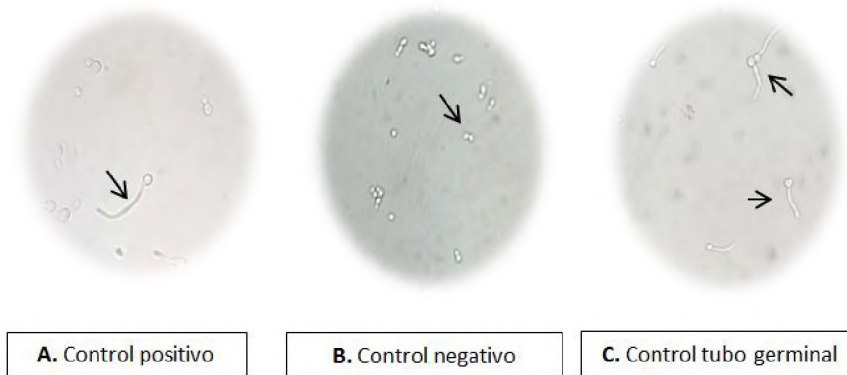


Figura 5.3: Observación microscópica a 40X de la prueba de filamentación en caldo BHI a 37 °C durante 3 h: (A) *C. albicans* ATCC 90028, (B) *C. glabrata* ATCC 2001 y (C) *C. africana* CAAF 1.

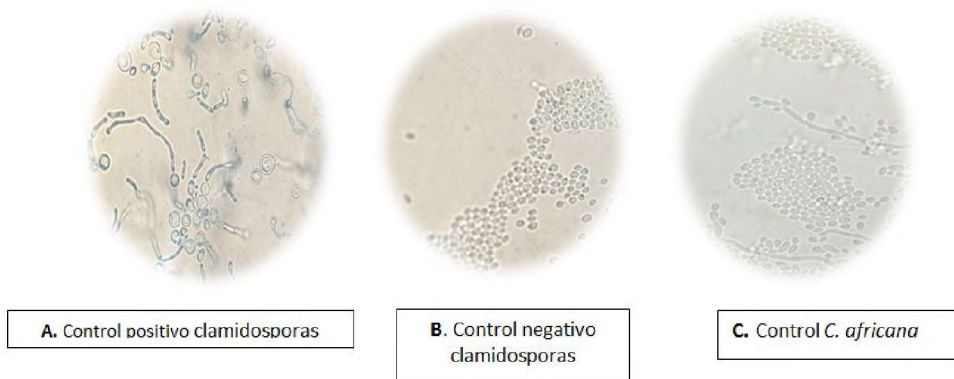


Figura 5.4: Observación microscópica en objetivo de 40X para la visualización de la formación de clamidosporas: (A) *C. albicans* ATCC 90028 (B) *C. glabrata* 2001, (C) *C. africana* Caff 2.



Figura 5.5: Resultados Asimilación de Trehalosa: *C. dubliniensis* MYA 646, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. albicans* SC 5314, *C. albicans* ATCC90028 asimilación de trehalosa positivo y para *C. africana* MYA2669, *C. africana* CAAF1 *C. africana* CAAF2, *C. africana* CAAF3 asimilación de Trehalosa negativo

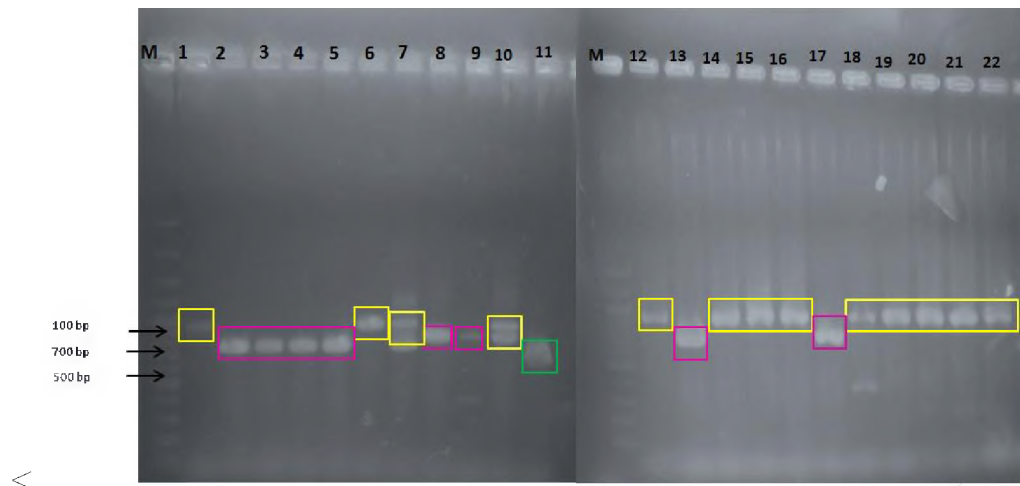


Figura 5.6: Corrido electroforético en gel de agarosa, evaluación de presencia y tamaño del gen HWP1, carril M: Marcador de peso molecular, carril 1 *C. albicans* SC5314, carriles del 2 al 4 *C. africana* CAAF 1, 2, 3, carriles del 5 al 10 cepas del estudio (6-10), carril 11 *C. dubliniensis*, Carril 12 *C. albicans* 90028, carril 13 *C. africana* CAAF1, carriles del 14 al 22 cepas del estudio(12, 13, 14, 15, 24, 53, 106, 117) (En color amarillo peso molecular aprox 900 bp, en rosado bandas con peso molecular aprox 700bp, en verde banda con peso molecular aprox 500bp).

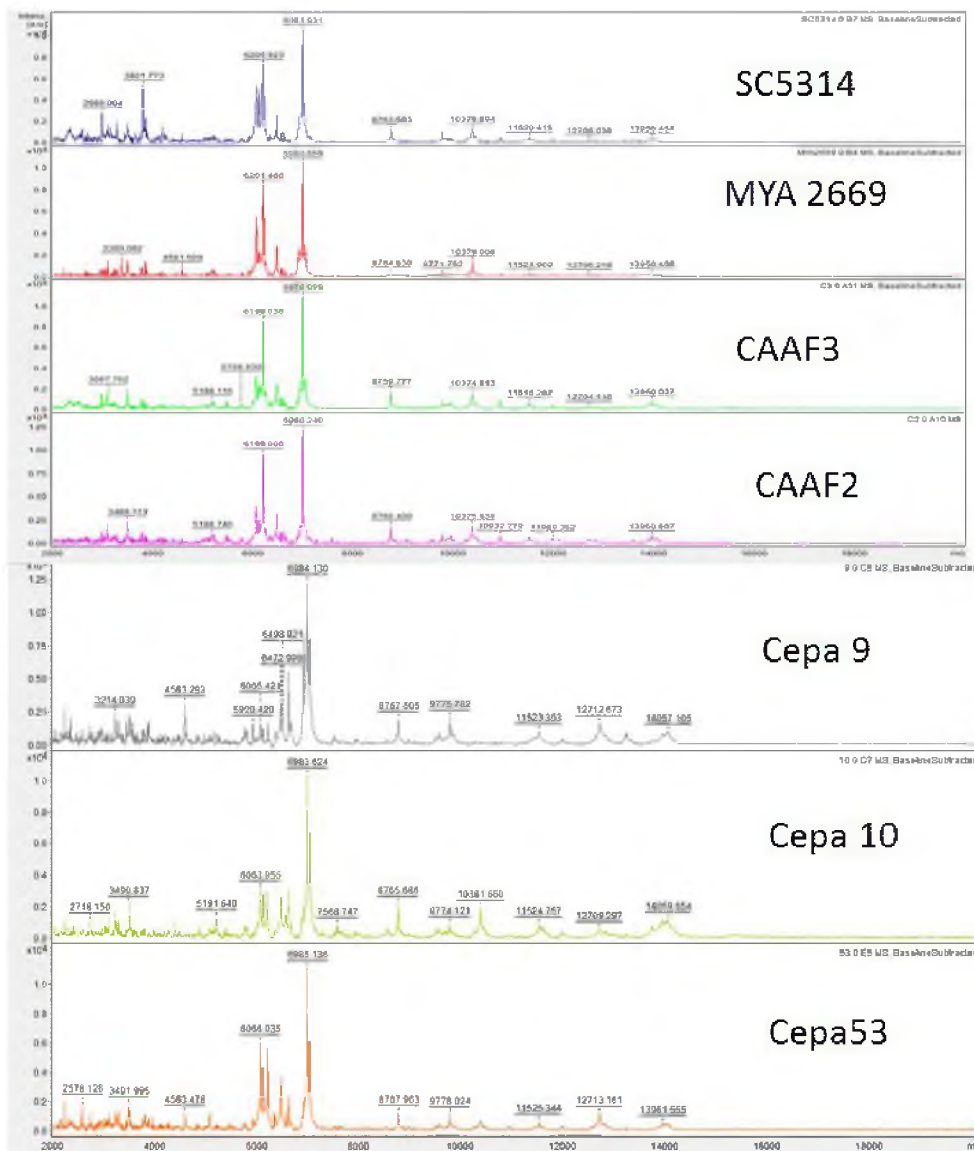


Figura 5.7: Espectros de masas: Cepas de referencia y cepas atípicas de *C. albicans*

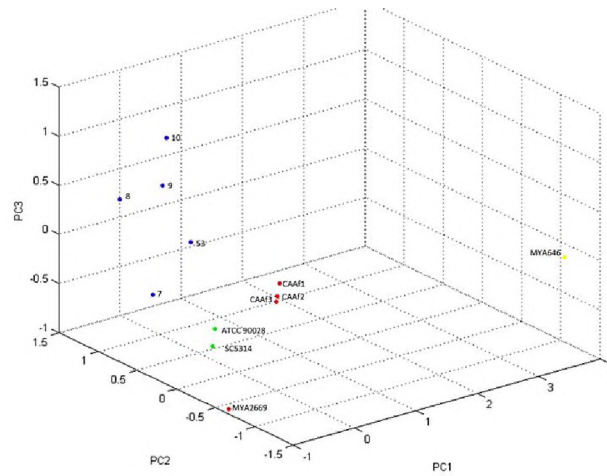


Figura 5.8: Análisis por Multicomponentes (PCA) de las muestras establecidas como atípicas y las cepas de referencia.

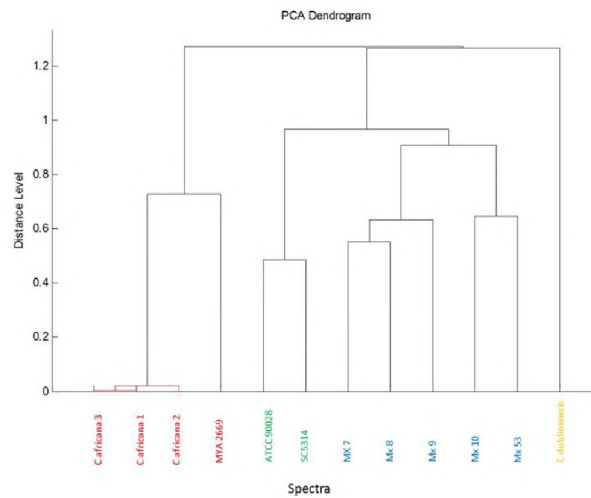


Figura 5.9: Dendrograma de las muestras establecidas como atípicas y las cepas de referencia.

6 Discusión

En los últimos años, han aumentado las infecciones fúngicas en los seres humanos afectando principalmente individuos inmunodeficientes, entre ellos y especialmente los infectados por el VIH, pacientes que reciben tratamientos de quimioterapia, de antibióticos de amplio espectro, además la colonización de las mucosas por las levaduras comensales, los procedimientos quirúrgicos invasivos y el uso de catéteres venosos centrales hacen que los pacientes sean vulnerables a infecciones por una gran variedad de hongos patógenos oportunistas, entre los que destacan las especies del género *Candida* [?]Otaita, Albaina 2012) *C. albicans*, presente en la microbiota de personas sanas, es la especie más patógena del género *Candida* y es considerada la causa más frecuente de candidiasis, tanto a nivel superficial como sistémico [2] *C. africana* es descrita como una especie atípica de *C. albicans* [19]. Desde entonces, son muchos los artículos que han reportado la presencia de esta especie a nivel mundial [8], [3]. Este microorganismo se ha aislado principalmente del tracto genitourinario en mujeres y se relaciona a pacientes con vulvovaginitis.

En este estudio 35 aislamientos clínicos procedentes de mujeres con vulvovaginitis originarias del departamento de Cundinamarca-Colombia, presentaron crecimiento de color verde en el medio CHROMagar *Candida*, dichos aislamientos fueron sometidos a tipificación por la tecnología MALDI-TOF MS donde se obtuvo como resultado 100% de homología con la presunta identificación por parte del medio cromogénico; 10(28%) de las 35(100%) muestras aunque mostraron crecimiento compatible con la identificación de *C. albicans* en el medio CHROMagar *Candida* y en el espectrómetro de masas no formaron clamidosporas, estructuras de resistencia importantes en la identificación fenotípica de *C. albicans*, es relevante resaltar que dichas estructuras en la levadura se generan bajo un proceso reversible y son mediadas por la expresión de genes no constitutivos como respuesta a condiciones de estrés. Además, pueden existir variedades que posean dicho fenotipo aun no descritas.

Otro parámetro evaluado fue la asimilación de trehalosa, azúcar que la especie *C. albicans* es capaz de asimilar. Para las cepas evaluadas 20(57%) de las 35 muestras fueron capaces de asimilarlo, 11(29%) no lo asimilaron y 4(14%) tuvieron como resultado asimilación variable, es decir no se comportaban ni como el control positivo ni como el control negativo. Basados en estos resultados podemos concluir que nos enfrentamos a cepas atípicas de *C. albicans* según lo reportado en la literatura, estos resultados han sido descritos en lo que se creen son variantes de *C. albicans* como lo es *C. africana* [16]. En Colombia las pruebas fenotípicas y bioquímicas son las más utilizadas para identificar especies de *Candida*, Sin embargo, por medio de este estudio se pudo observar que estas pruebas no son lo suficientemente sensibles

para identificar acertadamente especies atípicas de *C. albicans*.

Los estudios más recientes acerca de la identificación de variantes de *Candida* como *C. africana* evidencian que las pruebas más fiables para discriminar entre estas, se basan en técnicas moleculares [16].

Debido a que los métodos fenotípicos y bioquímicos no fueron concluyentes y con el fin de identificar con mayor fiabilidad las cepas atípicas, se hizo uso de un método molecular que con una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con los métodos utilizados en la fase inicial del estudio. Algunos autores han reportado que la identificación de *C. africana* puede lograrse evaluando el peso molecular del gen HWP1 con relación al peso molecular del mismo gen en *C. albicans* [16], [8], [20]. En este estudio se tomaron 22 muestras para evaluar el tamaño del gen HWP1: cepas con características atípicas (12), cepas de referencia (7) y cepas al azar de las que presentan un comportamiento homólogo a *C. albicans* (3), dentro de las 35 estudiadas. En tres de las cepas atípicas se observó un peso molecular de 700 pb para el gen en mención, que coincide por lo reportado en la literatura para *C. africana*, esta disminución en el tamaño se atribuye a una delección de 604pb en el tamaño total del gen en donde los cebadores utilizados flanquean una porción de aproximadamente 200 pb dentro de este; dos de las 22 evaluadas presentaron doble banda en el corrido electroforético y las 17 restantes con un peso molecular de aproximadamente 900pb como esta descrito para *C. albicans*, a pesar de estos resultados hubo cepas con bandas correspondientes a *C. albicans* con incapacidad de formar Clamidiosporas por tal razón se debe realizar la evaluación de los genes encargados de la expresión y represión de dichas estructuras.

La comparación de los proteomas globales analizados a partir de los espectros de masas obtenidos mediante el uso de la tecnología MALDI TOF MS, generaron picos diferentes entre las cepas de *C. africana*, las cepas atípicas y las cepas de *C. albicans*, donde *C. albicans* SC5314 exhibe dentro de su espectro una mayor intensidad para proteínas que se encuentran en el rango de 2000 y 4000 KDa, no se sabe si la delección del gen HWP1 o de otros genes no buscados en este estudio, tengan algo que ver en la expresión de dichas proteínas y por tal razón la ausencia de picos en las cepas de *C. africana*.

La existencia de cepas atípicas compatibles con *C. africana*, que no pueden ser identificadas por los métodos convencionales utilizados en el laboratorio, evidencian la necesidad de recurrir a otras técnicas, como las de biología molecular, para llegar a la identificación acertada de este tipo de aislamientos atípicos.

7 Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

Este estudio permitió mediante la caracterización fenotípica, genotípica y proteómica de 35 aislamientos clínicos, confirmar la presencia *C. albicans* atípicas teniendo en cuenta fermentación de trehalosa, formación de clamidosporas, el tamaño de una región en el gen HWP1 y la comparación de los proteomas globales con los de cepas de referencia de *C. albicans*; encontrando que tres de nuestras cepas poseen dichas características descritas para *C. africana*. Las pruebas fenotípicas y bioquímicas que se usan tradicionalmente para la identificación de aislamientos clínicos de levaduras, son poco eficientes y deben ser utilizadas de modo orientativo para la identificación presuntiva de aislamientos atípicos. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, es conveniente hacer uso de técnicas de biología molecular y proteómicas para la identificación correcta de los aislamientos atípicos de *C. africana*. Basados en los resultados proteómicos se puede concluir que aunque tres de las 12 cepas presentaron todas las características descritas para *C. africana*, en el dendograma y en el análisis por multicomponentes vimos cómo estas no se agrupan ni presentan un origen común para concluir que pertenecen a dicha especie o que están relacionadas directamente con las cepas de *C. africana* descritas en África.

7.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar la evaluación del tamaño del gen HWP1 en los 35 aislamientos recuperados, se debe determinar si algunas de las cepas que presentan todas las características fenotípicas y bioquímicas de *C. albicans* también presentan delección del gen HWP1, secuenciación del gen en las muestras que se comportaron de forma atípica, además se recomienda realizar perfiles de susceptibilidad a estas muestras con el fin de comparar patogenicidad entre *C. albicans* y especies atípicas.

Bibliografía

- [1] H.-J. Tietz, M. Hopp, a. Schmalreck, W. Sterry, and V. Czaika, “Candida africana sp. nov., a new human pathogen or a variant of Candida albicans?,” *Mycoses*, vol. 44, no. 11-12, pp. 437–445, 2001.
- [2] D. C. Coleman, D. J. Sullivan, D. E. Bennett, G. P. Moran, H. J. Barry, and D. B. Shanley, “Candidiasis: the emergence of a novel species, Candida dubliniensis.,” *AIDS (London, England)*, vol. 11, no. 5, pp. 557–67, 1997.
- [3] G. Rodríguez-Leguizamón, A. Fiori, L. F. López, B. L. Gómez, C. M. Parra-Giraldo, A. Gómez-López, C. F. Suárez, A. Ceballos, P. Van Dijck, and M. A. Patarroyo, “Characterising atypical Candida albicans clinical isolates from six third-level hospitals in Bogotá, Colombia,” *BMC Microbiology*, vol. 15, no. 1, p. 199, 2015.
- [4] C. D. L. Habana, “Candida albicans serotipo B en pacientes seropositivos al virus de inmunodeficiencia humana,” vol. 53, no. 3, pp. 222–223, 2001.
- [5] O. Romeo, F. De Leo, and G. Criseo, “Adherence ability of Candida africana: a comparative study with Candida albicans and Candida dubliniensis.,” *Mycoses*, vol. 54, no. 4, pp. e57–61, 2011.
- [6] A. Reynaud, “Infecciones vaginales por cándida : diagnóstico y tratamiento,” *Revista Gineco Obstreta*, pp. 159–166, 2007.
- [7] F. L. Mayer, D. Wilson, and B. Hube, “<i>Candida albicans</i> pathogenicity mechanisms,” *Virulence*, vol. 4, no. 2, pp. 119–128, 2013.
- [8] L. Yang, S. Chang, and LiuHaoping, “Candida albicans hyphal initiation and elongation,” *Trends in Microbiology*, 2014.
- [9] J. Bona, “Candida albicans cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host pathogen interaction,” *Journal of Proteomics*, 2015.
- [10] G. Megha and J. N. Clarissa, “Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms,” 20016.

-
- [11] Y. Hu, A. Yu, X. Chen, G. Wang, and X. Feng, "Molecular Characterization of *Candida africana* in Genital Specimens in Shanghai , China," vol. 2015, pp. 25–30, 2015.
- [12] G. I. Nal, "Candidiasis vulvovaginal en un grupo mujeres gestantes de Medellin Vulvovaginal candidiasis in a group of pregnant women from Medellin," pp. 14–20, 2009.
- [13] C. Schwencke, *tipificación de cepas de C. albicans*. PhD thesis, 2012.
- [14] J. Ferrer, "Vaginal candidosis : epidemiological and etiological factors," pp. 21–27, 2000.
- [15] J. Holland, M. L. Young, O. Lee, and S. C.-a. Chen, "Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida*," pp. 249–251, 2003.
- [16] R. Orazio and G. Criseo, "First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene," *Science Direct*, 2008.
- [17] M. D. Jacobsen, T. Boekhout, and F. C. Odds, "Multilocus sequence typing confirms synonymy but highlights differences between *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*," *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 5, pp. 764–770, 2008.
- [18]
- [19] M. Thanos, M. P. D. E. Andrade, and D. Universita, "Phenotypic and Genotypic Characterization of Unusual Vaginal Isolates of *Candida albicans* from Africa," vol. 33, no. 9, pp. 2462–2465, 1995.
- [20] M. Sciences, M. Abastabar, M. Sciences, and M. Sciences, "Use of PCR-RFLP and PCR-HWP1 for Identification of *Candia* Species Isolated From Cystic Fibrosis Patients Research in Molecular Medicine," no. July, 2014.