

# Evaluación de los cebadores ITS3 e ITS4 para la detección de infecciones por *Candida* spp. en muestras de flujo vaginal y humor acuoso

Evaluation of ITS3 and ITS4 primers for detection of *Candida* spp. *Candida* spp. infections from vaginal samples and aqueous humor

Juan Felipe Ramirez<sup>1</sup>, Alejandra de la Torre<sup>1</sup>

## Resumen

**Antecedentes.** Los métodos convencionales para la identificación de levaduras del género *Candida* requieren mucho tiempo, necesitan cantidad importante de la muestra y, en muchos casos, es necesario realizar cultivo.

**Objetivos.** Evaluar un par de cebadores para la identificación de levaduras del género *Candida* y demostrar su potencial aplicación para el diagnóstico de infecciones intraoculares.

**Materiales y métodos.** Se utilizaron 17 cepas de referencia, 29 aislamientos clínicos de flujo vaginal, 7 muestras de humor acuoso y una de humor vítreo. Evaluamos tres métodos para el rompimiento de la pared celular: congelación-descongelación, sonicación, y la enzima liticasa. Para la purificación del ácido nucleico, se utilizó en los tres casos el estuche comercial *Wizard Genomics*; en la reacción de PCR, el estuche comercial *Go Taq Green Master Mix* y los iniciadores ITS3 e ITS4 a una concentración de 0,5  $\mu$ M.

**Resultados.** De los tres métodos el que mejor resultados ofreció fue el uso de enzima liticasa más el estuche comercial. Con los iniciadores ITS3 e ITS4 fue posible identificar las levaduras únicamente a nivel de género y no se presentó reacción cruzada con otros microorganismos comúnmente encontrados en diferentes muestras de tejido humano. La sensibilidad fue de 100 fg. Se lograron identificar por PCR todos los aislamientos a partir de flujo vaginal y de una muestra de humor acuoso. Para las demás muestras de humor acuoso el diagnóstico fue para otros agentes causales, entre ellos, *Toxoplasma* sp.

**Conclusión.** Consideramos que ésta es una metodología adecuada, la cual permite identificar levaduras del género *Candida* con gran sensibilidad y reproducibilidad.

**Palabras clave:** *Candida* spp., reacción en cadena de la polimerasa, PCR, uveítis, ITS, diagnóstico

<sup>1</sup> Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Correspondencia: Alejandra de la Torre, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Av. Bolívar 12N, Armenia (Quindío), Colombia, Tel/Fax +57 67 460168. E-mail: gepamol2@uniquindio.edu.co

Fecha de recibido: 18/03/2008; Fecha de aceptado: 08/05/2008

## Abstract

**Background.** Conventional methods for *Candida* identification are time consuming, require high amounts of the sample and in several cases the culture is mandatory.

**Aims.** To evaluate two primers for the identification of *Candida* and to demonstrate their application for intraocular infections.

**Materials and methods.** 17 *Candida* reference strains, 29 vaginal samples, 7 samples of aqueous humor and one of vitreous humor were studied. Three methods to lyse the *Candida* wall were analyzed: freezing-thawing, sonication and the use of lyticase. For nucleic acid purification the Wizard Genomics kit was used; in the PCR the commercial kit Go Taq Green Master Mix and the primers ITS3 and ITS4 were used.

**Results.** The best method for lysis was the enzymatic lysis with lyticase. The primers ITS3 and ITS4 identified all the *Candida* strains and there were no cross-reaction with other microorganisms. The sensitivity of the PCR was 100 fg. All the samples of vaginal flux and *Candida* strains were identified and only one sample of aqueous humor was positive for the genus *Candida*. In the other samples of aqueous humor toxoplasmosis was the definitive diagnosis.

**Conclusion.** PCR amplification for *Candida* is a sensitive and specific technique for the diagnosis.

**Key words:** *Candida* spp., polymerase chain reaction, PCR, uveitis, ITS, diagnostic

## Introducción

El género *Candida* está constituido por más de 180 especies, distribuidas alrededor de todo el mundo y que ocupan diferentes nichos (1-3). Son comensales de algunos miembros del reino animal y del vegetal, y pueden aislarse de objetos inanimados y del medio ambiente. Algunas de estas especies son comensales del hombre. Únicamente aisladas en la microbiota normal de la piel, las mucosas, el tubo digestivo y el sistema genitourinario (4), de los cuales, *Candida albicans* es la especie más representativa del género y puede ser aislada en cerca de 70% de la población sana (5).

De las especies de este género, se considera que sólo 18 son patógenos y son el agente causal de la candidiasis, una enfermedad que tiene la capacidad de comprometer múltiples tejidos, órganos y sistemas del ser humano. Su

potencial patógeno varía en forma considerable y el microorganismo más frecuente es *C. albicans*, especie del género capaz de generar con mayor frecuencia enfermedad mortal en pacientes inmunocomprometidos (6).

*C. albicans* es aislada en 85% a 90% de los casos de candidiasis vaginal. Esta enfermedad afecta el 70% a 80% de las mujeres, por lo menos, una vez durante su vida y, de ellas, entre 40% y 50% experimentan recurrencias (7). Con el aumento de las enfermedades que comprometen al sistema inmune, como sida, cáncer y terapia postoperatoria, y de los pacientes receptores de órganos, se ha generado el escenario perfecto para que muchas de las especies que eran comensales del humano se conviertan en patógenos oportunistas del mismo.

*C. albicans* es la mayor causa de candidiasis invasiva y es uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia de la sangre de pacientes en su período postoperatorio y de pacientes inmunocomprometidos, durante las últimas dos décadas (6-9).

Las infecciones causadas por hongos no suelen presentar un cuadro prodrómico definido, que permita identificar o definir el agente causal. Además, se carece de métodos diagnósticos, rápidos y sensibles, lo que resulta en un manejo inapropiado de la infección (4). Los métodos comúnmente usados, basados en el cultivo, poseen una sensibilidad estimada de 50% y requieren, por lo menos, de 48 horas para dar un diagnóstico (10).

Desde la aparición de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década del 80, se han venido llevando a cabo muchos esfuerzos para conseguir un par de iniciadores que permitan identificar cada una de las especies de importancia médica del género *Candida*, pero hasta el momento no ha sido posible. Gracias a que la PCR es una técnica versátil, se han desarrollado variantes de la misma; entre ellas, la más usada por su gran sensibilidad y el acceso rápido a los resultados, es la PCR en tiempo real. Es posible encontrar varias publicaciones en las que se usa la PCR en tiempo real y varios juegos de iniciadores, con el fin de diferenciar las especies del género *Candida* de importancia médica (11-15).

Para la identificación molecular de organismos patógenos se han usado diferentes secuencias como blanco, entre ellas, genes de ADN mitocondrial y genes que codifiquen para ARN ribosómico. Los genes de ARNr 18s, 5.8s y 26s, son en esencia idénticos en longitud y secuencia en todas las especies. Sin embargo, la longitud de la región ITS (*internal transcribed spacer*, o espaciador interno del transcripto) depende de la especie. La región ITS se localiza entre los

genes de ARNr 18s y 26s, y está dividida en la región ITS1 entre los genes 18s y 5.8s; y la región ITS2, entre los genes ARNr 5.8s y 26s. Por esta razón, son secuencias que se han utilizado como marcadores moleculares para la identificación de géneros y especies de hongos (16).

R. Wahyuningsih *et al.* utilizaron los cebadores ITS3 e ITS4 –que tienen como blanco la región ITS– en una PCR con gran sensibilidad para la detección de ADN de levaduras del género *Candida*, a partir de muestras de sangre. En este estudio no se determinaron los pesos moleculares para cada una de las especies utilizadas, y tampoco se usaron cepas de referencia como método de referencia para la validación de este método (17).

Es de suma importancia identificar el agente causal de la candidiasis (18), ya que muchas de estas especies presentan resistencia innata a los tratamientos antimicóticos (8). El desarrollo de un diagnóstico, rápido y sensible resultaría en una adecuada prescripción médica del tratamiento antimicótico temprano, beneficiando al paciente y mejorando su pronóstico y calidad de vida. Esto es de particular importancia en la candidiasis ocular en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales la presentación clínica es similar a la de muchos otros tipos de infección.

Con el siguiente trabajo pretendemos, por una parte, evaluar la capacidad de los iniciadores ITS3 e ITS4 para diferenciar las especies de importancia médica del género *Candida* (ya que en la literatura no se reporta ningún trabajo en el que se evalúe la capacidad de estos iniciadores para diferenciar las especies de éste género) y, por otra, aplicar la PCR con estos iniciadores en el diagnóstico de candidiasis en muestras de humor acuoso, con el fin de valorar su utilidad para la detección de infección intraocular.

## Materiales y métodos

**Muestras clínicas.** Se recolectaron dos tipos de muestras: fluidos intraoculares y muestras de flujo vaginal. Se obtuvieron 29 aislamientos a partir de flujo vaginal de mujeres que consultaron por vaginitis, en tres centros de atención de Armenia, que fueron positivas para candidiasis vaginal, por cultivo en Sabouraud con cloramfenicol y con prueba de tubo germinal positivo, las cuales se utilizaron para determinar la utilidad de la técnica para diferenciar entre especies del género *Candida*.

Se utilizaron siete muestras de humor acuoso y una muestra de humor vítreo de pacientes que consultaron al centro de salud de la Universidad del Quindío, por pérdida en la agudeza visual y lesiones oculares. En todos los pacientes

estaba indicado el procedimiento de paracentesis de la cámara anterior para toma de muestra de humor acuoso con el fin de realizar el diagnóstico etiológico; de ellos, sólo un paciente era positivo para VIH. Los pacientes a quienes se les tomó la muestra fueron informados del estudio y firmaron el correspondiente consentimiento.

**Análisis de las muestras de flujo vaginal.** Las muestras fueron tomadas por el personal del centro de salud con escobillón estéril, el cual se depositó dentro de un tubo de ensayo con solución salina estéril. Al recibirse la muestra en el laboratorio, en presencia de mecheros los escobillones fueron tomados y frotados suavemente sobre placas de Petri con agar Sabouraud y cloramfenicol (0,5 g/L) (*Scharlau Microbiology*, Barcelona, España). Cada una de las cajas de Petri fue incubada a 37 °C por 24 horas o menos si había aparición temprana de colonias sugestivas de *Candida* spp. Posteriormente, para la identificación de aislamientos, las colonias se sometieron a examen directo al microscopio. Si la morfología observada correspondía a blastoconidias, éstas eran repicadas en medio agar Sabouraud y cloramfenicol por aislamiento en estría múltiple.

Se hizo prueba de tubo germinal a todos estos cultivos en los que hubo crecimiento de colonias. Para ello, las colonias aisladas de cada una de las muestras se emulsionaron en 0,5 ml de suero humano y se incubaron por 2 horas en baño de maría a 37 °C, para luego ser observadas en el microscopio con aumento de 100X. La identificación bioquímica se hizo con los estuches comerciales *Rapid Yeast Plus System* (Remel) y *API 20 C AUX* (BioMérieux), y se siguieron las indicaciones del fabricante. Una vez las muestras fueron identificadas, se tomó de cada una un inóculo de 4 colonias y se almacenaron en crioviales de 2 ml que contenían una solución de glicerol al 10% (glicerol al 87%, Merck) en congelador a -70 °C (Revco, USA).

**Cepas de referencia.** Para determinar cuál era el peso molecular esperado del fragmento obtenido después de la PCR para cada especie, se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *C. albicans* IP121580 – ATCC28516, *C. albicans* IP1332 – ATCC26275, *C. albicans* IP118079 – ATCC2091, *C. parapsilosis* M 0500396, *C. parapsilosis* M 0500506, *C. krusei* ATCC6258, *C. glabrata* IP2114993 – ATCC66032, *C. tropicalis* M 0500391, *C. tropicalis* M 0500391, *C. tropicalis* M 0500362, *C. tropicalis* M 0500390, *C. dubliniensis* M 0500378 rugosa, *C. dubliniensis*, M 0500378, *C. guilliermondi* 3483, *C. guilliermondi* 3948, *C. famata* 4868 y *C. famata* 3484.

## Extracción y purificación del ADN de los aislados de *Candida* spp.

Para la extracción de ADN se probaron diferentes métodos con el fin de digerir la pared celular.

**Congelación-descongelación.** Se tomaron 10 µl de células de *Candida* spp. con un asa microbiológica y se suspendieron en 1 ml de agua destilada. La muestra se congeló a -80 °C durante 5 minutos, luego se calentó a 65 °C durante 5 minutos; este ciclo se repitió cinco veces (19,20).

**Sonicación.** Se tomaron 10 µl de células de *Candida* spp. con un asa microbiológica y se suspendieron en 1 ml de agua destilada. La muestra se cubrió con hielo y luego se sonicó a 30 Hertz por 30 segundos. Este paso se repitió tres veces (20,21).

**Digestión enzimática con liticasa.** Se tomaron 10 µl de células, luego se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en 293 µl de EDTA 50 mM, más 7 µl de liticasa 1U/µl. Se incubaron a 37 °C durante una hora (22).

Para la purificación del ADN, después de digerida la pared celular, se utilizó el estuche comercial *Wizard Genomics*, de la casa comercial Promega (USA) y se siguieron las especificaciones del fabricante (23).

**Cuantificación del ADN.** Se tomaron 10 µl de ADN, se resuspendieron en 990 µl de solución tampón de ADN de rehidratación (estuche comercial *Wizard Genomics*) y se midió la absorbancia de la muestra a 260 nm. La concentración se determinó teniendo en cuenta que una densidad óptica (OD) de 1, es igual a 50 µg/ml.

**Reacción en cadena de la polimerasa.** Para la reacción se empleó el estuche comercial *Go Taq Green Master Mix* de la casa comercial Promega (USA) y se siguieron las indicaciones del fabricante para un volumen final de 20 µl más 5 µl de ADN muestra. El cebador sentido ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') corresponde al gen 5.8S ARNr y el cebador inverso ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') corresponde al gen 28S ARNr. La concentración de los iniciadores fue de 0,5 µM. Los fragmentos esperados oscilan entre 300 y 500 pb.

Para la PCR se programó un ciclo inicial de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 minuto, una temperatura de anillado de 56 °C por 30 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C por 30 segundos y un ciclo final a 72 °C por 7 minutos.

Análisis de resultados y estimación de pesos moleculares. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Para la estimación de los pesos moleculares de los fragmentos, se utilizó el programa *UnScan Densitometer*, version 5.1 (Silk Corporation, USA), teniendo como patrón de peso molecular el plásmido Puc18 digerido con *HaeIII* escalonado de 100 pb hasta 1.000 pb, de la casa comercial *New England BioLabs* (USA)..

Especificidad de la PCR. Para determinar la especificidad de los cebadores se usó ADN de diferentes organismos: ADN de humano, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Toxoplasma gondii*, *Mus musculus* y *C. albicans*.

Sensibilidad de la PCR. Para determinar la sensibilidad de la PCR, se hicieron diluciones seriadas de ADN de *C. albicans* y luego se hizo amplificación para determinar cuál era la concentración mínima de ADN requerida para obtener productos de amplificación.

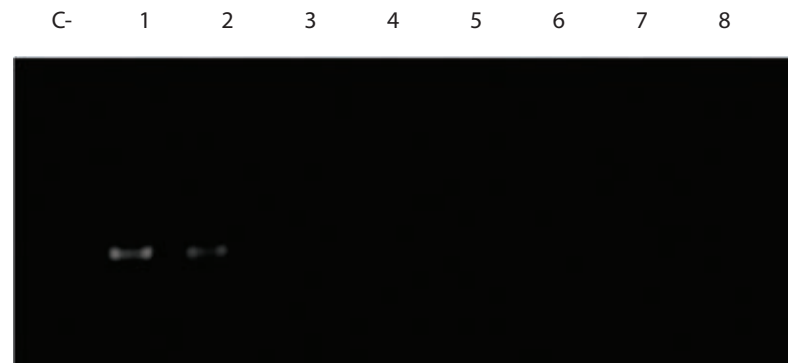
## Resultados

**Extracción de ADN.** De los métodos utilizados para obtener ADN de las levaduras del género *Candida*, sólo fue posible obtener concentraciones de ADN visibles en una electroforesis de agarosa con lisis enzimática y el estuche comercial *Wizard Genomics*.

**Sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores ITS3 e ITS4.** Para determinar la sensibilidad de la PCR, se tomaron concentraciones de ADN de la cepa de referencia de *C. albicans* IP121580 – ATCC28516 desde 10 ng a 1 fg. Se logró obtener amplificados hasta diluciones de 100 fg (figura 1). Del ADN de diferentes organismos utilizado para determinar la especificidad de la PCR, sólo fue posible obtener amplificados a partir del ADN de la especie del género *Candida* (figura 2). Debido a que no contábamos con aislamientos ni cepas de referencia de otros géneros de levaduras, para descartar posibles reacciones cruzadas, se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> sin encontrar valores significativos de E, lo que quiere decir que en la base de datos no hay secuencias con las cuales los iniciadores ITS3 e ITS4 anillen. Además, se accedió a las secuencias ITS de organismos como *Cryptococcus* spp. y *Pichia* spp., con el fin de hacer alineamientos con el programa ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. En ambos casos se encontró que por lo menos 10 de los nucleótidos no coincidían con la secuencia blanco. Para el caso de *Aspergillus* spp., el fragmento esperado es de 600 pb.

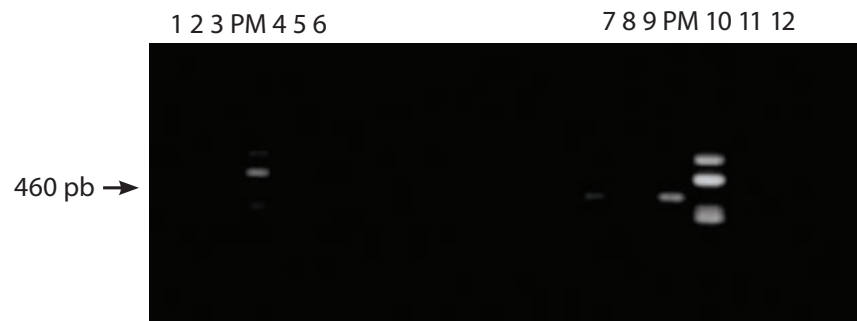
## FIGURA 1.

Sensibilidad de la PCR usando diluciones seriadas de ADN de la cepa de referencia IP121580 – ATCC28516. C-, control negativo; líneas 1) 10 ng; 2) 1 ng; 3) 100 pg; 4) 10 pg; 5) 1 pg; 6) 100 fg; 7) 10 fg; 8) 1fg.



## FIGURA 2.

Especificidad de la PCR utilizando los cebadores ITS3 e ITS4. Líneas: 1) ADN humano; 2) ADN *Klebsiella pneumoniae*; 3) ADN de *Mycobacterium tuberculosis*; 4) ADN *Escherichia coli*; 5) ADN *Toxoplasma gondii*; 6) ADN *Mus musculus*; 7) 8) 9) 10) y 11), aislamientos clínicos positivos para *Candida albicans* por la prueba de tubo germinal; 12), Control negativo; PM. Marcador de peso molecular *pUC18*.



**Estimación del peso molecular de los fragmentos obtenidos para cada especie evaluada en este estudio.**

Todas las muestras de vaginitis por *Candida*, según cultivo y prueba de tubo germinal, fueron positivas por PCR de las secuencias ITS. El análisis con el programa *UnScan* permitió estimar el peso molecular de las bandas obtenidas. La variación en los valores obtenidos no excedió el 10% entre lecturas. Al analizar los tamaños promedios obtenidos para cada cepa de referencia, se observó que no es posible diferenciar entre cepas de especies de *C. albicans* por este método, pues los tamaños de los fragmentos obtenidos son similares entre ellas y el rango de variabilidad se cruza entre una lectura y otra (tabla 1).



TABLA 1.

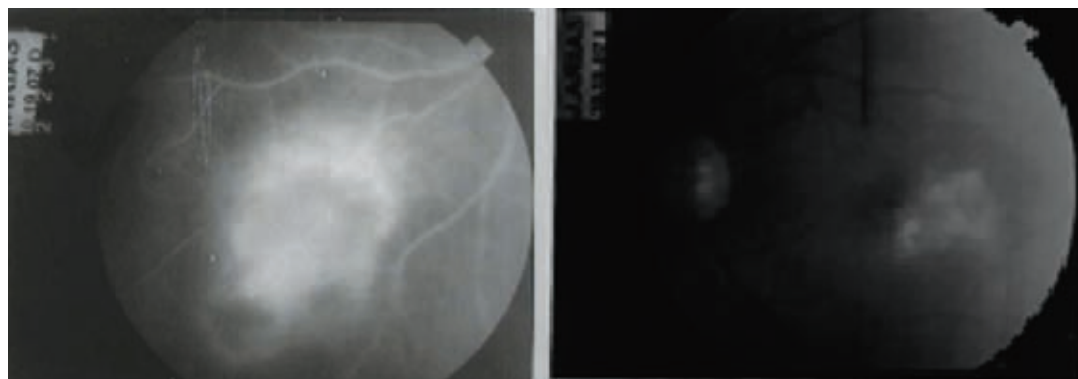
Tamaño del fragmento amplificado en pares de bases de las cepas de referencia obtenido por densitometría en tres ensayos diferentes más o menos la desviación estándar (DE)

CEPA	PROMEDIO DE PARES DE BASES ± DE
<i>C. albicans</i> IP121580 – ATCC28516	328 ± 24
<i>C. albicans</i> IP1332 – ATCC26275	332 ± 26
<i>C. albicans</i> IP118079 – ATCC2091	335 ± 29
<i>C. krusei</i> ATCC6258	383 ± 29
<i>C. tropicalis</i> M 0500362	367 ± 18
<i>C. tropicalis</i> M 0500390	335 ± 29
<i>C. tropicalis</i> M 0500391	328 ± 28
<i>C. tropicalis</i> M 0500361	273 ± 26
<i>C. dubliniensis</i> M 0500378	311 ± 23
<i>C. dubliniensis</i> M 0500396 lisa	322 ± 24
<i>C. parapsilosis</i> M 0500396 rugosa	300 ± 29
<i>C. parapsilosis</i> M 0500506	272 ± 34
<i>C. glabrata</i> IP2114993 – ATCC66032	280 ± 26
<i>C. guilliermondi</i> 3483	343 ± 38
<i>C. guilliermondi</i> 3948	350 ± 23
<i>C. famata</i> 4868	396 ± 30
<i>C. famata</i> 3484	314 ± 31

**Resultados en muestras de humor acuoso.** Todas las siete muestras de humor acuoso fueron negativas para *C. albicans* excepto una. De las muestras negativas, el diagnóstico clínico fue toxoplasmosis ocular en 4 y en la otras 2 no se especificó el diagnóstico. Una de las muestras de humor acuoso fue positiva para *Candida* spp. Este paciente presentó mejoría al ser tratado con anfotericina B endovenosa (figura 3).

FIGURA 3.

Foto de fondo de ojo. Paciente positivo para VIH, CD4+ 57 células/mm<sup>3</sup>. Al lado izquierdo el ojo derecho con extensa lesión inflamatoria de retinocorioiditis temporal inferior. Al lado derecho el ojo izquierdo con lesión macular de retinocorioiditis.





## Discusión

La PCR es una técnica de biología molecular que se ha introducido en la medicina como método diagnóstico. La identificación del agente causal de la candidiasis, independientemente del origen de la muestra, es de suma importancia para un tratamiento oportuno y adecuado del paciente, con miras a mejorar su pronóstico. La PCR ofrece una alternativa para un diagnóstico rápido y eficiente. Sin embargo, en *Candida* se ha presentado una gran dificultad para lograr una adecuada extracción del ADN.

De los métodos utilizados para la digestión de la pared celular de las levaduras del género *Candida*, se evaluaron dos físicos (sonicación y congelación-descongelación). Con estos no se logró la digestión de la pared celular, posiblemente debido a la fuerza y elasticidad de la pared celular que le es conferida por sus componentes  $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucán,  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucán, quitina y manoproteínas. Estos componentes contribuyen a que la levadura posea una membrana fuerte y elástica, resistente a múltiples condiciones ambientales (26).

El método que brindó mejores resultados fue el que empleó la enzima liticasa, de producción comercial y purificada a partir del sobrenadante de cultivos de *Cellulosimicrobium cellulans*, una bacteria Gram positiva. Esta enzima tiene actividad de endoglucanasa y proteasa, que le permite degradar  $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucán,  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucán, al igual que otras proteínas de la membrana celular (23). Para la purificación del ADN, se utilizó el estuche comercial *Wizard Genomics*, el cual es de amplio uso para la purificación de ácidos nucleicos, con una buena eficiencia y pureza en poco tiempo.

Para obtener amplificaciones a partir del ADN de cepas del género *Candida*, se requiere una concentración mínima de ADN muestra de 100 fg, lo cual hace de la PCR una técnica muy sensible; esto se debe a que en el genoma de las levaduras de este género se presentan, aproximadamente, 100 copias por genoma de la secuencia ITS (26). Las diferencias entre los tamaños de los fragmentos o las secuencias de las regiones ITS1-5.8S ADNr-ITS2, región ITS1 y ITS2, se han usado para detectar e identificar hongos.

En el presente trabajo, se evaluaron las posibles diferencias en el tamaño de las bandas observadas entre diferentes especies del género *Candida*, para determinar si son marcadores moleculares específicos para especies (26,16). Sin embargo, no fue posible diferenciarlas según el peso molecular obtenido, ya que, usando diferentes cepas de referencia de la misma especie, obtuvimos diferentes pesos moleculares y, de la misma manera, diferentes especies

presentaban fragmentos con pesos moleculares muy similares, lo cual está de acuerdo con lo reportado previamente (27). Estos autores compararon el sistema API20C con la secuencia de los productos de PCR obtenidos con los cebadores ITS3 e ITS4 y encontraron que esta secuencia es muy polimórfica dentro de aislamientos de la misma especie. Es necesario identificar secuencias específicas para especies en el futuro.

En este estudio se empleó ADN de diferentes organismos para determinar si con los cebadores ITS3 e ITS4 se presentaba reacción cruzada con alguno de ellos. No se presentaron reacciones cruzadas, gracias a que las secuencias ITS permiten identificar organismos que en algunos casos se encuentran filogenéticamente muy emparentados (28).

Además de las cepas de referencia usadas en nuestro estudio, logramos identificar levaduras del género a partir de muestras de flujo vaginal que hacían parte de la colección de cepas del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío. Todos estos aislamientos habían sido ya identificados como levaduras del género *Candida* por cultivo microbiano, prueba de tubo germinal y el estuche comercial API 20. Éstos permitieron la validación clínica de la PCR como método diagnóstico para infecciones del género *Candida* a partir de muestras clínicas que han sido pasadas por cultivo microbiológico.

Algunos autores han reportado las levaduras del género *Candida* como la principal causa de infección ocular micótica de origen endógeno en pacientes inmunosuprimidos. Sin embargo, las características clínicas de estas lesiones son muy similares a las manifestadas por otros organismos, como *T. gondii*, citomegalovirus y bacterias (30). Por esta razón, la PCR es de gran valor, gracias a su gran sensibilidad y especificidad, que permiten identificar de manera rápida a *Candida* spp. como agente causal de la infección ocular y prescribir un tratamiento adecuado para la infección. Este es el primer trabajo en el cual se usan los cebadores ITS3 e ITS4 para el diagnóstico de candidiasis a partir de muestras de humor acuoso.

En conclusión, la PCR con los cebadores ITS3 e ITS4 es muy sensible y permite identificar hongos del género *Candida* a partir de muestras con poca concentración de levaduras. Los cebadores ITS3 e ITS4 son muy buenos marcadores moleculares de género; sin embargo, no permiten tener resolución a nivel de especie.

## Referencias

1. Hoog Gs, Guarro J, Gene J, Figueras Mj. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Centralbureau loor Schimmelcultures/Universita Rovira i Virgili; 2000.
2. García ME, Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. Rev Iberoam Micol. 2000;17:S2-7.
3. Oliveira Gdos S, Ribeiro ET, Baroni F. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48:311-5.
4. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10:359-83.
5. Bennett RJ, Jonson AD. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. Annu Rev Microbiol. 2005;59:233-55.
6. López C, Giro L, Ramos L, Ramón S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Revista Argentina de Microbiología. 2005;37:16-21.
7. Bohannon NJ. Treatment of vulvovaginal candidiasis in patients with diabetes. Diabetes Care. 1998;21:451-6.
8. Montejo JC, Catalán M, Del Palacio A. Medidas de prevención de la candidiasis invasora en el paciente crítico no neutropénico. Rev Iberoam Micol. 2006;23:32-4.
9. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. J Clin Microbiol. 1998;36:3260-5.
10. Trtkova J, Raclavsky V. Molecular-genetic. Approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006;150:51-61.
11. Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;60:263-71.
12. Bergman A, Fernandez V, Holmström Ko, Claesson Be, Enroth H. Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26:813-8.
13. Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. Clin Microbiol Infect. 2006;12:745-53.
14. Bu R, Sathipalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez MI, Bhatia K. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. J Med Microbiol. 2005;54:243-8.
15. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V, Georgala A, Crokaert F. Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. J Mol Diagn. 2004;6:108-14.
16. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Microbiol. 2001;10:3617-22.
17. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol. 2000;8:3016-21.
18. García MS. Espectro clínico de la candidiasis invasora en el paciente crítico no neutropénico. Rev Iberoam Micol. 2006;23:8-11.
19. Fredlund E, Gidlund A, Olsen M, Börjesson T, Spliid NH, Simonsson M. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. J Microbiol Methods. 2008;73:33-40.
20. Jose JJM, Brahmadathan KN. Evaluation of simplified DNA extraction methods for EMM typing of group A *Streptococci*. Indian J Med Microbiol. 2006;24:127-30.
21. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. Anal Biochem. 2007;365:208-14.
22. Scott JH, Schekman R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. J Bacteriol. 1980;142:414-23.
23. Kaya G, Dale C, Maudlin I, Morgan K. A novel procedure for total nucleic acid extraction from small numbers of *Eimeria* species oocysts. Turkiye Parazitolo Derg. 2007;31:180-3.
24. Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. Biotechnol Lett. 2007;29:985-94.
25. Scott JH, Schekman R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. J Bacteriol. 198;142:414-23.
26. Travis H, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 2000;38:1510-5.
27. Xu J, Millar BC, Moore JE, McClurg R, Walker MJ, Evans J, Hedderwick S, McMullan R. Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections. J Clin Pathol. 2002;55:774-7.
28. Guarro J, Genéj, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999;3:454-500.
29. Fidel PL. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. Trends Microbiol. 2004;12:220-7.
30. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SL. Fungal and parasitic infections of the eye. Clin Microbiol Rev. 2000;13:662-85.