

Caracterización de una Levadura Emergente

CHARACTERIZATION OF AN EMERGING YEAST

Eugenio Reyes^{1,2}; Patricio Godoy²; Olga Fishman²; Víctor Cifuentes³

1. Laboratorio de Micología de la Fundación Científica y Tecnológica de la Asociación Chilena de Seguridad. Santiago, Chile.

2. División de Microbiología e Inmunología. Universidad Federal de São Paulo, Brazil.

3. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Centro de Biotecnología.

RESUMEN

Las infecciones fúngicas han aumentado en el último tiempo, entre ellas las causadas por hongos levaduriformes. Siendo descritas actualmente como levaduras emergentes, han sido confundidas frecuentemente con especies del género *Candida*, presentando diferencias sutiles en las características morfofisiológicas, además de presentar patrones de susceptibilidad diferentes al género *Candida*. El presente trabajo fue propuesto para caracterizar morfofisiológica y molecularmente a una de ellas.

(Reyes E, Godoy P, Fishman O, Cifuentes V. 2005. Caracterización de una Levadura Emergente. *Cienc trab*. Abr-Jun; 7(16):78-84).

Descriptores: MICOSIS; LEVADURAS; PICHIA ANOMALA.

ABSTRACT

Fungal infections have increased in recent years, among them those caused by yeast shaped fungi. Being currently described as emerging yeasts, they have often been mistaken for species of the genus *Candida*, showing subtle differences in morphophysiological characteristics in addition to presenting susceptibility patterns different from genus *Candida*. This paper was proposed for characterizing both morphophysiological and molecularly one of them.

Descriptors: MYCOSES; YEASTS; PICHIA ANOMALA.

La frecuencia de las infecciones fúngicas ha aumentado en forma considerable en las últimas décadas, particularmente en pacientes hospitalizados o portadores de alguna modalidad de inmunosupresión. El uso excesivo de nuevos y más potentes antimicrobianos o de antineoplásicos que producen alteración de las barreras mucosas del tracto gastrointestinal con alteración de la función inmune celular; la utilización de catéteres intravasculares que provocan rompimiento en la integridad de las barreras cutáneas; el uso de la nutrición parenteral; procedimientos quirúrgicos más agresivos o hemodiálisis, entre otros, son factores que han influido en el creciente número de enfermedades fúngicas oportunistas (Alter y Farley 1994; Anaissie 1992). De ahí la importancia de una búsqueda de métodos de identificación más sensibles que los actuales utilizados en micología clásica, los que muchas veces son poco sensibles y lentos, siendo necesarios hasta 30 días de incubación.

Debido a lo anterior, se ha propuesto en el presente trabajo utilizar una levadura como modelo de experimentación de la división Acomycota *Pichia anomala* colectada en plantas, suelo, frutas, animales y transitoriamente en el ser humano (Frantz y Mertvetsova 1986; Middelhoven et al. 1990; Pagnoca y Mendoça-Hagler 1989; Saëz 1979; Sand y Van-Grinsven 1976; Toro y Piontelli 1985). Sin embargo, últimamente ha sido involucrada primariamente como agente causal de fungemias en pacientes hospitalizados con alteración de su inmunidad (Anaissie 1992; Chakrabarti et al. 2001; Maenza et al. 1996; Meunier-et al. 1981; Miltoc y Siddiqui 1986); este tipo de infecciones presenta alta tasa de mortalidad. Actualmente existe una pobre información en la literatura consultada de las infecciones producidas por *P. anomala*, relatándose que muestras de la misma especie pueden diferir en la asimilación de algunos azúcares (De Hoog et al. 2000) y, por ende, estos métodos usualmente no son suficientemente sensibles para identificar este tipo de microorganismos, siendo necesaria la utilización de técnicas complementarias para su diagnóstico.

Nuevas herramientas moleculares para una rápida y precisa identificación, basadas en el análisis cromosómico, han sido desarrolladas (Ferrer et al. 2001). En esta dirección, los métodos basados en la reacción en cadena de la Polimerasa han mostrado ser una técnica para una identificación de muchos microorganismos, incluyendo bacterias, algas, hongos, virus, etc. (Córdova et al. 2002; Gomez y Gonzalez 2001; Kurtzman y Robnett 1998; Mannarelli y Kurtzman 1998).

En el presente trabajo analizamos e identificamos 20 muestras clínicas aisladas de hemocultivos de neonatos prematuros y tres

Correspondencia:

Eugenio Reyes Arenas

Laboratorio de Micología

Fundación Científica y Tecnológica de la Asociación Chilena de Seguridad.

Vicuña Mackenna N° 200 segundo Piso, Providencia, Santiago, Chile.

Tel: (56-2) 685 3604 • Fax: (56-2) 685 2961

e-mail: fctera@achs.cl

Recibido: 27 de diciembre de 2005 / Aceptado: 4 de marzo de 2005

aislados ambientales. Evaluamos el uso de las técnicas de análisis tradicional combinadas con herramientas moleculares mediante la caracterización morfofisiológica. Además, las cepas serán identificadas por medio de métodos moleculares utilizando primers ITS1 e ITS4, que amplifican la región conservada de RNA ribosomal. La variabilidad genética será evaluada mediante el RAPD.

MATERIALES Y MÉTODO

Organismos: 20 cepas de *Pichia anomala* de origen clínico (Centro de Salud de Santa Marcelina) y 3 ambientales de la Micoteca del Laboratorio de Micología de la Escola Paulista de Medicina (Universidad Federal de Sao Paulo-Brasil) fueron analizadas.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y PATRÓN DE SENSIBILIDAD

La caracterización morfofisiológica de las levaduras será realizada mediante la asimilación de diversas fuentes de carbono y de nitrógeno, la fermentación de carbohidratos será analizada de acuerdo a los métodos tradicionales de Micología (Kurtzman y Fell 2000).

Previamente a la realización de los test de sensibilidad fueron construidas las curvas de crecimiento de la levadura. Esta prueba fue realizada con el objetivo de encontrar el medio y la temperatura más adecuada para el crecimiento de las muestras de *Pichia anomala*.

Inóculos de *Pichia anomala* y de una cepa ATCC de *Candida parapsilosis* fueron cultivadas en un matraz de erlenmeyer, conteniendo medio a analizar RPMI-1640, Antibiotic medium III y Yeast Peptone Dextrose (YEPD) en agitación a temperatura constante, lecturas en espectrofotómetro fueron hechas cada una hora hasta alcanzar la fase estacionaria, los análisis fueron realizados en duplicado.

TEST DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO

Macrodilución:

El test de Macrodilución en caldo fue realizado de acuerdo a los estándares del NCCLS-USA (Barchiesi et al. 1994). El tamaño del inóculo utilizado fue medido espectrofotométricamente y utilizando concentraciones de 0,5 a 2,5 x 10³ células por mL. Los medios de cultivo fueron RPMI 1640 con/L glutamina sin bicarbonato de sodio, tamponado a pH 7,0 con buffer MOPS 0,165 M (American Biorganics, Niagara Falls, NY) a 0,9 mL de la solución del inóculo y el medio fue dispensado en un tubo plástico estéril conteniendo 0,1 mL de antifúngico concentrado 10 veces. El tubo de control de crecimiento sin la droga fue incluido cada vez que se realizó la prueba. Los racks que contienen los tubos plásticos fueron incubados a 35 °C por 48 hrs. Los criterios de lectura para las concentraciones mínimas inhibitorias muestran que fueron las más bajas concentraciones que produjeron al menos el 80% de inhibición comparadas con el tubo de control. Para esto se diluyó el tubo control para producir un estándar con un 80% de inhibición.

Microdilución:

Los aislados fueron testeados por el método de microdilución en caldo de acuerdo a las normas estandarizadas propuestas por el documento NCCLS, M27-A y M27-A2 (1997, 2002). Las drogas utilizadas Anfotericina B (ICN Biomedicals Inc), fluconazol (Pfizer Inc., New York, NY, USA), Itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, USA) y Ketoconazol (Janssen Pharmaceutica) fueron usadas para obtener un rango de dilución final de 0,3-160 mg/mL, 0,125 a 64 mg/mL, 0,007 a 4 mg/mL, y 0,015 a 8 mg/mL, respectivamente. Brevemente, el test de microdilución en caldo fue realizado en placas de ELISA con fondo plano de 96 pocillos (Nunclon, Delta, Nunc., InterMed, Denmark), contenido medio RPMI-1640 (American Biorganics, Niagara Falls, NY) con L-glutamina, sin bicarbonato, y tamponado con buffer MOPS a pH 7,0. Las microplacas conteniendo el doble de la concentración final de los antifúngicos fueron mantenidas a -70 °C por no menos de 3 semanas antes de su uso. En el día del ensayo, la suspensión del inóculo, ajustada a una concentración 0,5 McFarland mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm. Un volumen de 100 uL de esta suspensión se dispensa en cada pocillo resultando en una concentración de entre 0,5 y 2,5 X 10⁸ células/mL. Las placas serán incubadas a las temperaturas de 30 y 35 °C durante 24, 48 y 72 hrs. Tamaño, viabilidad y pureza del inóculo serán controlados por cultivo de alícuotas de la suspensión en placas de agar Sabouraud-dextrosa, como también será utilizado un organismo de control (*C. parapsilosis* ATCC 22019) que fue incluido cada vez que se realizó un experimento para chequear la actividad antifúngica de las drogas.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) fueron definidas como las mínimas concentraciones necesarias para producir un decrecimiento evidente en la turbidez cuando se compara con el pocillo control (libre de la droga) (Barchiesi et al. 1994).

Se utilizó la definición del Breakpoint para los MICs de Fluconazol e Itraconazol MICs propuesta por Rex et al (1997) y el M27-A2 (2002), considerando los aislados con MICs ≤ 8 mg/mL para Fluconazol, ≤ 0,0125 mg/mL para Itraconazol, ≤ 4 para Fluorcitocina como sensibles; aislados con MICs entre 16 y 32 mg/mL para Fluconazol, 8-16 mg/mL para Fluorcitocina y entre 0,25 y 0,5 mg/mL para Itraconazol como susceptibilidad dosis dependiente (SDD); y los aislados con MICs ≥ 64 µg/mL para Fluconazol y ≥ 1 µg/mL para Itraconazol como resistente. Debido a la carencia de una definición concensuada de breakpoints para Ketoconazol MICs, fueron establecidos valores arbitrarios, sensible para aislados con MICs < 0,125 µg/mL, SDD para aislados con MICs entre 0,25 y 0,5 µg/mL y resistentes para aislados con MICs ≥ 1 µg/mL (Maenza et al. 1996; Rodríguez-Tudela et al. 1995; St-Germain et al. 1995).

EXTRACCIÓN DEL ADN

Aislamiento del ADN genómico, las levaduras serán crecidas por 24 hrs. a 35 °C en medio YEPD líquido 50 mL en agitación. El DNA es extraído de acuerdo a Guthrie y Fink (2002) con algunas modificaciones realizadas en nuestro Laboratorio. Brevemente, fueron agregadas las células obtenidas por centrifugación a 10.000 x g por 10 minutos, resuspendidas en 5 mL de 0,9 M de sorbitol, 0,1 M de EDTA y 100 uL de Zymoliasa 100T (2 mg/mL). La mezcla fue incubada por 25 min a 37 °C, centrifugada a 4000 x g por 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 4,5 mL de 50

mM Tris-HCL, 20 mM EDTA 500; μL de SDS 10% fue agregado e incubado a 65 °C por 15 min y 50 μL de proteinasa K, seguida por una incubación a 55 °C por 60 min. Se agregó un volumen de fenol saturado pH 8.0 y ambas fases fueron mezcladas suavemente. La fase acuosa fue recuperada y lavada dos veces con un volumen de una solución fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1). El DNA fue precipitado con dos volúmenes de etanol a -20 °C.

AMPLIFICACIÓN POR PCR

Los primers utilizados fueron ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCGCG-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar la región 5,8S DNAr y la región ITS1 e ITS2 adyacente (Fujita y Hashimoto 2001).

La amplificación por PCR fue realizada en un volumen final de 25 μL : 1 μL del DNA de la levadura (aprox. 10 ng), se agrega a la mezcla Madre consistente en 2,5 μL de buffer PCR 10x, 0,5 μL de la mezcla de dDNPT's (10 mM de cada uno), 2 μL de primers ITS1 e ITS2 (25 uM de cada primer), 1 μL de MgCl_2 (50 mM) y 0,2 μL (1U) de Taq polymeraza (GenLab). El volumen final fue ajustado con agua bidestilada. La amplificación fue realizada en un termociclador them cycler system 2700 (Applied Biosystem) de acuerdo al protocolo: denaturación inicial a 94 °C por 30 s; hibridación a 55 °C por 30 s; síntesis a 72 °C por un minuto; este ciclo se repite por 30 ciclos; una extensión final a 72 °C x 10 minutos (Lodato et al. 2004). Control negativo sin DNA fue procesado simultáneamente. El producto amplificado fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x conteniendo bromuro de etidium (0,5 ug/mL) y fotografiado bajo luz ultravioleta. La banda obtenida fue cuantificada usando el software versión 2.01 (Kodak Scientific Imagen System); en paralelo se utilizó un marcador de Peso Molecular de 100 bp (Fermentas). Los productos amplificados fueron recolectados del gel y purificados por un método alternativo de glassmilk de acuerdo a Boyle y Lew (1995).

SECUENCIAMIENTO AUTOMÁTICO DEL DNA Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los nucleótidos fueron secuenciados usando el Kit DNA sequencing Kit Big Dye™ Terminator v3.0 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante y el equipo Genetci analyzer 3100 Avant automatic sequencer (Applied Biosystem). Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software University of Wisconsin Genetics Computer Group package, versión (10.0) (Devereux et al. 1984) y el programa Clustal W versión 1.8 (Thompson et al. 1994).

ANÁLISIS POR PCR-RAPD

RAPD fingerprinting fue realizado utilizando 7 primers arbitrarios OP AC-02; OP AC-04; OP AC-06; OP-AC-10; OP AC-17; AP AC-18 y OP AC-20 (Operon Technologies, Inc., Alameda, Calif.) de acuerdo a intrucciones del autor. Para cada 25 μL de mezcla, las reacciones fueron realizadas utilizando: 2,5 μL de 10x PCR

Buffer, 2,5 μL de 1 mM dNTPs, 2 μL de 25 mM de MgCl_2 , 2 μL de primer (10 pmol), 5 μL de 10 pg/ μL DNA, 0,4 μL de Taq polymerasa (2U) y agua bidestilada para ajustar al volumen final. La amplificación fue realizada en un termociclador GeneAmp PCR system 270 (Applied Biosystem): con una inicial denaturación por 3 min a 95 °C; 1 min a 94 °C para denaturación, 2 min a 35 °C para hibridar; 2 min a 72 °C para polymerizar; este ciclo se repite por 40 ciclos; una extensión final por 5 min a 72 °C. Los amplicones fueron separados en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE conteniendo bromuro de etidium (0,5ug/ml), fue fotografiado bajo luz ultravioleta y las masas obtenidas fueron cuantificadas usando el software TREECON versión 1,3 para Windows.

RESULTADOS

Caracterización Morfofisiológica

Colonias de las muestra clínicas obtenidas después de la incubación a 25 °C por 72 hrs. en medio Agar Sabouraud-dextrosa 20% presentaron aspectos brillantes, bordes regulares, superficie plana, color crema y no presentaban pigmentos.

Los aislados ambientales se presentaron variables en su textura siendo algunos granulares y otros serosos, superficie rugosa a plana, bordes regulares color blanco sin pigmento. La caracterización microscópica tanto de las muestras ambientales como clínicas expresaron un pseudomycelio rudimentario con un 20% de células blásticas y ascosporos típicos. El test de asimilación a diferentes azúcares (Tabla 1), todas las cepas analizadas fueron capaces de asimilar glucosa, galactosa, maltosa, sucrosa, trehalosa, manitol y xilosa e incapaces de asimilar melibiosa, rhamnosa, ducitol e inositol; la asimilación de celobiosa fue variable entre los aislados. Todas las levaduras asimilaron KNO_3 . Adicionalmente todos los aislados fueron capaces de fermentar dextrosa, maltosa y sucrosa con excepción de lactosa. Sólo dos cepas clínicas fueron capaces de fermentar galactosa (dato no mostrado). La morfofisiología obtenida sugiere que tanto los aislados clínicos como ambientales sugieren la presencia de *P. anomala* (Kurtzman y Fell 2000).

Las cinética de crecimiento de *P. anomala* fueron realizadas en paralelo con la cepa de referencia de *Candida parapsilosis* ATCC 2019. Los datos obtenidos mostraron que tanto los aislados ambientales y clínicos de *P. anomala* no mostraron diferencias en sus cinéticas, en las temperaturas analizadas, el medio más apropiado para el crecimiento fue RPMI 1640 Gráficos (1 a 4).

Gráfico 1.

Cinética de Crecimiento de *P. anomala* a 35 °C en tres medios diferentes.

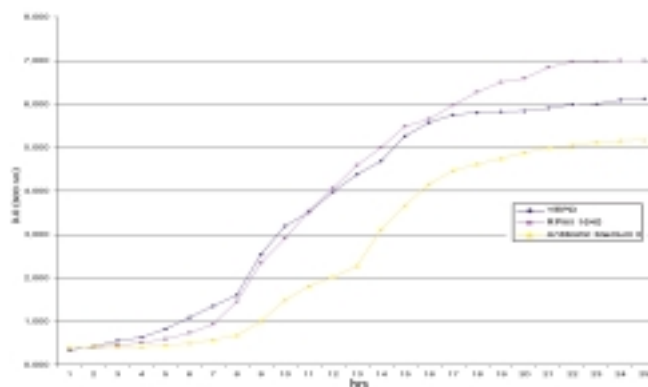
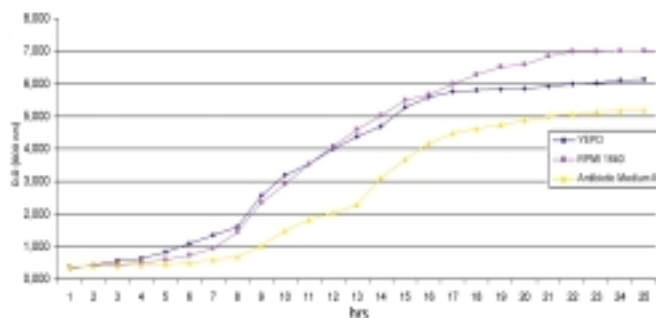


Tabla 1.
Asimilación de azúcares de muestras clínicas y ambientales de *Pichia anomala* (auxonograma).

Glu, glucosa; Gal, galactosa; Mal, Maltosa; Suc, sucrosa; Tre, trehalosa; Mel, melibiosa; Ram, ramnosa; Duc, ducitol; Ino, inositol; Cel, celobiosa; Mani, manitol y Xyl, xilosa. +: capaz de asimilar. -: no capaz de asimilar.

Cepa	Glu	Gal	Mal	Suc	Tre	Mel	Ram	Duc	Ino	Cel	Mani	Xyl
P1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P17	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P18	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P19	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
A1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
A3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
A9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+

Gráfico 2.
Cinética de Crecimiento de *P. anomala* a 30 °C en tres medios diferentes.



Cinéticas de crecimiento de la cepa ATCC de *Candida parapsilosis* 22019 a dos diferentes temperaturas, 30 y 35 °C, utilizando tres diferentes medios de cultivo. Se muestran en los gráficos 3 y 4.

Gráfico 3.
Curva de Crecimiento de *Candida parapsilosis* (cepa ATCC 22019) a 35 °C en tres medios diferentes.

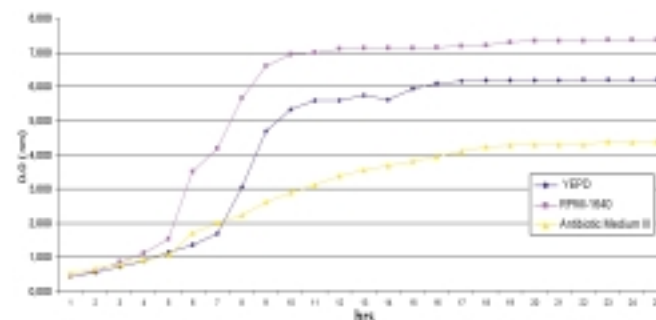
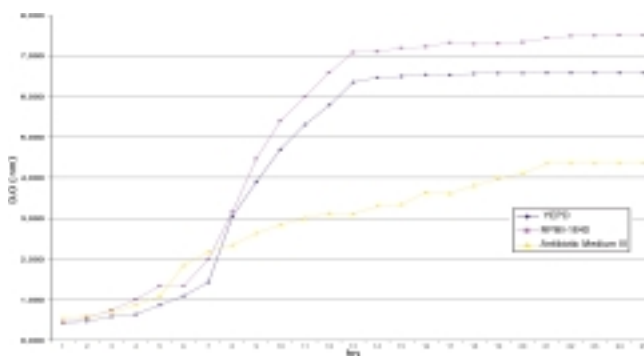


Gráfico 4.
Curva de Crecimiento de *Candida parapsilosis* (cepa ATCC 22019) a 30 °C en tres medios diferentes.



MICs obtenidos por el método de Microdilución en caldo fueron comparados con los obtenidos por el método de Macrodilución. Ambos métodos no mostraron diferencias significativas. Las Tablas 2 y 3 describen una comparación entre los dos métodos, posterior a una lectura de 48 hrs. Los valores presentados son semejantes y no muestran diferencias significativas. De acuerdo a esto, el método de microdilución en caldo puede ser utilizado en forma segura en el estudio de sensibilidad de muestras de *P. anomala* tanto a partir de muestras clínicas como ambientales. Los patrones de sensibilidad de las muestras aisladas de pacientes para Fluconazol revelaron altos valores de MICs respecto a los aislados ambientales. Además se observó algún grado de resistencia a Itraconazol y Ketoconazol (70 y 83%, respectivamente). Estos resultados sugieren que las infecciones sistémicas debido a *P. anomala* no pueden ser tratadas empíricamente sin conocer su patrón de sensibilidad.

Tabla 2.

Caracterización de los patrones de sensibilidad de las muestras *P. anomala* analizadas por macrodilución a las 48 hrs. de lectura para cuatro drogas antifúngicas.

Drogas antifúngicas	Sensibles	Intermedias o DDS	Resistentes	Total
Fluconazol	21 (70%)	9(30%)	0	30 (100%)
Itraconazol	9 (30%)	14 (46,6%)	7 (23,3%)	30 (100%)
Ketoconazol	5 (16,6%)	14 (46,6%)	11 (36,6%)	30 (100%)
5-fluorocytosina	15 (50%)	1 (3,3%)	14 (46,6%)	30 (100%)

Tabla 3.

Caracterización de los patrones de sensibilidad de las muestras *P. anomala* analizadas por microdilución a las 48 hrs. de lectura para cuatro drogas antifúngicas.

Drogas antifúngicas	Sensibles	Intermedias o DDS	Resistentes	Total
Fluconazol	22 (73,3%)	8 (26,6%)	0	30 (100%)
Itraconazol	13 (43,3%)	17 (56,6%)	0	30 (100%)
Ketoconazol	13 (43,3%)	15 (50%)	2 (6,6%)	30 (100%)
5-fluorocytosina	15 (50%)	0	15 (50%)	30 (100%)

Tabla 4.

Identificación de cuatro grupos de levaduras aisladas, basada en el tamaño (bp) y en análisis de los amplificadas obtenidos.

Grupo	Número de aislados	18S rRNA ^a	ITS1	5,8S rRNA	ITS2	28S rRNA ^b	Tamaño Total
I	3	... 30	160	157	177	58 ...	582
II	10	... 30	182	157	191	58 ...	618
III	8	... 30	183	157	191	58 ...	619
IV	2	... 30	67	153	81	57 ...	388

^a, corresponde a los últimos 30 bp del gen 18S DNA 3'.

^b, corresponde a los primeros 57 – 58 bp del gen 28S rDNA 5'.

Polimorfismo Mediante el uso de ITS

La zona que incluye 5,8S DNA y la región adyacente ITS1 e ITS2, utilizando los primers ITS1 e ITS4 (Kurtzman y Fell 2000) fueron obtenidas a partir de los DNA de las muestras ambientales y clínicas, observándose diferentes rangos de tamaños que oscilaron entre 400-650 bp. Estas bandas fueron aisladas, secuenciadas y analizadas posteriormente. En un primer análisis los aislados fueron divididos en cuatro grupos (Tabla 4): Grupo I (582 bp), incluyendo los aislados clínicos P8, P11 y P20; Grupo II (618 bp), compuesto por los aislados clínicos P1, P2, P6 P7, P10, P15, P16, P19 y los ambientales A1 y A3; Grupo III (619bp), incluido los aislados clínicos P3, P4, P5, P9, P12, y P18 y el Grupo IV (388), compuesto de los aislados clínicos P17 y ambiental A9. Las secuencias de todos los aislados en cada grupo fueron idénticas al ser comparados con la base de datos Gen Bank utilizando el programa de alineamiento BLAST para identificar especies fúngicas (Ferrer et al. 2003). El Grupo I de aislados fue identificado como *Candida qinlingensis*; los Grupos II y III identificados como *Pichia anomala* y el Grupo IV como *Candida haemulonii*, con un 99% de seguridad. Grupos II y III presentaron similares secuencias ITS1 (182-183 bp) e ITS2 (191 bp), sugiriendo ninguna

diferencia entre ellas al igual que los aislados del Grupo I que presentaron secuencias ITS1 e ITS2 de 160 bp y 177 bp, respectivamente. Sin embargo, el Grupo IV, que presentó un amplificado corto de entre 67 bp para ITS1 e 81 bp para ITS2, sugiere que estos dos aislados no pertenecen al género *Pichia*.

El análisis de los datos obtenidos a partir de la amplificación de DNA ribosomal 5,8S y las secuencias ITS1 e ITS2 permitió agrupar en varios grupos, siendo los tres primeros semejantes, con un alto nivel de similitud entre el II y el III. Los agrupados en el cuarto grupo fueron completamente diferentes. Similares resultados se encontraron cuando se analizó sólo las secuencias ITS1 e ITS2, mostrando un alto nivel de conservación en la secuencia del gen 5.8S RNA tanto en las muestras clínicas como ambientales.

Análisis RAPD

22 bandas diferentes fueron obtenidas cuando utilizamos los primeros 7 primers en 13 aislados clínicos y 2 muestras ambientales analizadas. Los resultados con el primer OP AC-06 se muestran en la Figura 1.

Figura 1.

Dendrograma mostrando el polimorfismo obtenido por RAPD de 13 cepas clínicas y 2 aislados del ambiente de *P. anomala*. Este árbol fue construido con los resultados obtenidos mediante la técnica de RAPD, utilizando los 10 primers de 10-mer (OP AC-02, OP AC-04, OP AC-06, OP AC-10, OP AC-17, OP AC- 18 y OP AE-20), y usando el software TREECON.

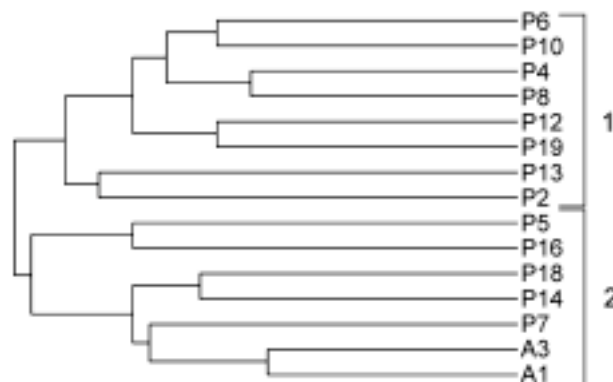
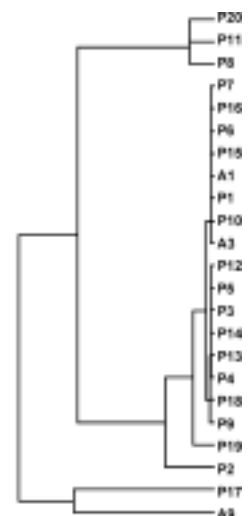


Figura 2.

Dendrograma de aislados clínicos y ambientales, basado en la secuencia de los elementos ITS, incluido el gen 5.8S rDNA. Las secuencias fueron analizadas por comparación de múltiples secuencias, usando un programa del GCG Wisconsin Package. P1 al P20 corresponden a los aislados clínicos. A1, A3 y A9 corresponden a los aislados ambientales.



El tamaño de las bandas obtenidas tenía un rango que variaba entre 100 a 2.140 bp. Un dendograma construido utilizando los datos obtenidos por el RAPD, usando el software TREECON versión 1.3b, mostró el gran polimorfismo y diversidad genotípica entre todas las levaduras analizadas (Figura 2). Todos los aislados fueron agrupados en dos ramas, en el brazo I se agruparon levaduras de los tres Grupos (I P8, II P2, P6, P10, P19, y III P4, P12, P13); el brazo II agrupó a: (II P7, P16, A1, A3, III P5, P14, P18). Cabe resaltar que en este Grupo las muestras ambientales se agruparon en un subgrupo diferente al de las clínicas.

DISCUSIÓN

Nuevos patógenos fúngicos denominados hongos emergentes han aumentado el número de infecciones debido a este tipo de microorganismos. La identificación de estos hongos habitualmente es lenta y puede inducir a errores de diagnóstico, ya que en gran parte éstos se pueden confundir con los que habitualmente producen infecciones. Las herramientas moleculares del tipo ITS1 e ITS2 han sido utilizadas en un gran número de

hongos levaduriformes y filamentosos (Chen et al. 2001; Ferrer et al. 2003; Fujita y Hashimoto 2001; Soll 2000), identificando cuatro diferentes grupos de *Pichia anomala*. Todas las muestras del mismo grupo presentaron la misma secuencia; sin embargo, el origen de las levaduras siempre fue diferente. Estos resultados sugieren que estas secuencias amplificadas no son suficientemente resolutivas para observar las diferencias entre las especies de *Pichia anomala* y *Candida haemulonii*. Esto está en consonancia con lo reportado por Sutar et al (2004). Sin embargo, el análisis mediante la técnica de RAPD proveyó de una poderosa herramienta para determinar polimorfismo genético. Por esto creemos que la combinación de diferentes métodos permitirá un diagnóstico certero de este tipo de microorganismos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en gran parte con los aportes de la Fundación Científica y Tecnológica de la Asociación Chilena de Seguridad y el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

REFERENCIAS

- Alter SJ, Farley J. 1994. Development of *Hansenula anomala* infection in a child receiving fluconazole therapy. *Pediatr Infect Dis J* 13:158-9.
- Anaissie E. 1992. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a Cancer Center and review. *Clin Infect Dis* 14:S43-53.
- Barchiesi F, Colombo A, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. 1994. In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1530-3.
- Boyle JS, Lew AM. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *TIG* 11:8.
- Caggia C, Restuccia C, Pulvireti A, Giudici P. 2001. Identification of *Pichia anomala* isolated from yogurt by RFLP of the ITS region. *Int J Food Microbiol* 71: 71-3.
- Chakrabarti A, Singh K, Narang A, Singhi S, Batra R, Rao KLN, et al. 2001. Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a tertiary-care center in Northern India. *J Clin Microbiol* 39: 1702-6.
- Chen Y, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulant-Barrett SL, Lefe K, Bui U, et al. 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeast. *J Clin Microbiol* 39(11): 4042-51.
- Córdova JL, Astorga J, Silva W, Riquelme C. 2002. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol Res* 35: 433-40.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2000. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira Virgili, Reus, Spain.
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12:387-95.
- Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 38:2873-9.
- . Montero J, Alió JL, Abad JL, Ruiz-Moreno JL, Colom F. 2003. Rapid molecular diagnosis of posttraumatic keratitis and endophthalmitis caused by *Alternaria infectoria*. *J Clin Microbiol* 41:3358-60.
- Frantz TG, Mertvetsova OA. 1986. Yeast associations with mosquitoes of the genus *Aedes* Mg. (Diptera, culicidae) in the Tom-Ob river region. *Biol Nauki* 4: 94-8.
- Fujita S, Hashimoto T. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 39:3617-22.
- Gomez PI, Gonzalez MA. 2001. Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biol Res* 34: 23-30.
- Guthrie C, Fink G. 2002. Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. San Diego, California: Academic Press.
- Kurtzman CP, Fell JW. 2000. The Yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- . Robnett CJ. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-71.
- Las heras FJ, Mingorance I, Clemente JM, Rodriguez F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res*. 3: 3-8.
- Lodato P, Alcaino J, Barahona S, Retamales P, Jimenez A, Cifuentes V. 2004. Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 37: 83-93.
- Lu CC, Tang KFJ, Chen SN. 1998. Identification and genetic characterization of yeast isolated from freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, in Taiwan. *J. Fish Dis*. 21: 185-92.
- Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, Chaisson RE, Merz RD, Gallant JE. 1996. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus - infected patients. *J Infect Dis* 173:219-25.

- Mannarelli BM, Kurtzman CP. 1998. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol* 36:1634-41.
- Meunier-Carpentier F, Kiehn TE, Armstrong D. 1981. Fungemia in the immunocompromised host. *Am J Med* 71:363-70.
- Middelhoven WJ, Jong IM, Winter M. 1990. Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other vegetable crops. *Antonie van Leeuwenhoek* 57(3):153-8.
- Milstoc M, Siddiqui NA. 1986. Fungemia due to *Hansenula anomala*. *N Y State J Med* 86:541-2.
- Moses A, Maayan S, Shvil Y, Dudin A, Ariel I, Thalji A, Polcheck I. 1991. *Hansenula anomala* infection in children: from asymptomatic colonization to tissue invasion. *Pediatric Infect Dis J* 10:400-2.
- Muñoz P, Garcia MG, Berenguer J, Bernaldo JL, Bouza EB. 1989. Catheter B related fungemia by *Hansenula anomala*. *Arch Intern Med* 149:709-10.
- Murphy N, Buchanam CR, Damjanovic V, Whitaker R, Hart CA, Cooke RW. 1986. Infection and colonization of neonates by *Hansenula anomala*. *Lancet* 1:291-3.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27a. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Naumov GI, Naumova ES, Scunörer J. 2001. Genetic characterization of the nonconventional yeast *Hansenula anomala*. *Res Microbiol* 152: 551-62.
- Odone FV, Aquino MZ, Vaccari EMH, Lacaz CS, Cristófani LM, Brito JLBC, et al. 1996. Fungemia por *Hansenula anomala* em criança portadora de neuroblastoma, submetida a transplante autólogo de medula óssea. *Arg Bras Med* 70:33-6.
- Pagnoca FG, Mendoca-Hagler AN. 1989. Yeasts associated with the shrimp *Penaeus schnitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast* 5: S479-83.
- Qadri SMH, Aldaley F, Strampfer MJ, Cunha BA. 1988. Urinary tract infection caused by *Hansenula anomala*. *Mycopathol.* 104:99-101.
- Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bortlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 24(2):235-47.
- Rodero L, Boutureira M, Demkura H, Burkett A, Fernández C, Losso M, et al. 1997. Yeast infections: causative agents and their antifungal resistance in hospitalized pediatric patients and HIV positive. *Rev Argent Microbiol* 29:7-15.
- Saéz H. 1979. Evolution journaliere puis hebdomadaire de la flore digestive a levures d'un grand Panda. *Mycopathol Mycol Appl* 3:179-85.
- Sand FEM, Van-Grinsven AM. 1976. Comparison between the yeast flora of middle Eastern and Western European soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 42:523-32.
- Sekhon AS, Kowalewska K, Garg AK, Vaudry W. 1992. *Hansenula anomala* fungemia in infants with gastric and cardiac complications with a review of the literature. *Eur J Epidemiol* 8:305-8.
- Soll DR. 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 13(2): 332-70.
- Sutar R, David JK, Ganesan K, Ghosh SS, Chakrabarti A, Bachhawat K. 2004. Comparison of ITS and IGS1 regions for strain typing of clinical and non-clinical isolates of *Pichia anomala*. *J Med Microbiol* 53: 119-23.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Thuler LC, Faivichenco S, Velasco E, Martins CA, Nascimento CR, Castolho IA. 1997. Fungemia caused by *Hansenula anomala*-an outbreak in a cancer hospital. *Mycoses* 40:193-96.
- Toro MA, Piontelli EL. 1985. Yeast communities in sandy soils: (a beach of V region, Chile) II. *Bol Micol* 2:109-18.
- Torres-Rodriguez JM. 1996. New emergent opportunistic fungi. *Rev Iberoam Micol* 13: S30-8.
- Van de Peer Y, De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft windows environment. *Comput Applic Biosci* 10: 569-70.
- Wong AR, Ibrahim H, Van Rostenberghe H, Ishak Z, Radzi MJ. 2000. *Hansenula anomala* infection in a neonate. *J Pediatr Child Health* 36: 609-10.
- Yamada S, Maruoka T, Nagai K, Tsumurs N, Yamada T, Sakata Y, et al. 1995. Catheter-related infections by *Hansenula anomala* in children. *Scand J Infect Dis* 27:85-7.