

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Biología Molecular

**Diagnóstico de candidiasis mediante
técnicas de PCR y de detección de
antígenos fúngicos**

TESIS DOCTORAL

Marta Ramos Rodrigo
Madrid, 2007

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Diagnóstico de candidiasis mediante
técnicas de PCR y de detección de
antígenos fúngicos**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por **Marta Ramos Rodrigo** para optar al grado de
Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Enero de 2007

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el **Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”**, bajo la dirección del Dr. Luis Carrasco Llamas.

Nuestro grupo de investigación agradece a la Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE) su colaboración en la financiación del proyecto de investigación que ha permitido llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

*A mis padres y hermano
y por supuesto a Dani*

Agradecimientos

Primero quisiera dar las gracias a Luis por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo, por enseñarme y animarme a continuar en los momentos críticos.

También agradecer a Ángeles su preocupación, apoyo y experiencia durante estos cuatro años de trabajo.

Millones de gracias a mis compañeros y amigos del 206. Ellos han sido un pilar muy importante en esta construcción, empezando por Rebe que se encargó de mis primeros pasos como doctoranda; pasando por Patri, Kike, Raqs, Vane, Raquel, Miguel Ángel, Alfredo y Rudi siempre dispuestos a ayudarme y aconsejarme; y como no, Diana y Su que durante estos casi 12 meses en Alemania no me han dejado de la mano ni un segundo con su apoyo y su servicialidad. Sois increíbles.

No quisiera olvidar a María, mi compañera de camino que es doctora desde hace unos meses, porque ha sido un ejemplo de tenacidad y lo ha conseguido contra viento y marea. Gracias a ti también por esos cafés tan reconfortantes.

Muchísimas gracias a Pilar M., Jal, Pilar, María, por todo lo que me habéis enseñado, por dedicarme vuestro valioso tiempo y por ser tan cercanos.

Gracias también a Alfonso por sus ánimos constantes, sus mañanas dedicadas a prepararme medios y sus maravillosos filtros, no sé lo que habría hecho sin ellos.

Por supuesto gracias a Ricardo por su preocupación y dedicación; y gracias también a mi enfermera favorita del pabellón B por la cantidad de tubos de sangre que ha sacado, colaborando de este modo en la elaboración de esta Tesis, por su alegría, su cercanía y su entrega.

Gracias muy especiales a todos los pacientes y voluntarios que me han donado su sangre porque es por ellos que ha sido posible la realización de este estudio.

No me puedo olvidar de mis amigos no científicos (Javi, Chus, Oli, Alberto, David, Ani, Jose, Bea, M^a Elena, Raúl, Miguel Ángel, Vir, Reichel, Ra, Vero B., Paloma, Marta, Marisa, Marina, Miriam, Juan, Jesús, etc.) muchos de los cuales han formado parte del grupo de donantes voluntarios además de aguantar todos mis lloros y frustraciones de estos años de tesis.

Pero principalmente, gracias a mi familia. A mis padres porque son ellos los que me han dado todo y más para llegar hasta aquí, son fantásticos. A mi hermano, mi guardián incondicional. A mi tía Margarita, mi segunda madre. A mi primo Abraham, mi otro hermano. Un lugar especial para mi abuela Elisa (la donante de mayor edad, el mayor ejemplo de fortaleza y una gran luz en mi caminar en la vida diaria) y para mi abuela Ramona (la mejor abuela política del mundo y el segundo mayor ejemplo de fortaleza y alegría que conozco). A Mari, Pedro, David y Abel (cuatro de mis donantes favoritos) por vuestro apoyo, vuestro cariño y vuestra preocupación constante. A Jose, Rosa, Javier, Laura, Guiller y Paula, siempre estáis ahí. Y por supuesto a Dani, mi marido, el pilar fundamental de mi vida, a veces mis manos y mi cabeza. Sin él no lo hubiera conseguido.

Índice

SUMMARY

| | |
|--------------|---|
| Summary..... | 1 |
|--------------|---|

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|-----------|
| 1. Los hongos patógenos..... | 3 |
| 1.1. Género <i>Candida</i> | 4 |
| 2. Diagnóstico de infecciones fúngicas..... | 7 |
| 2.1. Observación microscópica..... | 7 |
| 2.2. Cultivo..... | 7 |
| 2.3. Métodos independientes del cultivo..... | 8 |
| 2.3.1. Detección de antígenos..... | 8 |
| 2.3.2. Detección de anticuerpos..... | 9 |
| 2.3.3. Detección de metabolitos..... | 9 |
| 2.4. Detección de ADN..... | 10 |
| 3. La PCR como método diagnóstico..... | 11 |
| 3.1. Preparación de la muestra..... | 13 |
| 3.2. Extracción de ADN..... | 14 |
| 3.3. Detección e identificación del producto amplificado..... | 15 |
| 3.3.1. PCR ligada a ELISA..... | 17 |
| 3.3.2. Detección y cuantificación de los productos de PCR mediante la técnica de PCR a tiempo real..... | 17 |
| 4. Enfermedades de etiología desconocida: AZOOR, coroiditis multifocal, coroidopatía serpiginosa y esclerosis múltiple..... | 19 |
| 4.1. AZOOR..... | 21 |
| 4.2. Coroiditis multifocal..... | 22 |
| 4.3. Coroidopatía serpiginosa..... | 23 |
| 4.4. Esclerosis múltiple..... | 24 |

OBJETIVOS

| | |
|----------------|----|
| Objetivos..... | 27 |
|----------------|----|

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 1. Manipulación de levaduras..... | 29 |
| 1.1. Cepas..... | 29 |
| 1.2. Medio de cultivo para levaduras..... | 30 |
| 1.3. Mantenimiento y crecimiento..... | 30 |
| 1.4. Obtención de extractos de levadura para el análisis de proteínas..... | 30 |
| 1.5. Preparado de liofilizado de <i>C. famata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>R. mucilaginosa</i> para la inmunización de conejo..... | 30 |
| 1.6. Microscopía electrónica..... | 31 |
| 2. Manipulación de cultivos celulares..... | 31 |
| 2.1. Líneas celulares..... | 31 |
| 2.2. Medios de cultivo, mantenimiento..... | 32 |
| 3. Cepas de ratón..... | 32 |
| 3.1. Fijación en formol de los distintos órganos de la cepa de ratón Swiss... | 32 |
| 4. Extracción de linfocitos de sangre..... | 33 |
| 5. Manipulación de ácidos nucleicos..... | 33 |
| 5.1. Extracción de ADN..... | 33 |
| 5.1.1. Para células en suspensión (levaduras y células humanas)..... | 33 |
| 5.1.2. Para sangre..... | 34 |
| 5.1.3. Para tejido..... | 35 |
| 5.2. Separación electroforética de ADN..... | 36 |
| 5.3. Extracción de ácidos nucleicos de geles de agarosa..... | 36 |
| 5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 36 |
| 5.5. PCR anidada..... | 37 |
| 5.6. PCR cuantitativa a tiempo real (sondas TaqMan)..... | 37 |
| 5.7. Oligonucleótidos..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 6. Manipulación de proteínas..... | 38 |
| 6.1. Sueros y anticuerpos..... | 38 |
| 6.2. Inmunodetección de proteínas mediante western blot..... | 39 |
| 6.3. Dot-blot..... | 40 |
| 6.4. Fungitell..... | 41 |
| 7. Manipulación de sangre humana..... | 41 |
| 7.1. Extracción de sangre..... | 41 |
| 7.2. Hemocultivo..... | 41 |
| 7.3. Obtención de suero..... | 41 |
| 8. Inmunofluorescencia..... | 41 |
| 9. Inmunomicroscopía electrónica..... | 42 |
| 10. Análisis estadístico..... | 42 |

RESULTADOS

| | |
|--|-----------|
| 1. La PCR como método diagnóstico..... | 45 |
| 1.1. Diseño de oligonucleótidos..... | 46 |
| 1.1.1. Oligonucleótidos diseñados para hibridar con secuencias de ADN de levadura..... | 46 |
| 1.1.2. Oligonucleótidos diseñados para hibridar con secuencias de ADN humano..... | 50 |
| 1.1.3. Oligonucleótidos diseñados para hibridar con secuencias de ADN de ratón..... | 51 |
| 1.2. Optimización de la técnica de PCR..... | 51 |
| 1.2.1. Concentración de Cl_2Mg | 52 |
| 1.2.2. Temperatura de hibridación..... | 53 |
| 1.2.3. Polimerasas..... | 54 |
| 1.3. Especificidad de las parejas de oligonucleótidos..... | 55 |
| 1.4. Amplificación de ADN de levaduras empleando los oligonucleótidos ITS..... | 57 |
| 1.5. PCR anidada..... | 58 |
| 1.6. PCR cuantitativa..... | 59 |

| | |
|--|------------|
| 2. Métodos de extracción..... | 61 |
| 2.1. Extracción de ADN de células en suspensión (levaduras)..... | 62 |
| 2.2. Extracción de ADN de sangre..... | 63 |
| 3. Sensibilidad de los métodos de extracción de ADN y de las técnicas de PCR..... | 64 |
| 3.1. Levaduras en suspensión..... | 65 |
| 3.2. Monocitos THP-1 en suspensión..... | 68 |
| 3.3. Mezcla de levaduras y monocitos THP-1 en suspensión..... | 69 |
| 3.4. Mezcla de sangre humana y levaduras..... | 70 |
| 4. Diagnóstico de infecciones fúngicas mediante técnicas inmunitarias: detección de antígeno, componentes no antigénicos y anticuerpos en suero | 72 |
| 4.1. Detección de antígenos fúngicos: dot-blot..... | 73 |
| 4.1.1. Inmunodetección mediante fluorescencia..... | 73 |
| 4.1.2. Inmunodetección mediante western blot..... | 75 |
| 4.1.3. Inmunomicroscopía electrónica..... | 76 |
| 4.1.4. Optimización de la técnica de dot-blot..... | 77 |
| 4.2. Detección de componentes fúngicos no antigénicos: <i>Fungitell</i> | 79 |
| 4.3. Detección de anticuerpos: inmunofluorescencia..... | 79 |
| 5. Ensayos clínicos..... | 80 |
| 5.1. Pacientes diagnosticados con candidiasis crónica y pacientes sanos... | 80 |
| 5.2. Otros pacientes..... | 89 |
| 5.2.1. Azoor y patologías relacionadas..... | 89 |
| 5.2.2. Esclerosis múltiple..... | 107 |
| 6. Relación entre distintos tipos de enfermedades y presencia de hongo en los individuos que las padecen..... | 119 |
| 6.1. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a <i>C. albicans</i> | 119 |
| 6.2. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a <i>C. glabrata</i> | 120 |
| 6.3. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a <i>C. tropicalis</i> | 121 |

| | |
|--|-----|
| 6.4. Relación entre enfermedades y presencia de ADN fúngico en sangre..... | 122 |
|--|-----|

DISCUSIÓN

| | |
|---|-----|
| 1. Sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCR..... | 125 |
| 2. Sensibilidad y especificidad de la técnica de dot-blot..... | 127 |
| 3. Aplicación de los diversos métodos diagnósticos desarrollados en este trabajo en pacientes afectados de candidiasis crónica..... | 128 |
| 4. Presencia de componentes fúngicos en sangre y suero en pacientes con enfermedades oculares o esclerosis múltiple..... | 129 |
| 4.1. Enfermedades oculares (AZOOR, corodopatía serpiginosa o coroiditis multifocal) y hongos..... | 130 |
| 4.2. Esclerosis múltiple y hongos..... | 134 |
| 5. Análisis estadístico..... | 138 |

CONCLUSIONES

| | |
|-------------------|-----|
| Conclusiones..... | 139 |
|-------------------|-----|

BIBLIOGRAFÍA

| | |
|-------------------|-----|
| Bibliografía..... | 141 |
|-------------------|-----|

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|-----|
| Abreviaturas..... | 157 |
|-------------------|-----|

ANEXO

| | |
|-------|--|
| Anexo | |
|-------|--|

Summary

Fungi can cause a number of diseases ranking from localized mild infections to deep-seated mycoses. Invasive fungal infections are more prevalent due to the increasing number of high-risk patients, with different degrees of immunosuppression.

Nowadays, the diagnosis of fungal infections remains a significant problem. The clinical presentation is difficult to interpret, and the findings of noninvasive methods (computed tomographic scanning and X ray) are not specific. Culture results are available at the earliest in 2 to 3 days, and blood and deep-tissue sample cultures from infections with focal lesions are frequently negative. Direct microscopy and histopathological examination are rapid, but they do not always allow identification of the infecting agent to the species level. In contrast, even though the latest generation of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for circulating *Aspergillus* and *Candida* antigens are specific, they lack sensitivity. Thus, rapid methods that are sensitive and specific are needed.

In this Doctoral Thesis a sensitive and specific PCR method and dot immunobinding assay to detect very low levels of fungi components in blood samples have been successfully developed.

On the other hand, despite efforts during the last few years to elucidate the cause of AZOOR, multifocal choroiditis, serpiginous choroiditis and some neurodegenerative diseases like multiple sclerosis, this has not been achieved. Intensive research for an infectious agent that may directly provoke or trigger these diseases has been carried out in many laboratories. A number of viruses, mostly from the herpesvirus group, have been pointed out as the culprit. In the present PhD Thesis we have study the possibility that AZOOR, multifocal choroiditis, serpiginous choroiditis and multiple sclerosis may have a fungal origin.

Our results provide evidence that in most of the patients studied there are signs of fungal infection. A high percentage of these patients contain fungal genomes and fungal antigens in blood. Thus, some of these patients exhibit high antibody titers against several *Candida spp.* and several of them contain significant amounts of β -1,3 glucan in serum.

Anyway, to distinguish if fungal infections are the cause or a consequence of these diseases, it must be necessary to extend this study with a higher number of patients and to carry out clinical trials with antifungal compounds.

INTRODUCCIÓN

1. Los hongos patógenos

Existen alrededor de unas 100.000 especies identificadas dentro del grupo de los hongos, de las cuales solamente alrededor de 200 son patógenas para el hombre (Carline, 2001). Los tipos de infección que causan los hongos se pueden clasificar de diferentes formas. Por un lado, en función de si la infección tiene lugar en una persona sana o por el contrario se produce en personas inmunosuprimidas (infecciones oportunistas). Por otro lado, se puede hacer distinción en función de su distribución anatómica. Si la infección se produce en las capas más superficiales de la piel se denominan infecciones cutáneas o subcutáneas, también denominadas infecciones superficiales; si por el contrario han penetrado a través de la barrera epitelial llegando a la sangre (fungemia) y diseminándose por todo el organismo se denominan micosis diseminadas, profundas o sistémicas (Coleman *et al*, 1998; Pfaller, 1996).

Las infecciones superficiales siguen unos patrones clásicos en cuanto a etiologías, diagnóstico y tratamiento, a diferencia de las infecciones sistémicas graves, que además están aumentando en frecuencia y gravedad. Esto es debido en gran medida al incremento de sujetos con alteraciones en su estado inmune por causas como: edades extremas de la vida, ciertas enfermedades (hematológicas, neoplasias, diabetes, inmunodeficiencias, sida,

infecciones crónicas), traumas (quemaduras extensas), algunos tratamientos (quimioterapia, radioterapia, corticoides, antibióticos, nutrición parenteral, trasplante de órganos), técnicas instrumentales diagnósticas o terapéuticas agresivas (catéteres, sondas, cirugía extensa, prótesis exógenas, cuerpos extraños), ciertos hábitos (adicción a drogas), etc. (Altamura *et al*, 2001; Clark and Hajjeh, 2002; Clemons *et al*, 2000; Makni *et al*, 2000; Pemán, 2001).

La evaluación cualitativa y cuantitativa del impacto de las micosis invasoras se completa en nuestros días con la aparición de nuevas formas clínicas de micosis no descritas, debido a la variación de los tipos de hongos patógenos y su selección como resultado de la exposición a diversos antifúngicos. Este cambio se manifiesta tanto en la mayor gravedad de las infecciones causadas por hongos conocidos (*Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*), como en la detección de nuevos patógenos; entre ellos se encuentran diferentes especies de levaduras oportunistas (*Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, etc.) (Al-Hedaithy, 2003; Almirante *et al*, 2006; Brandt *et al*, 2000; Canteros *et al*, 1994; Fanci *et al*, 2005; Kao *et al*, 1999; Kremèry, 2002; Malani *et al*, 2001; Meis *et al*, 1999; Peres-Bota *et al*, 2004; Pfaller *et al*, 2003; Prinsloo *et al*, 2003; Ruhnke, 2006; Sullivan *et al*, 1995; Tortorano *et al*, 2006; Veldman *et al*, 2006; Wagner *et al*, 2005; Yamamoto *et al*, 2002; Yang *et al*, 2003); *Hyalohyphomycetes* como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, especies de *Zygomycetes* (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*) (Marr *et al*, 2002; Wald *et al*, 1997); de *Phaeohyphomycetes* (*Alternaria*, *Bipolares*, *Curvularia*), *Pneumocystis carinii* y otros (Clark and Hajjeh, 2002), capaces de causar sinusitis, infecciones cutáneas, endoftalmitis, neumonía, infección rinocerebral, etc., cursando en ocasiones con fungemia.

1.1. Género *Candida*

Dentro del grupo de infecciones oportunistas causadas por hongos, el género *Candida* es uno de los más importantes debido a su recurrencia y a la gravedad de las infecciones que provoca. Este género pertenece a la familia *Cryptococcaceae*, dentro del orden Deuteromycota (hongos imperfectos), y está compuesto por más de 200 especies diferentes que se encuentran distribuidas de forma ubicua en el entorno. Dado que muchas de las especies de *Candida* son anamorfas y carecen de características sexuales (figura 1), que son las principales características morfológicas en que se basa la clasificación de hongos, la taxonomía de este grupo heterogéneo de levaduras en base a características morfológicas es subjetiva.

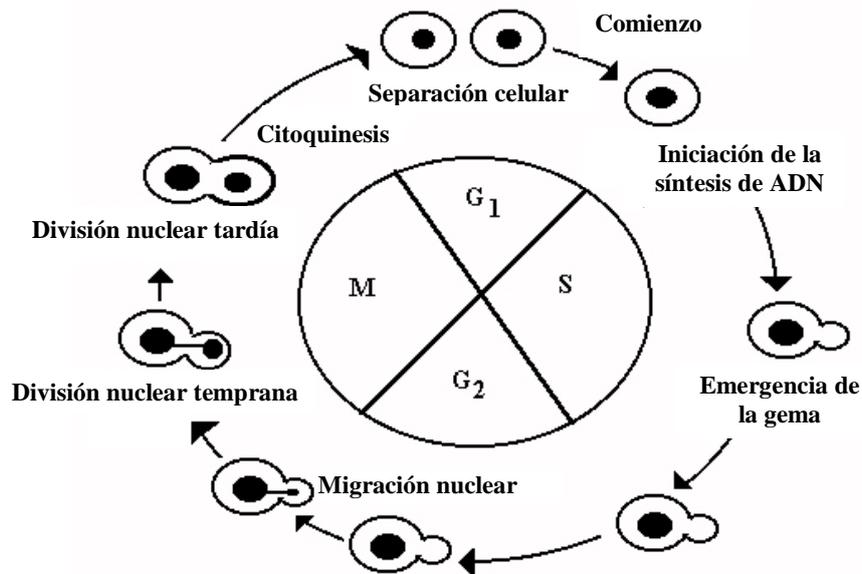


Figura 1. Ciclo de vida de las especies anamorficas de *Candida*

Muchas de estas especies forman parte de la flora humana normal de la piel y los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio (Kam and Xu, 2002). Sin embargo, aproximadamente una docena de especies del género *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*) están asociadas con enfermedades en humanos (Canteros *et al*, 1994; Prinsloo *et al*, 2003; Ruhnke, 2006; Wagner *et al*, 2005; Wiley, 2005). El potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable, siendo el microorganismo más virulento *C. albicans* que es capaz de generar con mayor frecuencia enfermedad mortal en seres humanos (Castro, 2001; Kremèry, 2002; Malani *et al*, 2001; Pfaller *et al*, 1999). *C. tropicalis* es la segunda levadura en importancia en cuanto a patogenicidad y *C. parapsilosis* también aparece asociada a micosis oportunistas (Malani *et al*, 2001). Sin embargo, no todas las cepas de una misma especie presentan igual capacidad patogénica (Matthews, 1998).

Otras especies de *Candida* causan algunas infecciones, pero en esos casos la debilidad del huésped debe ser muy marcada para permitir que estos microorganismos menos virulentos lo invadan. Se deben presentar algunas alteraciones en las defensas celulares del huésped, en la fisiología, o en la composición de la flora normal para que pueda producirse la colonización, infección y finalmente la enfermedad por levadura (López, 2005; Wiley, 2005).

Además de la situación inmunológica del hospedador, hay rasgos asociados a la levadura que también son muy importantes en el desarrollo de una candidiasis. El conjunto de factores que dota a un microorganismo de la capacidad para causar enfermedad se conoce como virulencia. En el caso del género *Candida*, como ocurre en cualquier microorganismo patógeno, el principal factor de virulencia es la habilidad de adherirse al tejido del

hospedador. Para ello es necesario que la levadura sea capaz de reconocer y unirse a componentes de la matriz extracelular o de la membrana citoplasmática de las células. Esto le permite establecer una unión firme con diferentes superficies, evitando así, ser arrastrada por las secreciones del hospedador, como pueden ser la saliva o el sudor (Reiss and Morrison, 1993). Los receptores de las células del hospedador para las adhesinas (proteínas de adhesión de las cándidas) son, entre otras, la fibronectina y los componentes del complemento, así como la región glucosídica de los glucolípidos y glicoproteínas de las superficies celulares del hospedador (Gil, 1997; Wiley, 2005). Por otro lado, se ha descrito una larga familia de proteínas conocida como familia ALS (alpha-agglutinin-like sequence) que también está implicada en las interacciones de adhesión entre la levadura y las células del hospedador (Calderone and Fonzi, 2001; Wiley, 2005).

Otro factor de virulencia es el conocido como “cambio fenotípico”, por el que ciertas colonias de una misma cepa sufren mutaciones que dan lugar a alteraciones en la morfología de las células que la constituyen, mostrando diferente tamaño, textura o color. Estas mutaciones, que son reversibles, también producen variaciones en los factores de virulencia. Posiblemente esta sea la forma en que las levaduras que carecen de reproducción sexual, generen diversidad para facilitar su adaptación a diferentes ambientes y para evadir la respuesta inmune del hospedador (Wiley, 2005). Por otra parte, las levaduras del género *Candida* producen una serie de enzimas extracelulares capaces de digerir proteínas del hospedador. Entre ellas se encuentran proteasas, elastasas y fosfolipasas que destruyen el tejido y ayudan a la penetración del microorganismo (Gil, 1997).

Por otro lado, cada vez está más claro que algunas especies de *Candida* actúan formando pequeñas comunidades que se unen a la superficie de la matriz extracelular, cubriéndola. Estas comunidades se conocen como biopelículas y tienen la capacidad de tolerar mejor los antifúngicos. Por ejemplo, *C. albicans* y *C. parapsilosis* forman biopelículas en las superficies de los catéteres de plástico, lo que explicaría el alto nivel de asociación entre estas especies y las infecciones ocasionadas por la implantación de catéteres (Wiley, 2005).

La patogenicidad del género *Candida* es un proceso muy complicado y multifactorial, con un enorme abanico de factores de virulencia que actúan en diferentes microambientes y que contribuyen a la supervivencia y proliferación del organismo. En resumen, el proceso infeccioso de *Candida* podría sintetizarse en cuatro pasos: (1) las células de *Candida* se adhieren a la superficie de las células epiteliales a través de la interacción entre sus adhesinas y los ligandos del hospedador. (2) Una vez las cándidas están unidas al tejido, empiezan a

proliferar. (3) El crecimiento continúa dando lugar a la formación de biopelículas. (4) Las células fúngicas eventualmente penetran a través de la barrera epitelial a los tejidos, alcanzando la sangre y diseminándose por todo el cuerpo.

2. Diagnóstico de infecciones fúngicas

Dada la alta letalidad de las infecciones causadas por ciertos hongos y las diferencias de sensibilidad de las distintas especies fúngicas a los antimicóticos disponibles en la actualidad, la pronta identificación de éstos es crítica para realizar una elección apropiada del tratamiento. Sin embargo, el diagnóstico etiológico de las enfermedades causadas por hongos desde el punto de vista clínico es muy difícil, debido fundamentalmente a la ausencia de síntomas característicos. Por ello hay que recurrir al diagnóstico microbiológico. Los métodos de diagnóstico microbiológico los podemos clasificar de la siguiente manera: 1) observación microscópica, 2) métodos basados en el cultivo, y 3) métodos independientes de cultivo: detección de antígenos y anticuerpos, detección de metabolitos, y detección de otros componentes estructurales.

2.1. Observación microscópica

La observación microscópica directa de las muestras es una técnica sencilla y recomendable puesto que en muchas ocasiones permite un diagnóstico presuntivo. Por otro lado, la realización de tinciones permite diferenciar algunos hongos por su morfología, así como evidenciar la reacción tisular y la invasión de tejidos propios de la infección, disminuyendo así el tiempo requerido para el diagnóstico. Como inconvenientes cabe destacar la existencia de falsos positivos y negativos, la sensibilidad variable, dependiendo del microscopista y del tipo de muestra, y el hecho de tener que partir en muchas ocasiones de muestras obtenidas mediante técnicas invasoras, que puede estar contraindicado en el paciente inmunodeprimido (Alexander, 2002; Chen *et al*, 2002; Pemán, 2001).

2.2. Cultivo

El cultivo es el patrón de referencia del diagnóstico microbiológico ya que permite la identificación del agente etiológico, la realización de estudios de sensibilidad y de tipificación molecular. Sin embargo presenta inconvenientes, entre los que podemos destacar de nuevo la necesidad de obtener muestras mediante técnicas invasoras, la

posibilidad de contaminación de la muestra, la no diferenciación entre infección y colonización, baja sensibilidad (positividad en menos del 50% de los casos) y lentitud, puesto que se requieren varios días para llegar al diagnóstico (Castro, 2001).

2.3. Métodos independientes del cultivo

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas, independientes del cultivo, con la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para obtener un diagnóstico fiable. Las principales técnicas se pueden clasificar como: detección en sangre de antígenos o anticuerpos, detección de metabolitos y detección de otros componentes fúngicos.

2.3.1. Detección de antígenos

Un antígeno es una molécula de superficie celular que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos. Para la detección de antígenos se utilizan principalmente técnicas inmunoenzimáticas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo.

Los marcadores antigénicos ideales para detectar una infección fúngica serían aquellos que estuviesen de forma permanente en el paciente y que permitiesen diferenciar entre colonización e infección. Otras características que deberían tener serían que estuviesen conservados dentro de las especies fúngicas de interés, que no reaccionaran con antígenos de origen humano o de otros microorganismos y que por supuesto, estuviesen presentes pronto en la infección para iniciar la terapia lo antes posible.

Los primeros antígenos empleados para la realización de un diagnóstico fueron los mananos y galactomananos (Pontón, 2006; Yeo and Wong, 2002). Sin embargo, estos polisacáridos son rápidamente eliminados de la circulación mediante la formación de complejos inmunes y mediante fagocitosis, disminuyendo la sensibilidad de la técnica. A pesar de los diferentes antígenos estudiados (enolasa, aspartil proteínasa, ect.) (Ishibashi *et al*, 2005; Mitsutake *et al*, 1996; Pontón, 2006), la detección de antígenos en pacientes con micosis invasoras no ha permitido solucionar el problema diagnóstico que presentan estas infecciones, entre otras razones porque un resultado positivo, no revela la especie de hongo de la que se trata (Quindos *et al*, 2004; Yeo and Wong, 2002).

2.3.2. Detección de anticuerpos

Los anticuerpos son un tipo de proteínas producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas que puedan ser una amenaza para el organismo: como químicos, partículas de virus, esporas o toxinas de bacterias. Entre las técnicas más empleadas en la detección de anticuerpos se encuentran: la inmunofluorescencia y las técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA o análisis mediante dot-blot.

A pesar de la larga experiencia acumulada en el campo de la detección de anticuerpos frente a hongos, en los últimos años se ha cuestionado la utilidad de esta técnica en pacientes con infecciones fúngicas invasoras, debido a que puede presentar dos limitaciones importantes: 1) la detección de títulos altos de anticuerpos en pacientes que están sólo colonizados por hongos y 2) la respuesta de anticuerpos puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunocomprometidos (Castro, 2001; Ellepola and Morrison, 2005; Pontón, 2006).

La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección es otra alternativa para el diagnóstico de las micosis. Esta posibilidad es más reciente que la detección de anticuerpos y antígenos y se encuentra en desarrollo. Actualmente se basa en la detección de metabolitos como el D-arabinitol, de componentes de la pared celular como el (1-3)- β -D-glucano y de otros componentes fúngicos como el ADN.

2.3.3. Detección de metabolitos

Detección de D-arabinitol

El D-arabinitol es un metabolito (un alcohol) producido por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefir* cuando se alimentan de un azúcar denominado arabinosa y que puede detectarse mediante cromatografía de gas-líquido o mediante técnicas enzimáticas en suero y orina. Se han detectado niveles elevados de D-arabinitol en pacientes con candidiasis invasora y su monitorización ha mostrado ser útil en el seguimiento de estos pacientes (Pemán, 2001). La técnica presenta falsos positivos en pacientes con insuficiencia renal o en tratamiento con esteroides. Por este motivo, suele ser necesario ajustar las concentraciones de D-arabinitol con respecto a las de creatinina o L-arabinitol (Alexander, 2002; Ellepola and Morrison, 2005; Pemán, 2001; Pontón, 2006; Reiss and Morrison, 1993; Yeo and Wong, 2002). El D-arabinitol se aclara por los riñones al mismo ritmo que la

creatinina y por tanto, la proporción arabinitol/creatinina corrige las variaciones en el suero de D-arabinitol debidas a la función renal. Por otro lado, es posible diferenciar el arabinitol producido por *Candida* del arabinitol generalmente encontrado en humanos. Mientras que *Candida* produce sólo D-arabinitol, los humanos producen sólo L-arabinitol, por lo que la proporción D-arabinitol /L-arabinitol es útil para diferenciar pacientes con CI de los que tienen fallo renal (Skladny *et al*, 1999).

Detección de (1-3)- β -D-glucano

El glucano es un componente de la pared celular fúngica formado por monómeros de glucosa unidos con enlaces β (1-3) y β (1-6).

La detección de (1-3)- β -D-glucano en plasma es otra posibilidad diagnóstica en las micosis producidas por *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis*. Este polisacárido no se encuentra en bacterias ni en virus y en mamíferos aparece en niveles muy bajos. Puesto que el ser humano carece de glucanasas para digerirlo, su eliminación de la circulación es lenta (Ellepola and Morrison, 2005; Pontón, 2006). Se ha observado además, que el (1-3)- β -D-glucano da positivo en sangre una media de diez días antes que el cultivo (Pontón, 2006). El inconveniente que presentan las pruebas para detectar (1-3)- β -D-glucano es que pueden aparecer falsos positivos en pacientes sometidos a hemodiálisis con aparatos que tengan membranas de acetato de celulosa (contienen (1-3)- β -D-glucano) o en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, algunos agentes anticancerosos o sulfamidas (Pemán, 2001; Pontón, 2006).

2.4. Detección de ADN

La aplicación de técnicas de biología molecular que permiten la detección de los ácidos nucleicos fúngicos es, sin duda, el mayor progreso tecnológico en el campo de la detección directa de los hongos en muestras clínicas. En este contexto, se han desarrollado distintos procedimientos para la amplificación de diversas señales que permiten ser identificadas posteriormente (Chen *et al*, 2002), entre las que sin duda la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es la técnica más empleada. Ésta permite realizar amplificaciones de una pequeña cantidad de ADN fúngico de forma rápida y sensible, constituyendo un procedimiento adecuado para el diagnóstico de las micosis invasoras (Guzmán, 2004). A continuación se tratará más en profundidad la aplicación de la PCR en el diagnóstico fúngico.

3. La PCR como método diagnóstico

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o técnica de PCR es un método enzimático que permite sintetizar numerosas copias de un fragmento concreto de ADN. Para ello se utilizan como cebadores dos oligonucleótidos complementarios a lo que serán los extremos del producto, colocados con sus terminales 3'OH enfrentados. Se amplifica el ADN comprendido entre ambos oligonucleótidos (figura 2). La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde, hibridación con los cebadores y extensión de la síntesis por la acción de la ADN polimerasa, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos estarán definidos por los extremos 5' de los cebadores. Al poder ser utilizados los productos de un ciclo como moldes del ciclo siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo (Rojo, 2001).

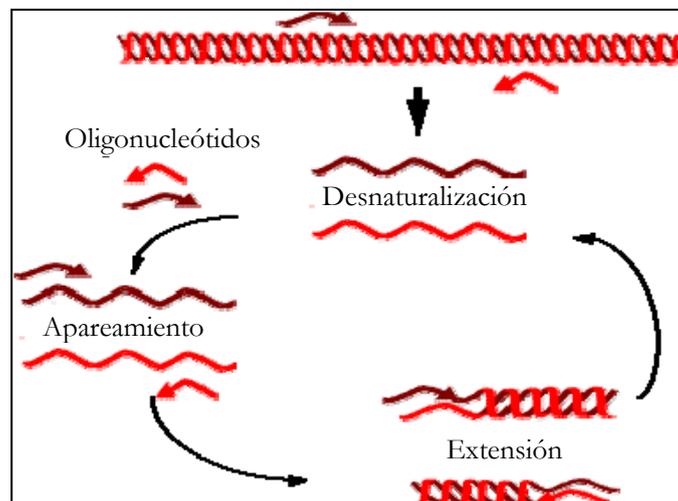


Figura 2. Esquema del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Existen diferentes tipos de PCR:

- PCR anidada (nested): Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.
- PCR *in situ*: PCR realizada sobre preparaciones fijas sobre un portaobjetos.
- PCR múltiple: PCR en la que se amplifica más de una secuencia en una misma reacción.
- RT-PCR: el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, como Tth, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).

- PCR a tiempo real: Permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN amplificado en cada momento. Para la detección de la cantidad de ADN específico se emplea una *sonda* unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*). Cuando la sonda está intacta, estos fluorocromos presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, como consecuencia de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

La técnica de PCR se utiliza para detectar enfermedades genéticas, determinar el sexo en embriones humanos, clonar genes, para mutagénesis *in vitro* y para mapeo y secuenciación de genomas, entre otras aplicaciones

En el diagnóstico de infecciones fúngicas, la PCR permite diseñar procedimientos que pueden detectar, a partir de una secuencia única, cualquier tipo de hongo (Hall *et al*, 2003; Nishikawa *et al*, 1997), o bien más específicamente seleccionar las secuencias que detectan uno determinado (Kappe *et al*, 1998; Nishikawa, 1999). Así, se puede realizar una detección de manera más o menos específica utilizando iniciadores dirigidos a secuencias únicas y específicas de una especie fúngica, dianas formadas por genes multicopia o iniciadores universales comunes a todos los hongos. Tanto la utilización de iniciadores universales como absolutamente específicos, depende del contexto clínico y epidemiológico en que vayan a utilizarse (Hall *et al*, 2003; Kappe *et al*, 1996; Kappe *et al*, 1998). Por otro lado, la utilización de un gen multicopia o un gen único como diana, es un parámetro determinante para la sensibilidad del ensayo de PCR (Chen *et al*, 2002).

Los ensayos en los que se utilizan iniciadores con diana en genes multicopia presentan una alta sensibilidad debido al elevado número de moléculas diana que detectan. Los genes multicopia más estudiados son los que codifican para los ARN ribosómicos 18S, 5.8S y 28S. Separando el gen 18S y el gen 5.8S se encuentra la región intergénica ITS1 (*internal transcribed spacer 1*) y entre los genes 5.8S y 28S la ITS2 (*internal transcribed spacer 2*). Los genes ribosómicos presentan regiones altamente conservadas (Kappe *et al*, 1996; Michot *et al*, 1984) lo que permite el diseño de oligonucleótidos universales (Jakoby, 1979; Kappe *et al*, 1998; Nishikawa *et al*, 1997; Nishikawa, 1999; Pryce *et al*, 2003; Skladny *et al*, 1999; van Deventer *et al*, 1995). Sin embargo, las regiones ITS adyacentes son hipervariables en secuencia y tamaño, lo que permite la identificación de una especie concreta (de Llanos

Frutos *et al*, 2004; Guzmán, 2004; Korabecna *et al*, 2003; Li *et al*, 2003). Otros genes multicopia empleados son el gen de la aspartil proteinasa secretada de *C. albicans* y el gen mitocondrial de *Aspergillus* (Bretagne *et al*, 1998; Bretagne *et al*, 1995; De Bernardis *et al*, 2001; Jones *et al*, 1998).

Por otro lado, también se han realizado ensayos en los que los genes diana se encuentran en una única copia en el genoma. Estos experimentos normalmente son muy específicos pero no tienen la sensibilidad suficiente para detectar pequeñas cantidades de ADN fúngico en las muestras. Dentro de este grupo se han utilizado el gen de la actina, el gen de la quitinsintetasa y el gen de la proteína de respuesta a estrés calórico HSP 90 entre otros (Crampin and Matthews, 1993; Jordan, 1994; Kan, 1993).

Sin embargo, a pesar de las ventajas mostradas por los métodos de detección de hongos basados en la técnica de PCR, éstos presentan un problema generalizado que es la falta de estandarización (Chen *et al*, 2002). Por ello, es recomendable seguir una serie de pautas especialmente en los pasos más significativos del proceso de esta técnica: (1) preparación de la muestra, (2) método post-PCR para identificar el producto amplificado, (3) estandarización de la reproducibilidad de la técnica y (4) precauciones para minimizar los resultados falsos negativos y falsos positivos.

3.1. Preparación de la muestra

Aunque la muestra óptima para el diagnóstico puede diferir según el caso y la enfermedad que se estudie, en la práctica el espécimen más empleado para la realización de un diagnóstico mediante PCR es la sangre completa, aunque también se utilizan sueros y muestras de tejidos. El procesamiento de la muestra varía según el tipo. Así, las muestras de sangre requieren un primer paso de lisis de eritrocitos y leucocitos, mientras que las biopsias de tejidos requieren normalmente un primer proceso de eliminación de la parafina en la que suelen venir incluidas. En general, la utilización de kits comerciales para el procesamiento de muestras tiene la ventaja de que están estandarizados (Fujita, 1995; Holmes *et al*, 1994).

Una característica común en todos los protocolos de preparación de muestras para PCR es que todas las muestras deben procesarse en el tiempo más corto posible después de su recolección. Sin embargo, tanto el suero como la sangre completa, pueden ser conservados a -20°C o a -70°C para su conservación durante largos periodos de tiempo hasta su uso (Chen *et al*, 2002).

Una vez procesada la muestra, el siguiente paso importante es la extracción del ADN fúngico.

3.2 Extracción de ADN

El método de extracción de ADN también varía según la naturaleza del espécimen, pero en general, todos los protocolos de extracción de ADN empleados hasta el momento para la detección de hongos cuentan con los mismos pasos: (1) rotura de la pared fúngica, (2) liberación del material genético mediante la lisis de la membrana celular y (3) purificación del ADN. Las técnicas de extracción de ADN están estandarizadas, salvo pequeñas excepciones, que se dan sobre todo en el paso de recuperación del ADN (Reiss *et al*, 2000).

Para romper la pared celular de los hongos, muchos protocolos emplean las enzimas zimolasa o mureinasa. Estas enzimas actúan digiriendo la pared extracelular dando lugar a la formación de esferoplastos, e incrementando de esta forma la sensibilidad osmótica de las células fúngicas (Kitamura, 1974). Sin embargo, aunque la zimolasa actúa muy bien en células de levadura como *Candida* o *Cryptococcus*, es inefectiva en el caso de la pared de los mohos como *Aspergillus* (Reiss *et al*, 2000; Varma and Kwon-Chung, 1991). Para estos casos se emplea la rotura mecánica mediante el uso de tratamientos alcalinos o bien una combinación de esferas de cristal y ciclos de congelación-descongelación con nitrógeno líquido (Hopfer *et al*, 1993; Loeffler, 1998). También se emplea la liticasa, enzima que actúa digiriendo los enlaces β -1,3-glucano y que ha mostrado efectividad generando esferoplastos en mohos (Van Burik *et al*, 1998).

En muchos casos, se hace necesaria la rotura de las células presentes en la sangre para poder obtener el ADN requerido para la PCR ya que, por ejemplo, las células leucocitarias fagocitan hifas. Generalmente los protocolos empleados para tal fin se basan en tratamientos alcalinos con dodecil sulfato sódico (SDS) y EDTA, o tratamientos enzimáticos con proteinasa K (Einsele *et al*, 1997; Van Burik *et al*, 1998).

En cuanto a la purificación de ADN, el fenol-cloroformo es el primer método empleado y ha sido el más utilizado hasta nuestros días (Bougnoux *et al*, 1999; Fujita, 1995). Sin embargo, en los últimos años han aparecido kits comerciales para la extracción de ADN que facilitan la purificación del mismo, acortando el tiempo del procedimiento considerablemente, sin observar apenas pérdida en el rendimiento o calidad comparado con

los métodos convencionales (Einsele *et al*, 1997; Flahaut *et al*, 1998; Hendolin *et al*, 2000; Lass-Flörl *et al*, 2001; Loeffler *et al*, 2000; Skladny *et al*, 1999; Van Burik *et al*, 1998).

Además del fenol también se puede emplear el CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), un detergente catiónico muy potente, para separar el ADN de las proteínas mediante la solubilización de las membranas celulares (Velegaki *et al*, 1999). Este método ha sido utilizado con muestras de sangre y esputo para aislar ADN de levadura y *A. fumigatus*, de muestras de humor vítreo de un paciente con endoftalmítis causada por *Candida*, de muestras de piel de un paciente con zigomicosis diagnosticada y de diez muestras de sangre de pacientes con candidemia, con óptimos resultados en todos los casos (Velegaki *et al*, 1999).

Por otro lado, también se han desarrollado kits comerciales para extraer ADN en los que no se requiere lisar los leucocitos ni eritrocitos presentes en ellas. Este método es utilizado para la extracción de ADN de *Aspergillus* a partir de muestras de sangre completa (Chen *et al*, 2002; Reiss *et al*, 2000).

3.3. Detección e identificación del producto amplificado

La mayoría de los métodos de amplificación por PCR utilizan oligonucleótidos universales que reconocen regiones conservadas entre la mayoría de los hongos patógenos. Como se ha comentado anteriormente, las dianas más empleadas hasta el momento han sido los genes ribosómicos (Medlin *et al*, 1988). Una vez se ha generado el amplicón, las técnicas más empleadas para distinguir géneros y especies incluyen: (1) Análisis por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), (2) hibridación de los productos amplificados utilizando sondas radiactivas o reacciones enzimáticas empleando la técnica de Southern blotting, (3) amplificación de polimorfismos al azar (RAPD), (4) polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP), (5) análisis del cariotipo y (6) secuenciación de los productos amplificados.

En la técnica de RFLP se amplifican segmentos de genes ribosómicos que a continuación se digieren con enzimas de restricción, dando lugar a fragmentos más pequeños que pueden ser separados mediante electroforesis en campo pulsado, con lo que se obtiene un perfil de polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (Hopfer *et al*, 1993; Trost *et al*, 2004). Esta técnica se ha empleado con éxito en la detección de hongos patógenos en

muestras clínicas (Hopfer *et al*, 1993) y en la identificación de levaduras crecidas en diferentes cultivos (Maiwald *et al*, 1994).

La hibridación de los productos amplificados con sondas específicas de especie empleando la técnica de Southern blotting es una técnica muy sensible, siendo capaz de detectar alrededor de 1ufc/ml de organismos (Chen *et al*, 2002; Einsele *et al*, 1997). En algunos estudios donde se amplificaba la subunidad pequeña del ADN_r, la especificidad de las sondas diseñadas ha llegado a ser del 98% (Einsele *et al*, 1997).

Más recientemente, se han empezado a utilizar las sondas conocidas como Molecular Beacons para identificar hongos, por ejemplo del género *Candida*, en lugar de las sondas de ADN convencionales (Park *et al*, 2000; Van Burik *et al*, 1998). Estas sondas poseen una molécula fluorescente excitada en un extremo y un quencher o molécula aceptora para FRET (transferencia de energía de resonancia) en el otro extremo. En los Molecular Beacons sólo la región central es complementaria al producto amplificado, mientras que los extremos son autocomplementarios, de forma que el fluoróforo y el quencher están próximos y no emiten fluorescencia hasta que la hibridación de la región central los aparta y permite el aumento de fluorescencia (Tyagi and Kramer, 1996). El análisis de la secuencia de la región ITS2 se ha utilizado en el desarrollo de sondas fluorescentes para identificar rápida y específicamente las levaduras *C. dubliniensis* y *C. albicans* (Park *et al*, 2000). Otros oligonucleótidos, que no son específicos de especie y se utilizan para detectar polimorfismos, también se han utilizado para tipificar aislados de diferentes especies de *Candida*.

La amplificación de polimorfismos al azar [random amplification of polymorphic DNA (RAPD)] se ha empleado para el análisis de aislados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* y *A. fumigatus* (Brandt *et al*, 1998; Lehmann *et al*, 1992). Esta técnica amplifica por PCR las secuencias del ADN genómico diana con uno o más oligonucleótidos cortos como cebadores y después separa los productos amplificado por electroforesis en gel. La secuencia del oligonucleótido se elige al azar y los cebadores más adecuados a cada especie deben ser determinados de forma empírica. El principal contratiempo es que aún no se han conseguido unos oligonucleótidos universales para todas las especies de *Candida*.

La técnica SSCP muestra una migración de los productos amplificados en función de su estructura conformacional y de su longitud, permitiendo distinguir los amplicones que difieren incluso en un único par de bases. Esta técnica ha sido ensayada para identificar y

diferenciar entre *Cryptococcus neoformans*, *Piboydin boydii*, y especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Rhizopus* (Rath and Ansorg, 2000; Walsh *et al*, 1995).

El análisis del cariotipo compara el perfil del ADN cromosómico obtenido en geles de agarosa mediante electroforesis en campo pulsado (Pfaller *et al*, 2003). Finalmente, el análisis de la secuencia obtenida, es la técnica más fiable y prometedora para la identificación de un gran número de especies tras la realización de una PCR, incluyendo ciertas especies de *Candida* u hongos de crecimiento lento como por ejemplo, *H. capsulatum*. Por lo general, se utilizan oligonucleótidos universales para amplificar fragmentos de genes, cuyas secuencias se comparan con secuencias de los mismos fragmentos de ADN contenidas en las diferentes bases de datos públicas identificando así las especies (Ferrer *et al*, 2001; Kurtzman and Robnett, 1998). Sin embargo, estas bases de datos deben usarse con precaución y teniendo en cuenta que la calidad de los datos depositados en ellas son inconsistentes. Esta técnica se ha empleado en muchos estudios para la diferenciación de *C. dubliniensis* y *C. albicans* y otros patógenos fúngicos como *A. fumigatus* (Donnelly *et al*, 1999; Kurzai *et al*, 1999; Meyer *et al*, 2001; Sullivan and Coleman, 1998; Turenne *et al*, 1999; Zhao *et al*, 2001).

Los métodos convencionales previamente descritos resultan muy tediosos y poco prácticos para una rutina de laboratorio debido a su gran toxicidad, precio y corta vida media de los reactivos (Chen *et al*, 2002). Por estas razones se han desarrollado métodos alternativos de detección que engloban la PCR ligada a ELISA y más recientemente la PCR a tiempo real.

3.3.1. PCR ligada a ELISA

La técnica de PCR ligada a ELISA, tiene la ventaja de que permite analizar múltiples muestras a la vez y proporciona una amplificación rápida sin perder la especificidad asociada con el southern blot (Fujita, 1995; Wahyuningsih *et al*, 2000). Los productos obtenidos tras la realización de la PCR se incuban con sondas específicas y los complejos sonda-amplicón que se forman, se detectan mediante una reacción colorimétrica. Este método ha incrementado considerablemente la sensibilidad del ensayo de PCR (Chen *et al*, 2002).

3.3.2. Detección y cuantificación de los productos de PCR mediante la técnica de PCR a tiempo real

La PCR cuantitativa (PCR-Q) o PCR a tiempo real, representa el avance más reciente en el diagnóstico micológico. Tiene la ventaja de no sólo aumentar la sensibilidad de la técnica de PCR, sino de poder monitorizar la respuesta a una terapia midiendo la carga fúngica en

cualquier momento. Esta técnica combina la amplificación del ADN, la hibridación de sondas y la generación de señal en un único paso, permitiendo la cuantificación del ADN y mostrando buena reproducibilidad.

En la actualidad se utilizan principalmente dos sistemas de PCR a tiempo real. En uno de ellos, se utiliza una sonda complementaria a una región de la secuencia que se quiere amplificar y que posee en sus extremos 5' y 3' terminales una molécula emisora de fluorescencia (reportero) y un quencher, respectivamente. Cuando esta sonda está intacta, la proximidad entre el reportero y el quencher da lugar a una supresión de la fluorescencia. Durante la PCR, la sonda hibrida con la secuencia interna del amplicón y resulta degradada por la actividad exonucleolítica de la enzima *Taq* polimerasa durante el proceso de polimerización. Como consecuencia, el fluoróforo y el quencher se separan y se liberan al medio moléculas fluorescentes libres que se van acumulando a lo largo de los ciclos de la PCR (figura 3). Repetidos ciclos de hibridación de sonda y oligonucleótidos, y digestión de la sonda resultan en una amplificación exponencial de los productos de PCR y en un incremento de fluorescencia. Realizando diluciones seriadas con concentraciones conocidas de ADN, la cantidad de producto de PCR se puede expresar en valores absolutos. Los aspectos tecnológicos del sistema han sido descritos por Livak y colaboradores (Livak *et al*, 1995).

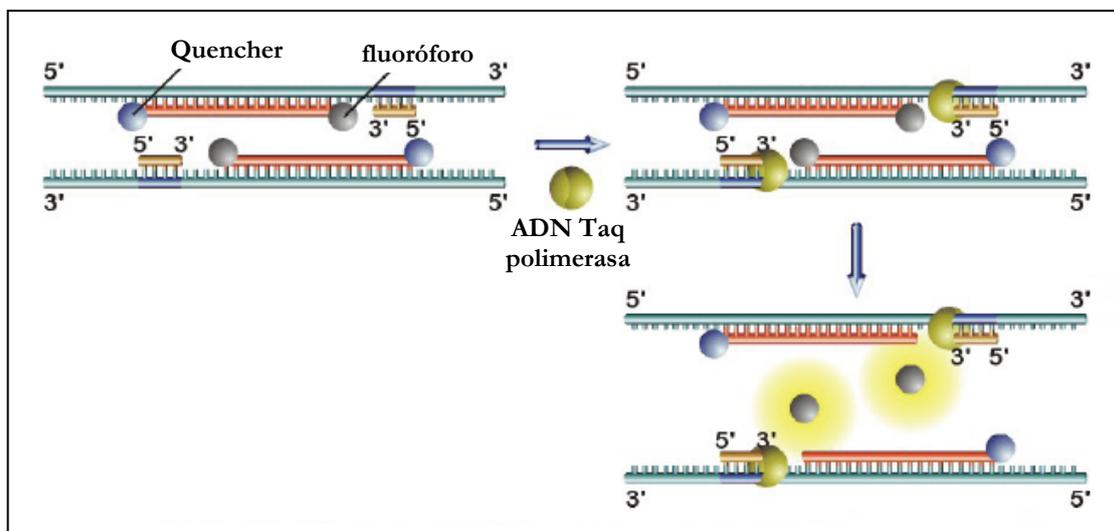


Figura 3. Esquema del método de PCR a tiempo real mediante sondas TaqMan.

El segundo sistema emplea transferencia de energía de resonancia (FRET) para detectar los productos amplificados. Esta técnica consiste en la transferencia de la energía de una molécula fluorescente excitada a otra molécula próxima, cuyo espectro de excitación se solapa con el espectro de emisión de la primera molécula en ausencia de irradiación. La

transferencia mediante FRET sólo se produce cuando los dos fluoróforos están suficientemente próximos. Por tanto, en este procedimiento se emplean dos sondas, una de ellas está unida en su extremo 3' terminal a fluoresceína (fluoróforo emisor) y la otra sonda posee en su extremo 5' terminal un fluoróforo aceptor. Este sistema proporciona cuantificación absoluta del ADN tomando como referencia una curva estándar de concentración de ADN que se realiza paralelamente al ensayo. Durante la PCR, las sondas (oligonucleótidos) hibridan en secuencias adyacentes al amplicón. La molécula donadora de fluorescencia y la aceptora pasan a estar muy próximas, produciéndose transferencia de energía de resonancia (FRET), donde la molécula emisora emite en verde, excitando a la molécula aceptora que termina emitiendo en rojo. Una vez que la polimerización ha comenzado las sondas son desplazadas, lo que se traduce en un decrecimiento de la fluorescencia. Por tanto, en esta técnica el dato de fluorescencia se toma en el momento en que se produce la hibridación de las sondas (oligonucleótidos) con la secuencia de ADN a amplificar. El procedimiento ha sido descrito detalladamente por Heindl y colaboradores (Heindl, 2001).

Existe un tercer sistema que se basa en la utilización de un fluoróforo específico de ADN bicatenario, el SYBR-Green. Este agente intercalante sólo es fluorescente cuando se intercala dentro de las moléculas de ADN de doble cadena (dsDNA), emitiendo una señal fluorescente mayor cuanto mayor es la cantidad de producto amplificado. El SYBR-Green produce resultados muy precisos en la cuantificación del producto. Por otra parte, las sondas específicas de secuencia facilitan la identificación de mutaciones y permiten realizar múltiples experimentos simultáneamente, al poder utilizar varias sondas con fluoróforos distintos a la vez.

La elección entre los tres sistemas depende de las preferencias y necesidades de cada laboratorio.

4. Enfermedades de etiología desconocida: AZOOR, coroiditis multifocal, coroidopatía serpiginosa y esclerosis múltiple

Las enfermedades “raras”, definidas como aquellas que se presentan con una frecuencia baja, menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes, constituyen un amplio número de patologías que pueden producir invalidez crónica o incluso la muerte. Estas patologías incluyen enfermedades sobre las que existen pocos datos epidemiológicos y presentan numerosas dificultades diagnósticas y de seguimiento, además de múltiples problemas

sociales. En la mayoría de los casos tienen un origen desconocido y carecen de tratamientos efectivos. Las enfermedades “raras”, diagnosticadas también en algunos casos como autoinmunes, han recibido en general poca atención desde el punto de vista de la investigación, debido al bajo número de afectados por cada una de ellas. Entre dichas enfermedades se encuentran el AZOOR, la coroiditis multifocal y la coroidopatía serpiginosa, que producen problemas visuales, y la esclerosis múltiple que en un alto número de pacientes también da lugar a pérdida de visión (Frohman *et al*, 2005; Quillen *et al*, 2004). Aunque la hipótesis había sido descartada, en los últimos años se ha vuelto a plantear la posibilidad de que determinadas enfermedades cuyo origen es desconocido, o no está perfectamente determinado, y que en algunos casos se han englobado en el grupo de las enfermedades autoinmunes, pudieran tener como agente etiológico primario un patógeno vírico o un antígeno extraño, ¿por qué no de origen fúngico?, que activase la respuesta inmune provocando la segunda fase o auto inmunidad de estas afecciones (Barnett and Sutton, 2006; Gass *et al*, 2002; Kantarci and Wingerchuk, 2006). A continuación se describen con más detalle alguna de estas patologías. En las figuras 4 y 5 se muestra un esquema del ojo y sus vasos sanguíneos respectivamente para que resulte más fácil el seguimiento de lo que posteriormente se describe.

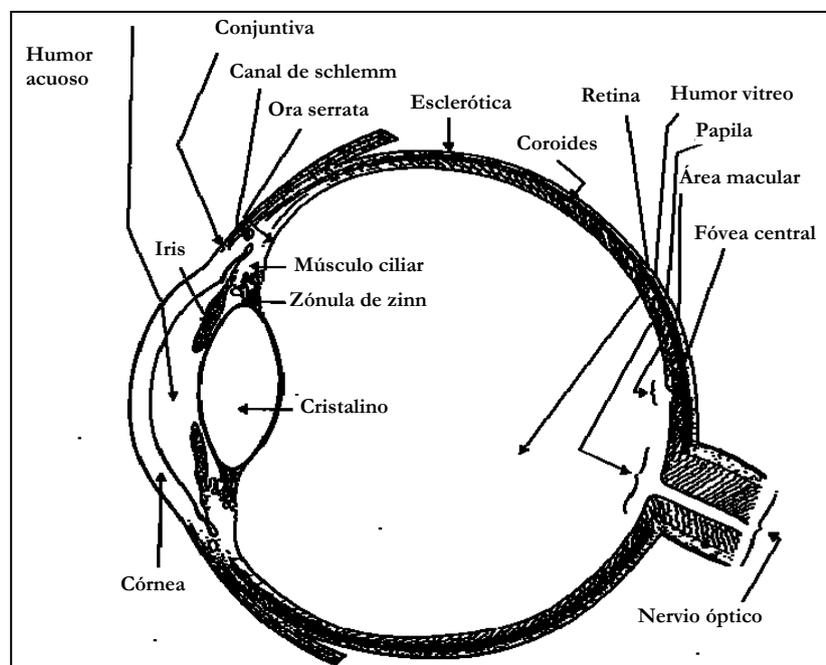


Figura 4. Sección esquemática de un ojo.

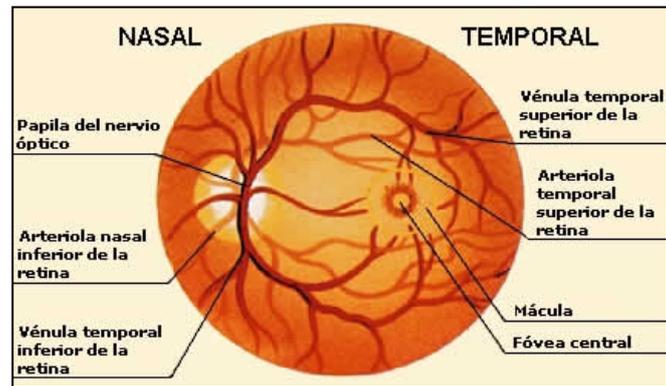


Figura 5. Arterias y venas de la retina: fondo de ojo, disco del nervio óptico y mácula.

4.1. AZOOR

La retinopatía aguda zonal periférica oculta (AZOOR) fue descrita por vez primera en 1993 por J.D.M. Gass (Gass, 1993). Este síndrome se caracteriza por la pérdida aguda, en una o más zonas, de la función retinal externa, fotopsias en algunos casos, cambios mínimos en el fondo de ojo, que suelen implicar el estrechamiento de los vasos sanguíneos y palidez o incluso color blanquecino alrededor de la papila (figura 4) (Gass, 1993; Helbig *et al*, 2001; Jacobson *et al*, 1995; Lee and Prager, 1996; Smetana *et al*, 2003). Se observa una disfunción mixta de los conos y bastones aunque los conos están normalmente menos afectados. Uno de los aspectos que caracterizan mejor el AZOOR es la electroretinografía anormal, mientras que los potenciales evocados del nervio óptico suelen ser normales (Gass *et al*, 2002). Algunos de los pacientes muestran anomalías en el reflejo pupilar sugiriendo algún tipo de neuropatía. De hecho, se ha encontrado inflamación del sistema nervioso central en un paciente con AZOOR (Jacobson, 1996). Puede haber afectación de uno o de los dos ojos y se ha descrito que es más frecuente en mujeres que en hombres (Gass *et al*, 2002). La gran mayoría de los pacientes con AZOOR son miopes; de tal forma que el paciente típico de AZOOR es una mujer joven entre 20-45 años y con uno o ambos ojos miopes. Aunque la causa del AZOOR permanece aún desconocida, desde un principio se pensó que podría deberse a una disfunción del sistema inmune (Gass, 2003). Algunos autores han especulado sobre la posibilidad de que esté causada por una infección viral (Gass, 1993; Gass, 2003; Gass *et al*, 2002). Recientemente se ha descrito que la causa de esta enfermedad es de origen fúngico, a partir de resultados obtenidos con un paciente con AZOOR (Carrasco *et al*, 2005). Esto estaría de acuerdo con el hecho de la similitud que existe entre el AZOOR y la histoplasmosis ocular, enfermedad causada por el hongo *Histoplasma capsulatum*. Se piensa que el AZOOR forma parte de un conjunto de

enfermedades tales como el síndrome de los puntos blancos evanescentes, la coroiditis multifocal, la corioidopatía serpiginosa, la coroiditis interna punteada, el síndrome agudo idiopático del alargamiento del punto ciego y la retinocorioidopatía en perdigonada, debido a que poseen características comunes: los pacientes presentan retinogramas anormales, se dan principalmente en mujeres jóvenes y muchos de los afectados, antes de padecer los primeros síntomas de la enfermedad experimentan algo parecido a una infección viral (Gass *et al*, 2002; Jampol and Wiredu, 1995).

4.2. Coroiditis multifocal

Dentro de la coroiditis multifocal encontramos dos formas distintas en las que puede manifestarse esta enfermedad. Por un lado, en forma de coroiditis multifocal con panuveítis y por otro lado en forma de coroiditis multifocal periférica. La coroiditis multifocal con panuveítis (MCP) es una enfermedad inflamatoria de causa desconocida que se caracteriza por producir lesiones en el fondo del ojo, similares a las que se observan en el síndrome de la presunta histoplasmosis ocular (POHS). Sin embargo, al contrario que en el POHS, se produce inflamación del vítreo y de la cámara anterior en los ojos afectados (figura 4) (Nozik and Dorsch, 1973).

La coroiditis multifocal ocurre predominantemente en mujeres entre 20-60 años, es mayoritariamente bilateral, es decir, se encuentran afectados ambos ojos aunque frecuentemente se presenta asimétrica y en el segundo ojo afectado es asintomática. Puede producir pérdida visual severa debido a la cicatrización disquiforme de la mácula, cicatrización fibrótica de la mácula o edema macular cistoide crónico. Tiende a ser un síndrome crónico con brotes de inflamación recurrentes. El pronóstico visual es generalmente pobre. Su etiología tampoco se conoce aún aunque también se ha especulado sobre la posibilidad de que esté asociada a, o causada por, una infección viral o bacteriana (Scheider, 1993; Spaide *et al*, 1991; Tiedeman, 1987; Vandenbelt *et al*, 2003). Por otro lado, la coroiditis multifocal periférica (PMC) se caracteriza por presentar lesiones exclusivamente en la periferia retiniana asociadas a inflamación intraocular y afecta con más frecuencia a mujeres mayores de 50 años. Las principales complicaciones son: edema macular quístico, cataratas y glaucoma. Lardenoye y colaboradores (Lardenoye *et al*, 1997) sugieren que representa una entidad clínica propia separada del espectro de las coroiditis multifocales, siendo la sarcoidosis la única enfermedad asociada.

4.3. Coroidopatía serpiginosa

La coroidopatía serpiginosa, llamada también coroiditis geográfica o helicoidal, es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por la destrucción del epitelio pigmentario de la retina y de la coriocapilar (figura 4) (Schatz, 1974; Weiss *et al*, 1979). Afecta a pacientes de edad media entre los 30-50 años pero también se han descrito casos aislados en jóvenes (Gupta *et al*, 2002; Laatikainen and Erkkila, 1974; Schatz, 1974). Aunque según la literatura esta enfermedad se manifiesta por igual en ambos sexos, en numerosas series ya observan un predominio de la enfermedad en los varones (Araujo *et al*, 2000; Laatikainen and Erkkila, 1974; Lleó Perez, 2000; Mansour *et al*, 1988; Schatz, 1974; Weiss *et al*, 1979). No parece tener ninguna enfermedad asociada y no presenta carácter hereditario (Hamilton and Bird, 1974; Laatikainen and Erkkila, 1974). Tiene un curso crónico que tiende a progresar por períodos de actividad o brote. La enfermedad es bilateral en el 85-100% de los casos, aunque asimétrica, pudiendo existir un intervalo de años entre la afectación de ambos ojos (Hardy and Schatz, 1987; Laatikainen and Erkkila, 1974; Schatz, 1974; Weiss *et al*, 1979).

El grado de afectación macular determina la visión del paciente (Weiss *et al*, 1979). Se caracteriza por la aparición de brotes agudos que pueden durar de semanas a meses, con posteriores remisiones y recurrencias que pueden ser asintomáticas si no afectan la fóvea, aunque ésto provoca un difícil control terapéutico. La afectación es generalmente peripapilar con un crecimiento centrífugo, aunque también se han descrito casos que afectan inicialmente la mácula sin evidencia de lesiones peripapilares (figura 5) (Blumenkranz *et al*, 1982; Mansour *et al*, 1988). Su forma suele ser irregular, geográfica, afectando coroides y epitelio pigmentario (figura 4). Las lesiones activas tienen un color cremoso y tras semanas o meses cicatrizan dejando zonas atróficas con hiper e hipopigmentación y en ocasiones metaplasia fibrosa del epitelio pigmentario. Como tratamiento se han intentado los corticoides e inmunosupresores sin haber logrado una eficacia para controlar el curso de la enfermedad (Araujo *et al*, 2000; Hooper and Kaplan, 1991; Laatikainen and Erkkila, 1974; Priya *et al*, 2002; Secchi *et al*, 1990). A pesar de que la etiopatogenia de esta enfermedad permanece desconocida, se ha descrito su asociación con el antígeno de histocompatibilidad HLA B-7, mohos y los herpesvirus (Erkkila *et al*, 1982; Priya *et al*, 2002; Rudich *et al*, 2003). Además se postulan dos teorías: inflamatoria o isquémica.

Los estudios anatomopatológicos revelan un componente oclusivo que se produce como consecuencia de una inflamación de los grandes vasos coroideos. La vasculitis retiniana, las oclusiones vasculares, desprendimientos de epitelio pigmentario y uveítis anterior, se han descrito acompañando las lesiones típicas (Friberg, 1988; Gupta *et al*, 2002; Laatikainen and Erkkila, 1974; Masi *et al*, 1978; Wojno and Meredith, 1982). Algunos autores han encontrado un aumento significativo del factor VIII de la coagulación en estos pacientes (King *et al*, 1990), que favorece la agregación plaquetaria y apoya el mecanismo vascular. Las lesiones muestran una hipofluorescencia precoz, debido a la oclusión de la coriocapilar e infiltración celular en la coroides y de tejido fibrogliol en la membrana de Bruch (Laatikainen and Erkkila, 1974). Se han descrito algunos casos asociados a una historia reciente de enfermedad vírica, sarcoidosis y tuberculosis previas (Laatikainen and Erkkila, 1974; Schatz, 1974; Edelsten *et al*, 1994). Una de las complicaciones más importantes es el desarrollo de neovascularización subretiniana, ya descrita por diversos autores (Blumenkranz *et al*, 1982; Christmas *et al*, 2002; Jampol *et al*, 1979; Mansour *et al*, 1988). El tratamiento sigue siendo muy controvertido. Los corticoides se recomiendan en el tratamiento de las lesiones activas pero no se ha demostrado que sean efectivos en alterar el curso de la enfermedad y en evitar las recurrencias (Araujo *et al*, 2000; Priya *et al*, 2002). Se describen recurrencias asintomáticas hasta en un 30% de los pacientes (Laatikainen and Erkkila, 1974). La coroidopatía serpigínea es una enfermedad de curso impredecible que puede provocar un compromiso macular y pérdida total de la visión central, mientras que en otros casos puede haber resolución espontánea de las lesiones sin compromiso de la agudeza visual.

4.4. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno crónico desmielinizante del sistema nervioso central (Alvarez Cermeno, 2002). Las lesiones se caracterizan por la aparición de múltiples áreas o placas de desmielinización, gliosis, e incluso a menudo, una pérdida significativa de oligodendrocitos en el centro de la placa. Con frecuencia se observan también macrófagos aislados y linfocitos. Se produce además la pérdida de axones en un grado variable, aunque por lo general, menor que la de pérdida de mielina. En el caso de lesiones crónicas, la presencia de recubrimientos muy finos de mielina, junto con áreas de placas oscuras, confirman que ha tenido lugar una remielinización (Ludwin, 2006). El primer síntoma es a menudo la neuritis óptica, una inflamación del nervio óptico que causa un deterioro de la

visión y dolor al mover el ojo y un alto porcentaje de los pacientes con EM presentan una pérdida visual en ambos ojos (Soderstrom, 2001). Sin embargo, las personas afectadas pueden manifestar un amplio número de síntomas: astenia (fatiga), pérdida de masa muscular, espasticidad (debilidad muscular), disfunción renal, etc. (Colombo *et al*, 2006; Fowler and Kalsi, 2006; Pappalardo *et al*, 2006).

Esta enfermedad tiene un curso crónico que tiende a progresar por períodos de actividad o brote. Afecta a pacientes de edad media entre los 17 y los 65 años y es dos veces más frecuente en mujeres que en hombres (Compston and Coles, 2002). Sin embargo, los varones tienen tendencia a padecerla en edades más tardías y con peor pronóstico, apoyando con este hecho que existen factores dependientes de género en la variabilidad genética y fenotípica de la enfermedad (Kantarci and Weinshenker, 2005).

A pesar de que la esclerosis múltiple es de causa desconocida se ha relacionado con factores genéticos y medioambientales (Oksenberg and Barcellos, 2000). Los factores que respaldan la genética incluyen: la presencia de un exceso de personas afectadas en el Norte de Europa, comparado con la población indígena que vive en la misma localización geográfica, la agrupación familiar, EM es 20-40 veces más común en parientes de primer grado, y la falta de este aumento de probabilidad de padecerla en los parientes de estos enfermos que han sido adoptados (Ebers *et al*, 1995; Weinshenker, 1996). Estudios con gemelos monocigóticos también apoyan la gran carga genética de esta enfermedad (Ebers, 2005). Dentro de los factores genéticos, además del antígeno leucocitario humano (HLA)-DRB1*1501-DQB1*0602, haplotipo del cromosoma 6p21, otros múltiples factores genéticos han mostrado pequeñas contribuciones individuales a la etiología de la esclerosis múltiple (Games, transatlantic multiple sclerosis genetics cooperative, 2003; Sawcer *et al*, 2005; Sawcer and Compston, 2003). También se ha observado una relación de esta enfermedad con los cromosomas 5q33, 17q23 y 19p13 y con el cromosoma 1 (Reich *et al*, 2005; Sawcer *et al*, 2005). Por otro lado, la epidemiología ambiental de la esclerosis múltiple no se conoce muy bien, pero avances recientes implican factores que influyen positivamente disminuyendo el riesgo a padecerla, como son tomar el sol o ingerir suplementos de vitamina D y factores que lo aumentan como el tabaco y la exposición a solventes orgánicos (Coo and Aronson, 2004; Marrie, 2004; Munger *et al*, 2004; Reis *et al*, 2001; Riise *et al*, 2002; Riise *et al*, 2003; Schiffer *et al*, 2001; Soilu-Hanninen *et al*, 2005).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, la etiología de la esclerosis múltiple es desconocida. Se ha propuesto la autoinmunidad como una posible causa de esta devastadora enfermedad.

La investigación de modelos animales revela que las células T autoreactivas pueden provocar desmielinización e inflamación en el sistema nervioso central, aunque, tanto los pacientes como las personas sanas poseen un número similar de células que reaccionan con la mielina. La diferencia entre ambos grupos radica en que en los pacientes con esclerosis múltiple, las células T que reaccionan con la mielina tienen memoria, es decir, fenotipo activado (Frohman *et al*, 2006). Además, los pacientes de esclerosis múltiple, en el momento del brote, muestran de manera espontánea un incremento en la producción de TNF- α y otras interleuquinas comparado con los controles sanos o los pacientes de esclerosis múltiple en periodos de remisión (Hollifield *et al*, 2003). Se ha descrito que la autoinmunidad podría ser el resultado de la presencia de proteínas virales u otros antígenos patógenos que tengan mimetismo con proteínas del sistema nervioso central (Westall, 2006).

La mayoría de los autores consideran, efectivamente, que en la esclerosis múltiple interviene una inmunopatología infecciosa, directamente desencadenada por un agente infeccioso o bien por un posible autoantígeno enmascarado por la mielina (revisado en (Gilden, 2005), (Barnett and Sutton, 2006). Entre las principales evidencias a favor de esta interpretación etiopatogénica está la presencia de niveles elevados de IgG en el tejido y en el LCR de más del 95% de los pacientes con EM, con presencia de bandas oligoclonales (Andersson *et al*, 1994). Otras enfermedades del SNC que presentan elevación de IgG con bandas oligoclonales son las debidas a infecciones virales (sarampión, rubéola), no virales (sífilis, tuberculosis, criptococo), y los síndromes paraneoplásicos. Existen datos parciales, si bien no concluyentes, que asocian la actividad de la EM con distintos virus y otros microorganismos: *Chlamydia pneumoniae*, HH6, EBV, HTLV-1, LM7, coronavirus y virus JC (Coo and Aronson, 2004; Geeraedts *et al*, 2004; Kantarci and Wingerchuk, 2006; Marrie, 2004; Wagner *et al*, 2004).

OBJETIVOS

En esta Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Poner a punto distintas variantes de la reacción de PCR utilizando ADN fúngico. Desarrollar un método diagnóstico de infecciones causadas por hongos basado en la detección y cuantificación de ADN fúngico en muestras clínicas.
2. Desarrollar métodos de diagnóstico de infecciones fúngicas en muestras clínicas basados en la detección de antígeno y anticuerpo en suero.
3. Estudiar la posibilidad de que algunas enfermedades de etiología desconocida como AZOOR, coroidopatía serpiginosa, coroiditis multifocal o esclerosis múltiple puedan tener como agente etiológico un patógeno fúngico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Manipulación de levaduras

1.1. Cepas

Las cepas de levaduras empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

- Especie *Candida*: principalmente *Candida famata*, tanto la cepa tipo como la cepa aislada del exudado conjuntival de uno de los voluntarios. Utilizadas para poner a punto todas las técnicas empleadas en este trabajo.
- *Saccharomyces cerevisiae*: por ser el modelo empleado en la mayoría de los ensayos con levaduras.
- Otras: *Rhodotorula sp.*, *Lacazyia sp.*, *Criptococcus sp.*, etc.: utilizados para contrastar resultados y comprobar que todos los métodos empleados en este trabajo se pueden extrapolar a otras especies de hongo.

1.2. Medio de cultivo para levaduras

Para el crecimiento de las levaduras en medio líquido se utilizó el medio YEPD (Extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%) suplementado con ampicilina (10 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml) y ciprofloxacina (50 µg/ml). Para la elaboración de placas se añadió bacto-agar al 1,5%.

1.3. Mantenimiento y crecimiento

Las cepas de levadura se conservaron en placas de YEPD a 4°C para periodos cortos de tiempo. Para periodos prolongados, se conservaron a -70°C en este mismo medio con glicerol al 25% (v/v).

En las cinéticas de crecimiento, los cultivos de las distintas cepas se crecieron durante 15 horas a 30°C en YEPD. Pasado este tiempo se diluyeron hasta una densidad óptica (D.O) a 600 nm de 0,2 y se dejaron crecer de nuevo hasta una D.O a 600 nm de 0,6 o 1,2 para la realización de los distintos experimentos que se han llevado a cabo en este trabajo.

1.4. Obtención de extractos de levadura para el análisis de proteínas

Las levaduras se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (NaOH 0,2 M; β-mercaptoetanol 0,1 M; PMSF 0,1 mM) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación se añadió 450 µl de TCA al 10% y se calentaron las muestras a 65°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los extractos a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos y el sedimento se lavó tres veces con acetona enfriada a -20°C. Finalmente, se secaron las muestras para eliminar cualquier rastro de acetona y se resuspendieron en tampón TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl) hasta una concentración final de 0,1 µg/ml.

1.5. Preparado de liofilizado de *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *R. mucilaginosa* para la inmunización de conejo

Durante la realización de esta tesis se han obtenido anticuerpos policlonales de conejo frente a diferentes levaduras (*C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *R. mucilaginosa*).

Las inmunizaciones se llevaron a cabo empleando 2 mg de liofilizado de cada una de las levaduras, disuelto en 0,5 ml de PBS y emulsionado con 0,5 ml de adyuvante completo de

Freund (para la primera inmunización) o incompleto (segunda, tercera y cuarta inmunización). En todos estos casos, las inmunizaciones se espaciaron por periodos de 3-4 semanas. Tras el sangrado total de los conejos inoculados, el antisuero se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C .

1.6. Microscopía electrónica

Para el análisis ultraestructural de las levaduras se siguió el protocolo de Wrigth y colaboradores (Wright *et al*, 1988) con algunas modificaciones. Directamente sobre el cultivo de levaduras, se añadió un volumen igual de fijador dos veces concentrado (2x) (glutaraldehído al 1%, paraformaldehído al 1% en tampón fosfato 0,04 M, pH 7) y tras 1,5 horas de incubación a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con tampón fosfato 0,04 M. Finalmente se embebió en resina *LR white* (*The London Resin Co. Ltd*, Cardiff, UK). Para ello se comenzó deshidratando las muestras en etanol (15 minutos en etanol 50%, 15 minutos en etanol 70%, dos lavados de 15 minutos en etanol 95% y 3 lavados de 10 minutos en etanol 100%) a temperatura ambiente con agitación. A continuación, las muestras se incubaron a temperatura ambiente con agitación: en etanol 100%: resina *LR white* (2:1) durante 2 horas, en etanol 100%: resina *LR white* (1:1) primero durante 1 hora y tras cambiar la mezcla, durante toda la noche. Finalmente se embebieron en resina *LR white* 100%, incubándolas 1 hora en rotación y se encapsularon en cápsulas de gelatina durante 48 horas a 55°C para su polimerización. Para concluir, se obtuvieron cortes ultra finos (ultramicrotomo *ultracut UCT* de Leica) y se colocaron sobre rejillas de 200 mesh de níquel recubiertas de collodión y carbono.

2. Manipulación de cultivos celulares

2.1. Líneas celulares

- HeLa (ATCC CCL 2): células epiteliales procedentes de carcinoma de cuello de útero humano. Empleadas para valorar la especificidad de los diferentes oligonucleótidos empleados en este trabajo.
- Linfocitos: células sanguíneas humanas. Utilizadas para valorar la especificidad de los diferentes oligonucleótidos empleados en este trabajo

- Monocitos THP-1: monocitos de leucemia aguda humana. Empleados para la optimización de protocolos de extracción de ADN y PCR para células en suspensión de origen humano.

2.2. Medios de cultivo, mantenimiento

El crecimiento, manipulación y conservación de líneas celulares se llevó a cabo en el caso de las células HeLa, utilizando medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Difco) (Dulbecco and Freeman, 1959), suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomina, 0,2 µg/ml del éster butírico del ácido p-hidroxibenzoico (*Sigma*) y glutamina a una concentración de 4 mM (*Merck*). Los medios se suplementaron con suero fetal de ternera (*Flow*) al 5% (v/v).

Para el cultivo de Monocitos THP-1 se empleó el medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal al 10% (v/v). La composición de este medio se describe de forma detallada en *Cell culture* (Jakoby, 1979)

Las células se mantuvieron en incubadores a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una presión parcial de CO₂ del 7%.

La conservación de células en nitrógeno líquido se realizó en el mismo medio, pero con un 20% de suero bovino fetal y un 7% de DMSO como agente crioprotector.

3. Cepas de ratón

Las cepas de ratón utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- Cepa Swiss: empleada para poner a punto métodos de extracción de ADN y PCR para tejidos, una vez sacrificado el ratón.
- Cepa Balb C: utilizada como control negativo en la optimización de PCR-Q llevada a cabo con sangre, por poseer un sistema inmune muy potente.

3.1. Fijación en formol de los distintos órganos de la cepa de ratón Swiss

Se sacrificó un ratón macho joven mediante asfixia con CO₂ y posteriormente se procedió a su disección en condiciones de esterilidad, obteniendo los distintos órganos. Cada uno de los órganos se dividió en dos. Una de las mitades se conservó a -20°C y la otra mitad se fijó

en formol al 3,5%. Para ello se sumergieron cada uno de los tejidos en 0,5 l de formol al 3,5% y se dejaron sumergidos, al menos durante 24 horas, antes de comenzar su procesamiento.

4. Extracción de linfocitos de sangre

La extracción de linfocitos de sangre se llevó a cabo mediante centrifugación (35 minutos a 1.500 r.p.m) de un volumen de sangre de 5-10 ml, al que anteriormente se le había añadido 4 ml de ficoll atemperado. Tras recoger la fase intermedia, donde se encuentran los linfocitos, ésta se lavó dos veces con PBS. Finalmente el precipitado se resuspendió en 1 ml de DMEM.

5. Manipulación de ácidos nucleicos

5.1. Extracción de ADN

Durante este trabajo se ha llevado a cabo la comparación de diferentes métodos de extracción de ADN para distintos tipos de muestras, con el fin de seleccionar el mejor protocolo de obtención de ácidos nucleicos para la puesta a punto de un buen método diagnóstico.

5.1.1. Para células en suspensión (levaduras y células humanas)

- **Protocolo 1:** en caso de cultivo líquido, tanto de levaduras como de células humanas, se cogió una alícuota de 200 μ l. En caso de cultivo sólido, se tomó una muestra de levadura directamente de la placa y se resuspendió en 200 μ l de YEPD. Se añadió a cada muestra 20 μ l de proteinasa K y 30 μ l de búffer de proteinasa K [Tris-HCl 0,5 M (pH 8), EDTA 0,05 M, Cl_3Mg 0,05 M y SDS al 5%] y tras una incubación de 2 horas a 65°C se procedió a su purificación mediante fenol: cloroformo (1:1). A continuación las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 r.p.m. y el sedimento se lavó tres veces con éter etílico hidratado (1:1). Una vez eliminado cualquier rastro de éter, las muestras se resuspendieron en 150 μ l (1/2 volumen) de acetato de sodio 3 M, 900 μ l (2 volúmenes) de etanol absoluto frío y 2 μ l de Trna (10 μ g/ μ l). A continuación se mezcló por inversión varias veces y se incubó durante 16 horas a -20°C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron todas las muestras a 14.000 r.p.m. durante 20 minutos, se

descartó el sobrenadante y una vez seco el sedimento se resuspendió en 50 μ l de H₂O estéril.

- **Protocolo 2:** se centrifugó 500 μ l de cultivo a 12.000 r.p.m durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en 50 μ l de buffer de lisis [ClK 1 mM, Tris 1 M (pH 8.3), Cl₂Mg 1 M, gelatina 10 mg/ml, NP40 0,45% y Tween20 0,45%] y 3 μ l de proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó 1 hora a 58°C y finalmente las muestras se calentaron durante 10 minutos a 95°C.
- **Protocolo 3 (desarrollado en nuestro laboratorio):** en caso de cultivo líquido, tanto de levaduras como de células humanas, se tomó una alícuota de 200 μ l, se centrifugó 20 minutos a 14.000 r.p.m y el sedimento se resuspendió en 200 μ l de tampón salino (PBS). En caso de cultivo sólido, se tomó una muestra de levadura directamente de la placa y se resuspendió en 200 μ l de PBS. A continuación, las muestras se calentaron a 95°C durante 10 minutos para inactivar todas las DNAsas que pudiera haber en la muestra y seguidamente se añadió 10 μ l de zimolasa (20 mg/ml) dejándolo incubar 1,5 horas a 37°C en agitación. Seguidamente se añadió 20 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó 1,5 horas a 58°C en rotación. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 100 μ l de búffer detergente [Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), Cl₂Mg 1 mM, NP40 al 0,5% y Tween20 al 0,5%] y se volvieron a calentar las muestras a 95°C durante 10 minutos. Seguidamente se purificó el ADN con 600 μ l (dos volúmenes) de fenol:cloroformo (1:1) y a continuación se realizaron 3 lavados con éter etílico hidratado (1:1). Una vez evaporado el éter, después del último lavado, se añadió 900 μ l (tres volúmenes) de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 20 minutos, se secaron para eliminar cualquier rastro de etanol y se resuspendieron en 50 μ l de H₂O tridestilada filtrada.

5.1.2. Para sangre

- **Protocolo 4:** se empleó el kit *QuiAamp DNA Mini Kit (Qiagen)*. Para la realización de la extracción de ADN se siguieron las instrucciones de la casa comercial.
- **Protocolo 5 (protocolo desarrollado en nuestro laboratorio):** se centrifugó 1 ml de sangre a la máxima velocidad durante 20 minutos. A continuación el sedimento se resuspendió en 1 ml de H₂O tridestilada filtrada y se dejó 20 minutos a temperatura

ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 3 minutos a 14.000 r.p.m. y se repitió este lavado dos veces más. Tras la última incubación, las muestras se volvieron a centrifugar durante 20 minutos a 14.000 r.p.m. y el sedimento se resuspendió en 300 μ l de PBS. Seguidamente, se calentaron a 95°C durante 10 minutos para inactivar todas las DNAsas que pudiera haber en las muestras y se añadió 15 μ l de zimolasa (20 mg/ml) dejándolo incubar 2 horas a 37°C en agitación. A continuación, se añadió 30 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) incubándolo 2 horas a 58°C en rotación. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 200 μ l de búffer detergente [Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), Cl₂Mg 1 mM, NP40 al 0,5% y Tween20 al 0,5%] y las muestras se volvieron a calentar a 95°C durante 10 minutos. Seguidamente, se purificó el ADN con 1ml de fenol:cloroformo (1:1) y a continuación se realizaron 3 lavados con éter etílico hidratado (1:1). Una vez evaporado el éter después del último lavado, se añadió 1,5 ml de etanol absoluto frío y las muestras se dejaron a -20°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 20 minutos, se secaron para eliminar cualquier rastro de etanol y se resuspendieron en 50 μ l de H₂O tridestilada filtrada.

5.1.3. Para tejido

Para la extracción de ADN de tejido de ratón, tanto fresco como fijado en formol, se empleó un método desarrollado en nuestro laboratorio:

- **Protocolo 6 (protocolo desarrollado en nuestro laboratorio):** se añadió 400 μ l de tripsina (0,79 unidades/ml) a una muestra de tejido y se puso a incubar 2 horas a 37°C en rotación. A continuación se centrifugó 20 minutos a 14.000 r.p.m., se retiró la tripsina y el sedimento se resuspendió en 400 μ l de PBS (1x). Se calentó durante 10 minutos a 95°C (para inactivar posibles enzimas) y seguidamente se añadió 20 μ l de zimolasa (10 mg/ml) y se incubó 1 hora y 30 minutos en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió 40 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó durante hora y media a 58°C en rotación. Se añadió 200 μ l de buffer detergente [Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), Cl₂Mg 1 mM, NP40 al 0,5% y Tween20 al 0,5%] y se volvió a calentar 10 minutos a 95°C para inactivar la proteinasa K. A continuación se purificó el ADN añadiendo 800 μ l de fenol:cloroformo (1:1) y tras centrifugar durante 20 minutos a 14.000 r.p.m., se recuperó cuidadosamente la fase acuosa superior. Posteriormente, la fase acuosa recuperada se lavó tres veces con éter etílico hidratado (1:1). Después del tercer lavado, se dejó evaporar el éter sobrante y se añadieron 900 μ l de etanol absoluto

frío dejándolo precipitar durante 16 horas a -20°C . Transcurridas 12-16 horas, se centrifugaron las muestras a 14.000 r.p.m. durante 20 minutos, y tras desechar el etanol, se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50 μl de H_2O tridestilada filtrada o TE.

5.2. Separación electroforética de ADN

La separación de ADN se llevó a cabo en geles de agarosa del 1,5 al 4% p/v, en función del tamaño del fragmento de ADN a analizar. Las muestras se resuspendieron en tampón de muestra para ADN (bromofenol 0,25%; xilen cianol 0,25%; Ficoll 15%). El electrolito empleado para la electroforesis fue TAE (tris base 2 M; ácido acético glacial al 5,7%; EDTA pH 8).

Tras la separación, las bandas de ADN se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (5 mg/l) y posterior iluminación con luz ultravioleta.

5.3. Extracción de ácidos nucleicos de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa, se empleó de forma rutinaria el sistema *Wizard PCR minipreps* (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones estándar de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 μl que contenía en el caso de la polimerasa de Perkin Elmer, el tampón suministrado por la casa comercial [Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% (p/v)], 0,5 μM de cada oligonucleótido iniciador, 200 μM de cada dNTP y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq y en el caso de la polimerasa de Sigma, 25 μl de la mezcla de reacción *2xJumpStart* (Sigma) y 0,5 μM de cada oligonucleótido iniciador. La cantidad de ADN molde empleado se adecuó a cada experimento. En el caso de la polimerasa de Perkin Elmer la concentración de Cl_2Mg depende de la pareja de oligonucleótidos utilizada.

El programa estándar de amplificación fue el siguiente: 35 ciclos de 45 segundos a 94°C , 1 minuto a la temperatura de hibridación que requiera cada par de oligonucleótidos,

45 segundos a 72°C y un ciclo final de 7 o 10 minutos (dependiendo también de la pareja de oligonucleótidos) a 72°C.

5.5. PCR anidada

La PCR anidada, como su propio nombre indica, consta de dos reacciones en cadena de la polimerasa consecutivas.

Las reacciones estándar de ambas PCRs se llevaron a cabo en un volumen de 50 µl que contenía en el caso de la polimerasa de Perkin Elmer, el tampón suministrado por la casa comercial [Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01% (p/v)], 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador, 200 µM de cada dNTP y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq y en el caso de la polimerasa de Sigma, 25 µl de la mezcla de reacción *2xJumpStart (Sigma)* y 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador. En la primera PCR, la cantidad de ADN molde se adecuó a cada experimento. En la segunda PCR se añadió 1 µl de la primera PCR. En el caso de la polimerasa de Perkin Elmer, la concentración de Cl₂Mg depende de la pareja de oligonucleótidos utilizada.

El programa estándar de amplificación fue el siguiente: 20 ciclos y 35 ciclos (para la primera y segunda PCR respectivamente) de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a la temperatura de hibridación que requiera cada par de oligonucleótidos, 45 segundos a 72°C y un ciclo final de 7 a 72°C.

Entre sí, las dos reacciones de PCR sólo se diferencian en la concentración de Cl₂Mg (en el caso de utilizar la polimerasa Taq de Perkin Elmer) y en los oligonucleótidos (1ª PCR: denominados M18s y 2ª PCR: denominados ITS) empleados. Los oligonucleótidos de la primera PCR amplifican la región del genoma donde se unen los oligonucleótidos de la segunda PCR.

5.6. PCR cuantitativa a tiempo real (sondas TaqMan)

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en un termociclador ABI PRISM 7000 (*Applied biosystems*). Para ello, se preparó una mezcla de reacción en un volumen de 20 µl conteniendo 0,9 µM de cada oligonucleótido y 0,25 µM de sonda TaqMan. A los 20 µl de la mezcla se añadieron 50 ng de cada ADN. La concentración de ADN molde para la amplificación con los oligonucleótidos específicos se normalizó mediante reacciones de PCR previas, empleando oligonucleótidos específicos dirigidos a los genes. El programa

estándar de amplificación fue el siguiente: el ADN se desnaturalizó en 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y se amplificó mediante 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa informático *SDS 7000 software* (versión 1.1).

5.7. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Isogen (Maarssen, Holanda).

Tabla 1. Relación de oligonucleótidos

| OLIGONUCLEÓTIDO | SECUENCIA |
|--------------------|-------------------------------|
| Leva 18s 5' | CGTAATGATTAATAG |
| Leva 18s 3' | CGTGCGGCCAAGAAC |
| ITS 5' | CCTGCGGAAGGATCA |
| ITS 3' | GATCCGTGTGTGAAA |
| M18s 5' | GTTCTGGGCCGCACGGG |
| M18s 3' | GGCAAAGATTCGATGATT |
| Km 29 B-globina 5' | GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG |
| Rs 42 B-globina 3' | GCTCACTCAGTGTGGCAAAG |
| Ikaros 3' | GCTCTCTCTCAGTGCTTACC |
| Ikaros 5' | AGGGAGACAAGTGCCTGTCA |
| TaqMan 5' | TGAACCTGCGGAAGGATCAT |
| TaqMan 3' | ACGCAGCGAAATGCGATA |
| Sonda Taqman | G-FAM-TCAACAACGGATCTCTTGG-MGB |

6. Manipulación de proteínas

6.1. Sueros y anticuerpos

- **Anti-*C. famata* (D21):** anticuerpo policlonal de conejo frente a la levadura *Candida famata*. Obtenidos tras la inmunización de conejos con liofilizado de dicha levadura.

Utilizado a una dilución de 1:500 en inmunofluorescencia y western blot y 1:1000 en dot-blot.

- **Anti-*C. prapasilosis* (D43):** anticuerpo policlonal de conejo frente a la levadura *Candida parapsilosis*. Obtenidos tras la inmunización de conejos con liofilizado de dicha levadura. Utilizado a una dilución de 1:500 en inmunofluorescencia y western blot y 1:1000 en dot-blot.
- **Anti-*C. albicans* (D36):** anticuerpo policlonal de conejo frente a la levadura *Candida albicans*. Obtenidos tras la inmunización de conejos con liofilizado de dicha levadura. Utilizado a una dilución de 1:500 en inmunofluorescencia y western blot y 1:1000 en dot-blot.
- **Anti-*C. glabrata* (D51):** anticuerpo policlonal de conejo frente a la levadura *Candida glabrata*. Obtenidos tras la inmunización de conejos con liofilizado de dicha levadura. Utilizado a una dilución de 1:500 en inmunofluorescencia y western blot y 1:1000 en dot-blot.
- **Anti-*S. cerevisiae* (D34):** anticuerpo policlonal de conejo frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Obtenidos tras la inmunización de conejos con liofilizado de dicha levadura. Utilizado a una dilución de 1:500 en inmunofluorescencia y western blot y 1:1000 en dot-blot.
- **Anti-*R. mucilaginosa* (D40):** anticuerpo policlonal de conejo frente a la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*. Obtenidos tras la inmunización de conejos con liofilizado de dicha levadura. Utilizado a una dilución de 1:500 en inmunofluorescencia y western blot y 1:1000 en dot-blot.
- **Anticuerpos secundarios:** los anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína y OPD (peroxidasa de rábano) fueron adquiridos a *Amersham* en el caso de los dot-blot y a *ABCAM* y *Sigma* en el caso de las inmunofluorescencias y de los western-blot

6.2. Inmunodetección de proteínas mediante western blot

Las proteínas se resuspendieron en tampón de carga para proteínas (Tris-HCl 0,37 M, pH 6.8; DTT 0,1 M; SDS 1%; glicerol 17%; azul de bromofenol 0,024%), se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa (*BIO-RAD*) en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH8.3; glicina 190 mM; metanol al 20% y

SDS al 0,1%) a un amperaje de 200 mA durante 15 horas aproximadamente (Harlow and Lane, 1988). Para verificar la eficacia de la transferencia, las membranas se tiñeron durante un minuto con Rojo Ponceau (Ponceau-S 0,2% y TCA 3%) y, posteriormente, se lavaron con agua destilada para retirar el tinte. La membrana de nitrocelulosa se saturó con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en tampón PBS durante una hora con agitación suave. A continuación se añadió el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (1:500) en leche desnatada al 1% en PBS y se incubó durante al menos 2 horas con agitación suave. Se realizaron tres lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con tampón TPBS (Tween20 al 0,05% en tampón salino PBS), después de los cuales se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa a una dilución 1:10000 en TPBS durante 1 hora. Una vez realizados tres nuevos lavados con TPBS, se procedió al revelado utilizando el sistema comercial ECL (*Amersham Biosciences*). Finalmente, las membranas se expusieron a una película autorradiográfica.

6.3. Dot-blot

Durante este trabajo se ha puesto a punto un sistema de detección no radiactivo de antígenos fúngicos en suero.

Se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los sueros en tampón TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl) y se aplicaron 200 μ l de cada dilución sobre una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD), empleando un aparato de filtración al vacío (BIO-RAD). La membrana de nitrocelulosa se saturó con una solución de leche desnatada en polvo al 3% en tampón TBS durante una hora con agitación suave. A continuación se añadió el anticuerpo primario a la dilución 1:1000 en leche desnatada al 1% en TBS y se incubó durante al menos 2 horas con agitación suave. Se realizaron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con tampón TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, Tween20 al 0,05%) después de los cuales se incubó con el anticuerpo secundario (anti Rb IgG POD) conjugado a peroxidasa a una dilución 1:5000 en TTBS durante una hora. Una vez realizados tres nuevos lavados con TTBS y otro con TBS, se procedió al revelado utilizando el sistema comercial ECL (*Amersham Biosciences*). Finalmente, las membranas se expusieron a una película autorradiográfica. El análisis densitométrico de las bandas se realizó empleando el densitómetro GS-710 de BIO-RAD.

6.4. Fungitell

Para la detección de componentes no antigénicos en suero, (1-3)- β -D-glucanos, se empleó de forma rutinaria el kit *Fungitell*, siguiendo las instrucciones del proveedor.

7. Manipulación de sangre humana

7.1. Extracción de sangre

Las extracciones de sangre a los diferentes pacientes, se realizaron con vacutainer en tubos con EDTA como anticoagulante y tubos con gel para la obtención de suero.

7.2. Hemocultivo

Para comprobar la presencia de levaduras en sangre se tomó 200 μ l y 4 ml de sangre de los tubos con EDTA y se sembraron en placas con YEPD y en medio YEPD de aislamiento respectivamente. Se incubaron durante al menos una semana a 32°C.

7.3. Obtención de suero

Para obtener el suero de la sangre de los diferentes pacientes se tomaron los tubos con gel y se centrifugaron durante 10 minutos a 2.500 r.p.m. Posteriormente la fase superior o suero se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C

8. Inmunofluorescencia

Para las inmunofluorescencias realizadas con la levadura *C. famata*, se tomó 1 ml de un cultivo de dicha levadura con D.O a 600 nm de 1,2. Se hizo un lavado con PBS sorbitol (Sorbitol 1,2 M, K_2HPO_4 0,1 M pH 6.2) y a continuación las levaduras se embebieron en cloruro amónico (NH_2Cl 50 mM en tapón salino PBS) durante 10 minutos. Después de tres lavados con TPBS (Tween20 al 0,05% en tampón salino PBS), se incubaron dos horas con el anticuerpo diluido (1:500 en el caso de suero humano y 1:1500 en el caso del antisuero D21) en TPBS, con balanceo suave a 37°C. Después de tres lavados con TPBS de 15 minutos, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a Fluoresceína verde. Tras incubar las muestras durante media hora a temperatura ambiente en agitación, se realizaron tres nuevos lavados con TPBS.

Finalmente, las células se fijaron con llama al cubreobjetos de vidrio y los cubres se montaron con una gota de Depex-xileno sobre los portaobjetos, se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron en un microscopio confocal *MicroRadiance* de *BIO-RAD*.

Las inmunofluorescencias con el resto de levaduras de la especie *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) se realizaron utilizando el kit *Euroimmun* siguiendo las instrucciones de la casa comercial (*Análisis y genética S.L. Euroimmun*)

9. Inmunomicroscopía electrónica

Para conocer la diana del antisuero de conejo D21 se puso a punto la técnica de inmunomicroscopía electrónica.

Se siguió el protocolo de Wright y colaboradores (1988) (Wright *et al*, 1988) con algunas modificaciones. Las células se fijaron durante 2 horas a temperatura ambiente con glutaraldehído 2% en tampón cacodylato 0,1 M, pH 7.2 y posteriormente se lavaron con ácido tánico 0,15% en tampón cacodylato 0,05 M, pH 7.2. Finalmente las células se embebieron en Epon (TAAB laboratorios, Berkshire, England).

Una vez se tuvieron los cortes fijados en las rejillas, éstas se humedecieron durante un minuto con PBS. A continuación las rejillas se bañaron con NH_2Cl 0,5 M durante 15 minutos y se bloquearon con BSA al 1% en tampón PBS 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario a la dilución correspondiente en leche desnatada al 1% en PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados sucesivos de 7 minutos cada uno con BSA al 0,1% en tampón PBS, después de los cuales se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a oro coloidal de 10 nm de diámetro a una dilución 1:10000 en PBS, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez realizados dos nuevos lavados de 7 minutos con PBS y un último lavado con H_2O tridestilada (sumergiendo completamente la rejilla) se dejaron secar y se procedió a su observación.

10. Análisis estadístico

Para ampliar el estudio de la relación entre enfermedades y la presencia o no de hongos en individuos que padecen dichas enfermedades se realizaron análisis estadísticos. Con estos

análisis se quiso comprobar si la relación entre las variables estudiadas (enfermedad y presencia de hongo) se debe al azar. El nivel de significación estadística considerado fue $P \leq 0.05$, es decir, cuando la probabilidad es inferior a 0,05 o lo que es lo mismo al 5%, la relación entre las variables no se debe al azar. Como la muestra era muy pequeña se utilizó el estadístico Chi-cuadrado no paramétrico para el estudio de la relación entre variables cualitativas. Para la realización de este estudio estadístico nos hemos apoyado en el software SPSS 12.0 de Apache Software Foundation.

En la figura 6 se muestra un esquema de las relaciones analizadas:

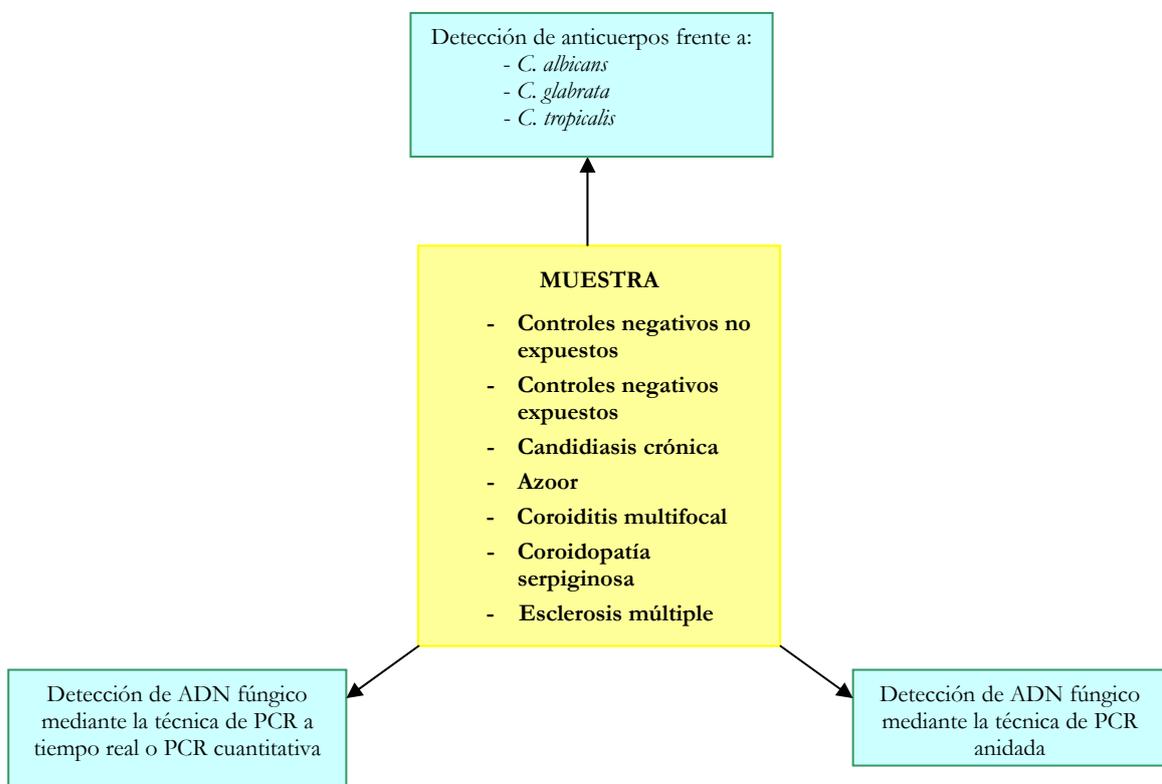


Figura 6. Esquema de las variables analizadas y grupos estudiados.

RESULTADOS

1. La PCR como método diagnóstico

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o técnica de PCR es un método enzimático que permite sintetizar numerosas copias de un fragmento concreto de ADN. Para ello se emplean dos oligonucleótidos complementarios a lo que serán los extremos del producto y por tanto se requiere el conocimiento de las secuencias que flanquean la región a amplificar (Rojo, 2001). La técnica de PCR posee múltiples aplicaciones en medicina e investigación y permite abordar nuevos problemas biológicos (Rojo, 2001). Entre sus múltiples aplicaciones cabe destacar su empleo en el diagnóstico de infecciones (Mussi-Pinhata *et al*, 1994). En el caso de las infecciones causadas por hongos, la técnica de PCR permite diseñar procedimientos para detectar grupos de especies a partir de una secuencia nucleotídica conservada evolutivamente, o bien más específicamente, detectar de forma selectiva las secuencias nucleotídicas propias de una determinada (Hall *et al*, 2003; Li *et al*, 2003; Nishikawa *et al*, 1997; Nishikawa, 1999). Recientemente en nuestro laboratorio se ha creado una nueva línea de investigación que tiene como objetivo estudiar las enfermedades originadas por patógenos de origen fúngico, utilizando entre otras, la técnica de PCR como método de diagnóstico.

1.1. Diseño de oligonucleótidos

El primer paso para el empleo de la técnica de PCR es el diseño de los oligonucleótidos que actúan como cebadores en la reacción de polimerización. Este paso está condicionado al tipo de secuencia nucleotídica que se desee amplificar. En este trabajo se precisaban, tanto secuencias de ADN conservadas en todos los hongos, como secuencias de ADN propias de humano, ratón o de cada una de las especies de hongo consideradas. A continuación se describen de forma detallada los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Todos los cebadores empleados para amplificar ADN fúngico se diseñaron con el propósito de detectar un gran número de especies de hongos de interés clínico. Las secuencias de todos ellos se describen en el apartado 5.7 de Materiales y Métodos

1.1.1. Oligonucleótidos diseñados para hibridar con secuencias de ADN de levadura

Oligonucleótidos Leva 18s: Leva 18s 5' y Leva 18s 3'. La secuencia obtenida tras realizar una PCR con estos oligonucleótidos posee una longitud de alrededor de 600 pb. Los cebadores Leva 18s hibridan con regiones conservadas de ADN del gen que codifica para el ARN ribosómico fúngico 18S (figura 7). Estos oligonucleótidos permiten determinar la presencia de células fúngicas en una muestra concreta.

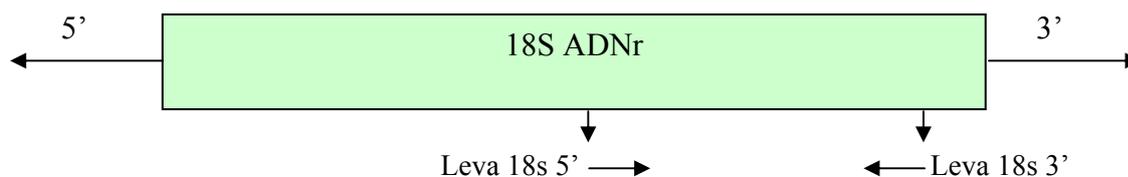


Figura 7. Gen ribosómico fúngico 18S. Las secuencias diana donde hibridan los oligonucleótidos están indicadas mediante flechas. El oligonucleótido **Leva 18s 5'** hibrida con la región central del 18S ADNr de las diferentes especies de levaduras y el oligonucleótido **Leva 18s 3'** hibrida con la región 3' terminal del 18S ADNr.

Para su diseño se compararon las secuencias del gen ribosómico 18S de humano y de una serie de levaduras (tabla 2), empleando para ello las secuencias encontradas en la base de datos del NCBI y la aplicación informática de alineación de secuencias *Clustal W* (figura 8). Se eligieron regiones del gen que estaban conservadas entre las diferentes levaduras pero no en humanos.

Tabla 2. Organismos y número de acceso a la base de datos del NCBI de las secuencias génicas empleadas para el diseño de los oligonucleótidos Leva 18s.

| Organismo | Número de acceso NCBI |
|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | AB03567 |
| <i>Pichia guilliermondii</i> | AB013587 |
| <i>Candida albicans</i> | AB013586 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | AY055855 |
| <i>Candida glabrata</i> | AB094140 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | X84326 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | AJ560315 |
| <i>Homo sapiens</i> | Ng002801 |

```

C.g      888  AGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGT /.../ 1483  CTTAGA-CGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
D.h      875  AGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGT /.../ 1472  CTTAGA-CGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
P.g      875  AGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGT /.../ 1472  CTTAGA-CGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
C.a      860  AGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGT /.../ 1457  CTTAGA-CGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
C.p      877  AGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGT /.../ 1474  CTTAGA-CGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
R.m      896  GAGATCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGT /.../ 1494  CTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
C.n      814  AGGATCGCCGTAATGATTAATAGGGACGGT /.../ 1410  CTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC
H.sapiens 1028  AGGACTGAGGCCATGATTAAGAGGGATGTC /.../ 1638  CTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC

```

Figura 8. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen ribosómico 18S de los organismos citados en la tabla 2. *C.g.*: *C. glabrata*, *D.h.*: *Debaryomyces hansenii*, *P.g.*: *Pichia guilliermondii*, *C.a.*: *C. albicans*, *C.p.*: *C. parapsilosis*, *R.m.*: *Rhodotorula mucilaginosa*, *C.n.*: *Cryptococcus neoformans*, *H.sapiens*: *Homo sapiens*.

Oligonucleótidos ITS: ITS 5' e ITS 3'. Estos oligonucleótidos hibridan con regiones terminales de genes que codifican para ARN ribosómico. El cebador ITS 5' hibrida en la región 3' terminal del gen ribosómico 18S y el cebador ITS 3' tiene su secuencia diana en la región 5' inicial del gen ribosómico 5.8S (figura 9). Entre los genes 18S y 5.8S se encuentra una región intergénica (internal transcribed spacer 1 o *its1*) que se caracteriza por ser muy variable en secuencia nucleotídica y longitud entre las distintas especies de hongos. La amplificación de la secuencia *its1* y su posterior secuenciación permite, por lo tanto, la identificación de la especie fúngica.

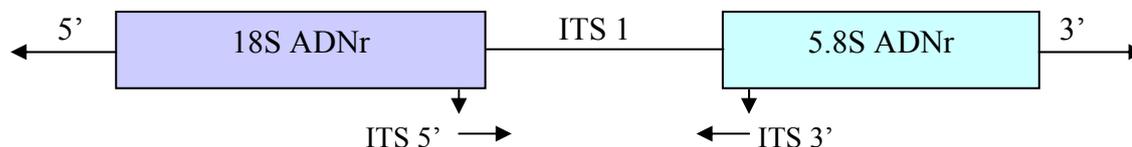


Figura 9. Organización de los genes ribosómicos fúngicos. Las áreas utilizadas como secuencias diana por los oligonucleótidos están indicadas mediante flechas. El oligonucleótido ITS 5' hibrida con la región 3' terminal del 18S ADNr de las diferentes especies de levaduras y el ITS 3' hibrida con la región 5' inicial del 5.8S ADNr.

Su diseño se realizó de forma similar a los oligonucleótidos Leva 18s, comparando esta vez las secuencias de los genes ribosómicos 18S y 5.8S de humano y de las levaduras que se exponen en la tabla 3. De igual forma, se emplearon para ello las secuencias encontradas en la base de datos del NCBI y la aplicación informática de alineación de secuencias *Clustal W* (figura 10).

Tabla 3. Organismos y número de acceso a la base de datos del NCBI de las secuencias génicas empleadas para el diseño de los oligonucleótidos ITS, M18s.

| Organismo | Número de acceso NCBI Gen 18S | Número de acceso NCBI Gen 5.8S |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | AB03567 | AB053098 |
| <i>Pichia guilliermondii</i> | AB013587 | AB455495 |
| <i>Candida albicans</i> | AB013586 | AB049122 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | AY055855 | AF287909 |
| <i>Candida glabrata</i> | AB094140 | AY198398 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | X84326 | AJ493574 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | AJ560315 | AF321544 |
| <i>Homo sapiens</i> | NG002801 | U13369 |

```

                ITS 5'                               ITS 3'
C.g      814  TCCGTAGGTGA-CCTGCGGAAGATAN--- /its/ 49 -AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCG
D.h      1804 TCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATT /its/ 24 -----TCTCG
P.g      1804 TCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATT /its/ 54 AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
C.a      1789 TCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATT /its/ 58 AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
C.p      1806 TCCGTAGGTGAACTGCAGAGGATCA--- /its/ 53 AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCG
R.m      1824 TCCGTAGGTGAACTGNGGAAGGATCATT /its/ 51 AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCG
C.n      ----- /its/ 55 AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTTCCA
H.sapiens 1944 TCCATAGTTGAACCTGTTCGAGGGATCATT /its/ 42 CGACTCTTAGCGGTGGATCACTCGGCTCGTG

```

Figura 10. Alineamiento de las secuencias nucleóticas de los genes ribosómicos 18S y 5.8S de los organismos citados en la tabla 3. *C.g.*: *C. glabrata*, *D.h.*: *Debaryomyces hansenii*, *P.g.*: *Pichia guilliermondii*, *C.a.*: *C. albicans*, *C.p.*: *C. parapsilosis*, *R.m.*: *Rhodotorula mucilaginosa*, *C.n.*: *Cryptococcus neoformans*, *H.sapiens*: *Homo sapiens*.

Oligonucleótidos M18s: M18s 5' y M18s 3'. Estos oligonucleótidos, al igual que los cebadores ITS, hibridan con regiones terminales de genes que codifican para ARN ribosómico. El oligonucleótido M18s 5' hibrida con la región que comprende los nucleótidos 2112-2129 del gen ribosómico 18S, aproximadamente 300 pares de bases más arriba de la secuencia del oligonucleótido ITS 5'. El oligonucleótido M18s 3' hibrida con la región que comprende los nucleótidos 53-71 del gen ribosómico 5.8S de la mayoría de las levaduras, alrededor de 100 pares de bases en dirección 3' por debajo del oligonucleótido ITS 3' (figura 11). Es decir, en la secuencia interna que resulta al realizar una amplificación con los oligonucleótidos M18s, se encuentran las secuencias diana donde hibridan los

oligonucleótidos ITS. Estos cebadores se diseñaron para su empleo en la técnica de PCR anidada (nested PCR). Esta técnica consiste en realizar una segunda PCR, utilizando en este caso los oligonucleótidos ITS, después de haber realizado una primera amplificación con los oligonucleótidos M18s. De esta forma se consigue aumentar significativamente la sensibilidad de la técnica de PCR.

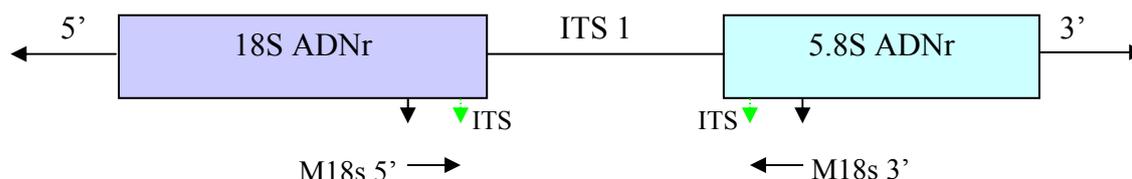


Figura 11. Organización de los genes ribosómicos fúngicos. Las áreas utilizadas como secuencias diana por los oligonucleótidos están indicadas mediante flechas. El oligonucleótido M18s 5' hibrida con la región 3' terminal del 18S ADNr de las diferentes especies de levaduras, alrededor de 300 pares de bases más arriba del oligonucleótido ITS 5' (en verde). El M18s 3' hibrida con la región 5' inicial del 5.8S ADNr, alrededor de 100 pares de bases por debajo del ITS 3' (en verde).

Tanto el oligonucleótido M18s 5' como el M18s 3' hibridan con regiones muy conservadas de los genes ribosómicos de levaduras. Para el diseño de esta pareja de oligonucleótidos se compararon las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 18S y 5.8S de humano y de las levaduras que se presentan en la tabla 3, de forma similar a los oligonucleótidos ITS (datos no mostrados).

Oligonucleótidos y sonda TaqMan: TaqMan 5', TaqMan 3' y sonda **TaqMan**. Los oligonucleótidos TaqMan, al igual que los oligonucleótidos ITS y M18s, hibridan con regiones terminales de los genes que codifican para los ARN ribosómicos 18S y 5.8S. El cebador TaqMan 5' hibrida en la región 3' terminal del gen ribosómico 18S y el cebador TaqMan 3' tiene su secuencia diana en la región 5' inicial del gen ribosómico 5.8S (figura 12). Estos oligonucleótidos se diseñaron con el fin de llevar a cabo la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real mediante sondas TaqMan. Esta técnica permite determinar, además de la existencia o no de infección, el número de genomas fúngicos presentes en la muestra. Para realizar esta técnica es necesario, en la reacción de amplificación, la presencia de una sonda marcada en uno de sus extremos con un fluoróforo y en otro de sus extremos con un quencher, como se explica en el apartado de Resultados 1.6, y es imprescindible que hibride dentro de la secuencia nucleotídica que van a amplificar los oligonucleótidos. En este trabajo la sonda diseñada hibrida en una región conservada de la secuencia intergénica **its 1** del genoma de levaduras.

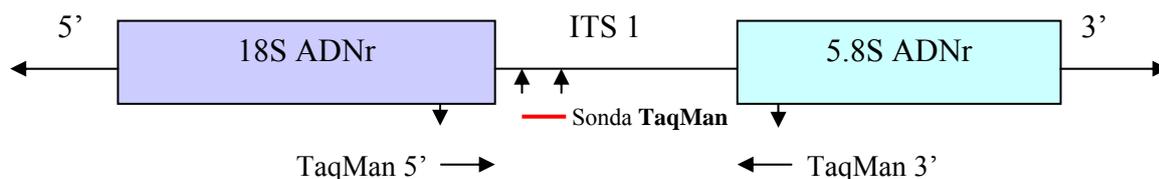


Figura 12. Organización de los genes ribosómicos fúngicos. Las áreas utilizadas como secuencias diana por los oligonucleótidos TaqMan y la sonda **TaqMan** están indicadas mediante flechas. El oligonucleótido TaqMan 5' hibrida con la región 3' terminal del 18S ADNr de las diferentes especies de levaduras y el cebador TaqMan 3' hibrida con la región 5' terminal del 5.8S ADNr. La sonda **TaqMan** hibrida con la región inicial de la secuencia intermedia **its**.

Para el diseño de esta pareja de oligonucleótidos y de la sonda, se realizó un análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 18S y 5.8S y las secuencias intermedias **its 1** de humano y de las levaduras que se presentan en la tabla 4, siguiendo el mismo procedimiento que con los oligonucleótidos Leva 18s, ITS y M18s.

Tabla 4. Organismos y secuencias completas, disponibles en el banco de genes del NCBI, de los genes ribosómicos 18S y 5.8S y la secuencia intermedia entre ambos **its 1**, empleados para el diseño de los oligonucleótidos y sonda TaqMan.

| Organismo | Número de acceso NCBI Gen 18S | Número de acceso NCBI Gen 5.8S | Número de acceso NCBI Secuencia its 1 |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | AB03567 | AB053098 | AB053101 |
| <i>Pichia guilliermondii</i> | AB013587 | AB455495 | AM117815 |
| <i>Candida albicans</i> | AB013586 | AB049122 | AB05432 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | AY055855 | AF287909 | AJ635316 |
| <i>Candida glabrata</i> | AB094140 | AY198398 | AY198398 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | X84326 | AJ493574 | AB026010 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | AJ560315 | AF321544 | AY518273 |
| <i>Homo sapiens</i> | NG002801 | U13369 | X58053 |

1.1.2. Oligonucleótidos diseñados para hibridar con secuencias de ADN humano

Oligonucleótidos β -globina: β -globina 5' y β -globina 3'. Cedidos amablemente por la empresa Oculab. La amplificación de ADN con estos oligonucleótidos se empleó para optimizar el método de detección de hongos mediante la técnica de PCR y como control de extracción de ADN, es decir, para comprobar la adecuada extracción del material genético de muestras procedentes de humano. La secuencia obtenida al realizar una amplificación

con estos oligonucleótidos posee una longitud de aproximadamente 500 pb. Los cebadores β -globina (figura 13) tienen su secuencia diana en el gen que codifica para la β -globina humana.

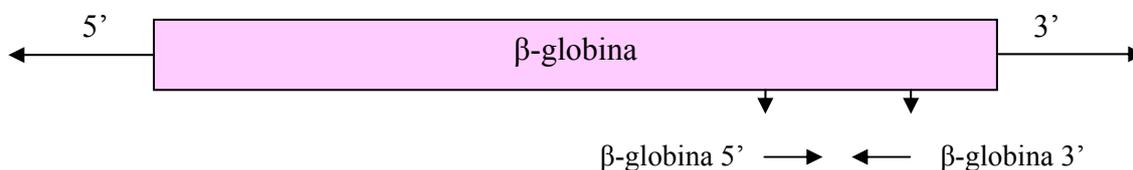


Figura 13. Gen que codifica para la β -globina humana. Las áreas utilizadas como secuencias diana por los oligonucleótidos β -globina están indicadas mediante flechas. Los cebadores β -globina 5' y β -globina 3' hibridan con diferentes zonas del extremo 3' terminal de dicho gen.

1.1.3. Oligonucleótidos diseñados para hibridar con secuencias de ADN de ratón

Oligonucleótidos Ikaros: Ikaros 5' e Ikaros 3'. Cedido amablemente por el laboratorio del doctor Fernández Piqueras. La secuencia obtenida al realizar una amplificación con estos oligonucleótidos presenta una longitud de aproximadamente 250 pb y permite confirmar la adecuada extracción del material genético de muestras procedentes de ratón. Los cebadores Ikaros tienen su secuencia diana en un exón del gen Ikaros de ratón.

1.2. Optimización de la técnica de PCR

Un factor crítico para determinar la fidelidad y rendimiento de la técnica de PCR, lo constituye el grado y especificidad de hibridación de los oligonucleótidos a sus correspondientes secuencias diana. Este parámetro va a depender de la temperatura de hibridación y la concentración de ciertos iones, en concreto Mg^{2+} . Un aspecto a tener en cuenta es que cada pareja de oligonucleótidos requiere concentraciones iónicas y temperaturas diferentes en cada caso.

Por tanto, el primer objetivo de esta tesis doctoral fue buscar las condiciones de concentración de Cl_2Mg y de temperatura de hibridación óptimas para cada una de las parejas de oligonucleótidos empleadas en este trabajo y explicadas previamente. Estos ensayos de optimización se realizaron empleando como molde ADN extraído de linfocitos para los oligonucleótidos β -globina y ADN extraído de *C. famata* en el caso de los oligonucleótidos que hibridan en los genes que codifican para el ARN ribosomal de levadura (técnica de extracción de ADN detallada en Materiales y Métodos 5.1.1,

protocolo 3). Los parámetros de los oligonucleótidos Ikaros, habían sido previamente optimizados por el laboratorio del doctor Fernández Piqueras.

1.2.1. Concentración de Cl_2Mg

La concentración óptima del ión Mg^{2+} en la reacción de PCR suele estar condicionada por las posibles sales o quelantes que puedan estar disueltas en las preparaciones de ADN y/o por el exceso de nucleótidos. Este hecho hizo necesaria la búsqueda de las condiciones experimentales óptimas para cada caso concreto ADN-pareja de cebadores.

En primer lugar, se realizó una aproximación inicial usando un rango de concentración de Cl_2Mg comprendido entre 4 mM y 20 mM (datos no mostrados). Esto permitió conocer el intervalo de concentración en el que se amplificaba más cantidad de ADN molde con cada pareja de oligonucleótidos tal y como se muestra en la tabla 5. A continuación, se realizó una segunda aproximación empleando concentraciones de Cl_2Mg comprendidas en dichos intervalos, por ejemplo, 0,25 mM y 4 mM en el caso de los cebadores Leva 18s, consiguiendo así la concentración óptima.

Tabla 5. Intervalos de concentración y concentración óptima de Cl_2Mg para cada pareja de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Intervalos de concentración de Cl_2Mg (mM) | Concentración óptima Cl_2Mg (mM) |
|------------------|--|------------------------------------|
| Leva 18s | 0,25-3,4 | 1,5 |
| ITS | 4-20 | 4-20 |
| M18s | 1-10 | 4-5 |
| B-globina | 0,5-5 | 1,5 |
| Ikaros | - | 1,5 |
| TaqMan | 3-11 | 1,5 |

Los resultados muestran que la concentración óptima de Cl_2Mg varía en función de la pareja de oligonucleótidos utilizada en la reacción de PCR (tabla 5). Este es un dato importante, sobre todo en el caso de los oligonucleótidos ITS y los oligonucleótidos M18s puesto que se emplearán conjuntamente en experimentos posteriores (PCR anidada). Los valores óptimos de concentración de Cl_2Mg se muestran en la tabla 5.

1.2.2. Temperatura de hibridación

La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos depende de varios factores:

- secuencia (en especial la relación de G y C),
- longitud
- posible presencia de desapareamientos con la secuencia complementaria en el molde.

En general, las temperaturas de hibridación predeterminadas (medidas por el factor de T_m) resultan adecuadas, aunque en ocasiones es necesario incrementar ligeramente dicha temperatura para evitar ciertos problemas como inespecificidades que generan secuencias de ADN distintas a las esperadas, problemas de estructura secundaria de los oligonucleótidos, etc. Por lo tanto, de la misma forma que en el caso del Cl_2Mg , fue necesaria la búsqueda de las condiciones experimentales óptimas de temperatura de hibridación para cada pareja de cebadores.

Para ello, se realizó una primera aproximación tomando el rango de temperatura comprendido entre 40°C y 70°C (datos no mostrados). Esto permitió conocer el intervalo de temperatura de hibridación en el que se amplificaba de forma específica más cantidad de ADN molde con cada pareja de oligonucleótidos (tabla 6). A continuación, se realizó una segunda aproximación empleando rangos de temperatura comprendidos en dichos intervalos, por ejemplo, 46°C y 48°C en el caso de los cebadores Leva 18s, consiguiendo así la temperatura de hibridación óptima en cada caso.

La temperatura de hibridación óptima de cada pareja de oligonucleótidos, como ocurre con la concentración de Cl_2Mg , varía de unos a otros (tabla 6), aspecto que también se consideró posteriormente en los ensayos de PCR anidada.

Tabla 6. Intervalos de T^a y T^a óptima de hibridación para cada pareja de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Intervalos de temperatura de hibridación (°C) | Temperatura óptima (°C) |
|------------------|---|-------------------------|
| Leva 18s | 46-48 | 46,2 |
| ITS | 45-60 | 52 |
| M18s | 50-66 | 57,3 |
| B-globina | 50-70 | 60 |
| Ikaros | - | 55 |
| TaqMan | 59-65 | 60 |

1.2.3. Polimerasas

Otro de los parámetros que influye en la sensibilidad de la amplificación mediante PCR es la ADN polimerasa Taq empleada. Por este motivo, se decidió comparar varias polimerasas suministradas por casas comerciales diferentes, para seleccionar aquella que aportara un mejor rendimiento y especificidad en la amplificación del ADN aislado. Las tres polimerasas empleadas fueron: la polimerasa de *Perkin Elmer*, la mezcla de reacción *2xJumpStart* de *Sigma* (que contiene la polimerasa de *Sigma*) y la polimerasa de *Bioroon*. Para el estudio comparativo con cada una de las tres polimerasas, se tomó un cultivo de levadura de D.O a 600 nm de 0,6 y se realizaron diluciones seriadas 1/10 seleccionándose el intervalo de diluciones de 10^{-2} a 10^{-9} . Se realizó extracción de ADN de cada una de las suspensiones obtenidas y a continuación se procedió a hacer PCR simple con cada una de las polimerasas y los oligonucleótidos ITS (figura 14).

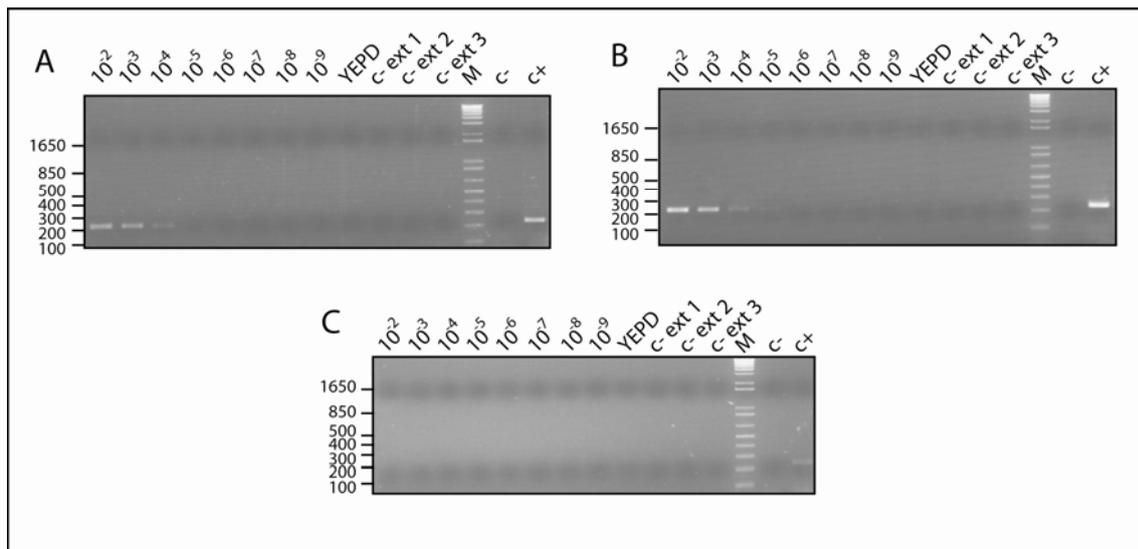


Figura 14. Análisis comparativo de la sensibilidad de tres ADN Taq polimerasas. (A) ADN Taq polimerasa de Perkin Elmer, **(B)** ADN Taq polimerasa de Sigma y **(C)** ADN Taq polimerasa de Bioroon. 10^{-2} - 10^{-9} : diluciones del cultivo de *C. famata*. YEPD: control de extracción a partir de YEPD. c-ext 1, c-ext 2 y c-ext 3: control de extracción a partir de H_2O . M: Marcador de peso molecular, c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR. Se extrajo el ADN de cada muestra y se realizó PCR con cada una de las tres polimerasas. A continuación las muestras se analizaron en geles de agarosa.

En la figura 14 puede observarse que las polimerasas de las casas comerciales *Perkin Elmer* y *Sigma* (figura 14A y 14B respectivamente) eran capaces de amplificar el ADN molde presente en la dilución 10^{-3} , mientras que la de *Bioroon* no era capaz de amplificar ADN de ninguna de las muestras testadas (figura 14C). En un último ensayo se observó que la

polimerasa de *Sigma* amplificaba secuencias inespecíficas que dificultaban la interpretación de los resultados (datos no mostrados). Por ello se seleccionó la polimerasa de *Pekin Elmer* para ser empleada en ensayos posteriores.

1.3. Especificidad de las parejas de oligonucleótidos

En este trabajo, debido a la necesidad de amplificar ADN de diferentes organismos, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (descritos en Resultados 1.1). Para confirmar el grado de especificidad de las diferentes parejas de oligonucleótidos, se tomó como molde ADN de diferentes levaduras, de bacteria, de humano y de ratón (tabla 7) extraído con el protocolo 3 en los tres primeros casos y con el protocolo 6 en el cuarto caso (Materiales y Métodos), y se realizó una amplificación mediante PCR con cada pareja de oligonucleótidos (figura 15).

Tabla 7. Relación de los organismos cuyo ADN ha sido empleado para comprobar la especificidad de cada pareja de oligonucleótidos. *Candida famata* = *Debaryomyces hansenii*.

| | Organismos y cultivos celulares empleados para la extracción de ADN |
|--------------------------|--|
| Levadura | <i>Candida famata</i> tipo |
| | <i>Candida famata</i> aislado |
| | <i>Lacazia spp</i> |
| | <i>Cándida albicans</i> |
| | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| Bacteria | <i>Escherichia coli</i> |
| | <i>Bacillus cereus</i> |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Humano | Células Hela |
| | Linfocitos |
| Ratón (Cepa Swis) | Bazo |
| | Intestino delgado |

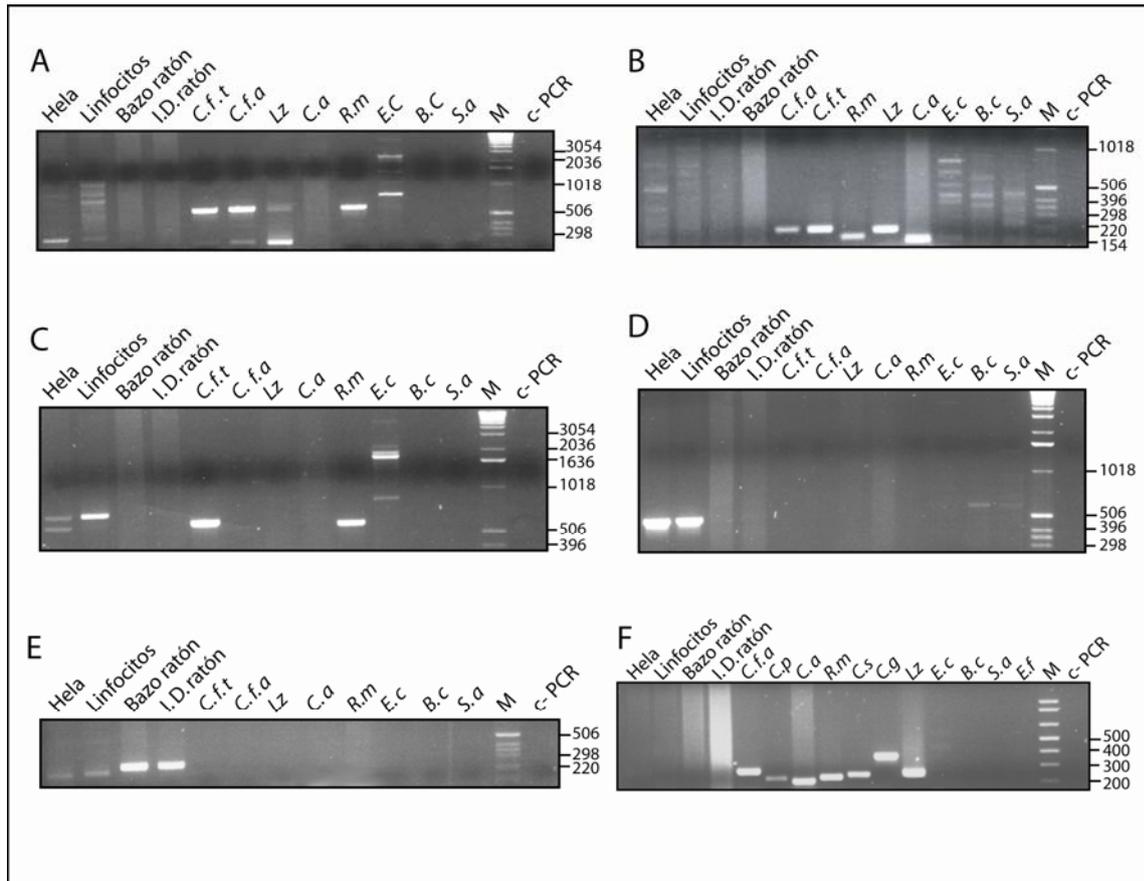


Figura 15. Análisis de la especificidad de las diferentes parejas de oligonucleótidos. Se seleccionaron ADNs de distintos organismos y se amplificaron empleando cada pareja de oligonucleótidos. **(A)** oligonucleótidos Leva 18s, **(B)** oligonucleótidos ITS, **(C)** oligonucleótidos M18s, **(D)** oligonucleótidos β -globina, **(E)** oligonucleótidos Ikaros y **(F)** oligonucleótidos TaqMan. Hela: ADN extraído de células Hela, Linfocitos: ADN extraído de linfocitos humanos, I. D. Ratón: ADN extraído de intestino delgado de ratón, C.f.t: *C. famata tipo*, C.f.a: *C. famata aislado*, Lz: *Lacazya*, C.a: *C. albicans*, R.m: *Rhodotorula mucilaginosa*, C.s: *Criptococcus saitoi*, C.g: *C. glabrata*, E.c: *Escherichia coli*, B.c: *Bacillus cereus*, S.a: *Staphilococcus aureus* y E.f: *Enterococcus faecalis*. M: marcador de peso molecular y c- PCR: control negativo de PCR.

Cada pareja de oligonucleótidos amplificó de forma específica el ADN del organismo para el que fueron diseñados (figura 15), aunque en el caso de los oligonucleótidos M18s (figura 15C), y los oligonucleótidos Ikaros (figura 15E), se amplificaron secuencias inespecíficas de ADN humano. Sin embargo, este hecho no supone un problema para su empleo en la realización de un diagnóstico. Los M18s fueron diseñados para utilizarse junto con los cebadores ITS en la técnica de PCR anidada, por lo que en ningún caso se emplearían para realizar un diagnóstico por sí solos. En cuanto a los Ikaros, los fragmentos inespecíficos son de menor longitud y aparecen en una cantidad mucho menor que los que resultan de utilizar como molde ADN de ratón.

1.4. Amplificación de ADN de levaduras empleando los oligonucleótidos ITS

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, los oligonucleótidos ITS amplifican la secuencia intergénica (**its 1**) situada entre los genes ribosómicos 18S y 5.8S fúngicos. La región **its 1** es muy variable entre las distintas especies de hongos, tanto en secuencia nucleotídica como en longitud. Por lo tanto, la amplificación de esta región dará una primera aproximación sobre la posible especie fúngica presente en la muestra analizada, que se confirmará posteriormente con la secuenciación del fragmento amplificado. Para conocer el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos de amplificar la región **its 1** de cada una de las levaduras empleadas en este trabajo, se realizó una PCR con los oligonucleótidos ITS empleando como molde ADN de cada una de dichas levaduras (figura 16).

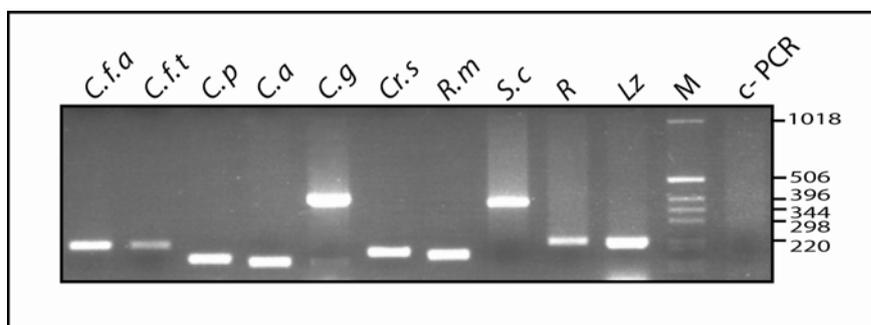


Figura 16. Migración electroforética de los productos obtenidos tras amplificar, empleando los oligonucleótidos ITS, el ADN de diferentes especies de levadura. C.f.a: *C. famata aislado*, C.f.t: *C. famata tipo*, C.p: *C. parapsilosis*, C.a: *C. albicans*, C.g: *C. glabrata*, C.s: *Cryptococcus saitoi*, R.m: *Rhodotorula mucilaginosa*, S.c: *Saccharomyces cerevisiae*, R: *Rhizopus*, Lz: *Lacazia*, M: marcador de peso molecular y c- PCR: control negativo de PCR

En la figura 16 se observa que los productos obtenidos de amplificar la secuencia **its 1** de *Lacazia*, *Rhizopus* y *C. famata* migran a una altura de alrededor de 240 pb. En el caso de *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *Cryptococcus saitoi* y *R. mucilaginosa* migran a una altura de aproximadamente 220 pb y en el caso de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* a una altura de alrededor de 400 pb. Por tanto, el tamaño del fragmento de ADN amplificado usando los oligonucleótidos ITS puede reducir sustancialmente el espectro de levaduras a considerar cuando existe sospecha de infección fúngica.

1.5. PCR anidada

Generalmente la cantidad de levadura presente en una muestra, sanguínea o de tejido, de un individuo infectado es muy baja (entre 1 y 100 ufc/ml o incluso menos), y en muchas ocasiones una PCR simple no es suficientemente sensible para su detección, siendo necesario un método diagnóstico que posea mayor sensibilidad (Pryce *et al*, 2003; Reiss and Morrison, 1993). Para este fin, se puso a punto la técnica de PCR anidada, que consiste en la realización de dos amplificaciones consecutivas de una misma muestra empleando dos parejas de oligonucleótidos diferentes. Con una pareja de oligonucleótidos se realiza una primera amplificación, sintetizándose un fragmento de ADN que contiene en su secuencia los sitios de hibridación de la otra pareja de oligonucleótidos. De esta forma, al realizar una segunda PCR, la segunda pareja de cebadores hibrida con secuencias internas del fragmento previamente amplificado, obteniéndose una cantidad muy elevada de producto. En este caso, los oligonucleótidos empleados en la primera PCR son los M18s (Resultados 1.1) y el fragmento de ADN amplificado contiene en su secuencia los sitios de hibridación de los cebadores ITS (Resultados 1.1). Ambas parejas de oligonucleotidos requieren diferentes temperaturas de hibridación en la reacción de PCR (Resultados 1.2), con lo cual, disminuye la probabilidad de hibridaciones cruzadas entre los cuatro oligonucleótidos. Además, se subió la concentración de Cl_2Mg de la mezcla de PCR para los oligonucleótidos ITS a 8 mM. De esta manera se maximizó la especificidad de la reacción.

Para determinar la sensibilidad de la PCR anidada con respecto a una PCR simple, se preparó un cultivo de *C. famata* según se describe en Materiales y Métodos, se realizaron diluciones seriadas 1/10, se extrajo el ADN de cada una de las diluciones y a continuación se procedió a realizar una PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS y una PCR anidada (figura 17)

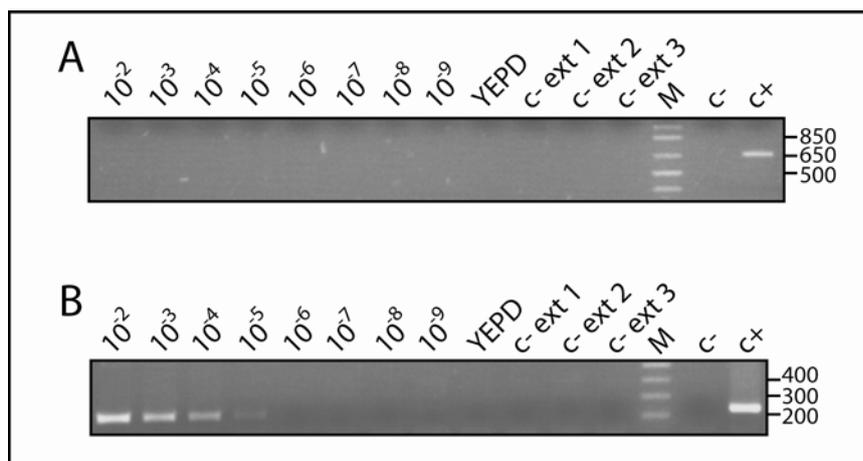


Figura 17. Análisis de la sensibilidad de la PCR anidada. (A) primera amplificación, realizada con los oligonucleótidos M18s y (B) segunda amplificación, realizada con los oligonucleótidos ITS. 10^{-2} - 10^{-9} : diluciones del cultivo de *C. jamata*. YEPD: control de extracción a partir de YEPD. c-ext 1, c-ext 2 y c-ext 3: control de extracción a partir de H₂O. M: Marcador de peso molecular, c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR. Una vez realizadas las dos amplificaciones las muestras se analizaron en geles de agarosa al 1,5% p/v.

En la figura 17 se aprecia un aumento notable de la sensibilidad con la realización de la PCR anidada. Mientras que una PCR simple con los oligonucleótidos ITS es capaz de amplificar hasta la dilución 10^{-4} (figura 14A), la PCR anidada amplifica el ADN de una muestra 10 veces más diluida, dilución 10^{-5} (figura 17B). Con estos resultados, podemos afirmar que la PCR anidada es 10 veces más sensible que la PCR simple.

La técnica de PCR anidada presenta de forma inherente a su extraordinaria sensibilidad, una gran facilidad para producir falsos positivos, ya que pueden amplificarse pequeñas contaminaciones que en una PCR simple pasarían desapercibidas. Para solucionar este problema se extremaron las condiciones de esterilidad empleando una cabina de flujo laminar para el manejo y preparación de las muestras a analizar.

1.6. PCR cuantitativa

En la técnica de PCR cuantitativa, el proceso de amplificación se monitoriza a tiempo real a medida que se va desarrollando la reacción mediante detección por fluorescencia de los productos amplificados, y se analiza la curva de amplificación para obtener información sobre la cantidad de molde inicial.

Existen básicamente dos formas de detección fluorescente de los productos amplificados. En este trabajo se ha empleado la técnica de sonda TaqMan basada en la actividad

exonucleasa de la enzima Taq Polimerasa. La amplificación tiene lugar en presencia de tres oligonucleótidos: los dos específicos más un tercero que es una sonda marcada con un compuesto fluorescente localizado cerca de un "quencher" o molécula aceptora para FRET (transferencia de energía de resonancia). El FRET consiste en la transferencia de la energía de una molécula fluorescente excitada a otra molécula próxima cuyo espectro de excitación se solapa con el espectro de emisión de la primera molécula, en ausencia de irradiación. Esta sonda, de pequeño tamaño, se une a una secuencia interna del fragmento del genoma que se va a amplificar y resulta degradada por la actividad exonucleolítica de la enzima Taq polimerasa cuando se desplaza la cadena en la reacción de polimerización. Como consecuencia, el fluoróforo y el quencher se separan y se liberan al medio moléculas fluorescentes libres, que se van acumulando a lo largo de los ciclos de la PCR.

En este caso, los oligonucleótidos utilizados son específicos de levadura. Fueron diseñados para hibridar con zonas muy conservadas de los genes ribosómicos fúngicos 18S y 5.8S (Resultados 1.1), pero a su vez, el producto que se obtiene (región **its 1**) varía en secuencia y longitud en función de la especie de hongo a la que pertenezca. Este hecho permite realizar la identificación de la especie tras la secuenciación. La sonda fluorescente empleada hibrida en una zona conservada de esta región variable o **its 1**, permitiendo una cuantificación absoluta de los hongos o levaduras presentes en la muestra.

Para la puesta a punto de esta técnica se elaboró una recta patrón empleando un stock de ADN de levadura de concentración conocida y se siguió el mismo procedimiento que en el caso de la PCR anidada. Una vez extraído el ADN se realizó una PCR cuantitativa (tabla 8). Los resultados muestran que la PCR cuantitativa es capaz de amplificar la dilución 10^{-5} , inclusive la dilución 10^{-6} que equivaldría a menos de 20 fg/ μ l de ADN. Teniendo en cuenta el peso molecular del genoma de la levadura, se calculó el número de genomas presentes en dicha dilución (0,25 genomas/ μ l), lo cual permitió establecer el límite de detección de la técnica en aproximadamente 1-10 genomas/reacción de PCR. Por tanto se puede afirmar que la PCR cuantitativa es más sensible que la PCR simple, y casi comparable en sensibilidad a la PCR anidada (datos mostrados más adelante).

Tabla 8. Límite de detección de la PCR cuantitativa

| Muestra | Genomas de levadura/muestra |
|------------------------|-----------------------------|
| c- ext 1 | - |
| c- ext 1 | - |
| c- ext 1 | - |
| 10 ⁻² C.f.a | 11911 |
| 10 ⁻³ C.f.a | 3070 |
| 10 ⁻⁴ C.f.a | 335 |
| 10 ⁻⁵ C.f.a | 67 |
| 10 ⁻⁶ C.f.a | 7 |
| 10 ⁻⁷ C.f.a | - |
| 10 ⁻⁸ C.f.a | - |
| 10 ⁻⁹ C.f.a | - |
| YEPD | - |

Cada una de las técnicas analizadas y puestas a punto para la detección de genomas fúngicos en muestras biológicas, PCR simple, PCR anidada y PCR cuantitativa, pueden aportar datos relevantes a la investigación, por lo que en este trabajo se han empleado las tres técnicas mencionadas.

2. Métodos de extracción de ADN

La preparación de la muestra para la realización de un diagnóstico molecular puede tener un impacto muy significativo en la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo (Bretagne and Costa, 2005; Reiss *et al*, 2000). En general, el método de extracción de ADN debe liberar el ácido nucleico intracelular que poseen los hongos. Además también tiene que concentrar el ADN fúngico de las muestras que suele estar presente en muy pequeñas cantidades, y eliminar los desechos, contaminantes y posibles inhibidores de la reacción de amplificación, sin degradarlo. Existen muchos protocolos de extracción de ADN fúngico para muestras clínicas, pero aún no existe un método universal óptimo. Esto plantea la necesidad de desarrollar un método de extracción de ADN adecuado a cada tipo de muestra biológica (sangre, tejido,...) para aislar el máximo de ADN fúngico.

Cada tipo de muestra biológica presenta diferentes características, por lo que se requiere de un procesamiento distinto y específico en cada caso. Así, por ejemplo, para acceder a los ácidos nucleicos de una célula fúngica es necesario un tratamiento más agresivo que en el caso de la célula sanguínea humana, debido a que la pared fúngica es mucho más resistente que la membrana de una célula humana. Por este motivo se ha intentado diseñar el método

de extracción más eficaz para cada tipo de muestra y comparar su eficacia extractiva con algunos métodos ya existentes.

2.1. Extracción de ADN de células en suspensión (levaduras)

Para la extracción de ADN de células en suspensión, en este caso levaduras, se compararon tres protocolos (Materiales y Métodos 5.1.1): el protocolo 1, modificado a partir del método descrito por Okhravi y colaboradores (Okhravi *et al*, 1998), que omite el paso de digestión con la enzima zimolasa y el tratamiento con fenol; el protocolo 2 desarrollado y cedido amablemente por la empresa Oculab que también omite el paso de digestión con la enzima zimolasa; y el protocolo 3 desarrollado en nuestro laboratorio. El experimento detallado a continuación permitió seleccionar el método de extracción más eficiente y sensible y que además permitiera la amplificación del ADN aislado mediante PCR.

Se tomó un cultivo de *C. famata* de D.O a 600 nm de 0,6 y se realizaron diluciones seriadas 1/10 del mismo, hasta llegar a una densidad celular de 5×10^2 células/ml (contaje realizado mediante la placa de Neubauer). Se tomaron las suspensiones de levadura con densidades celulares comprendidas entre 5×10^2 - 5×10^6 células/ml y se procedió al aislamiento del ADN empleando los tres métodos de extracción. Posteriormente, se realizó una PCR simple del ADN aislado de cada una de las diluciones empleando los oligonucleótidos ITS.

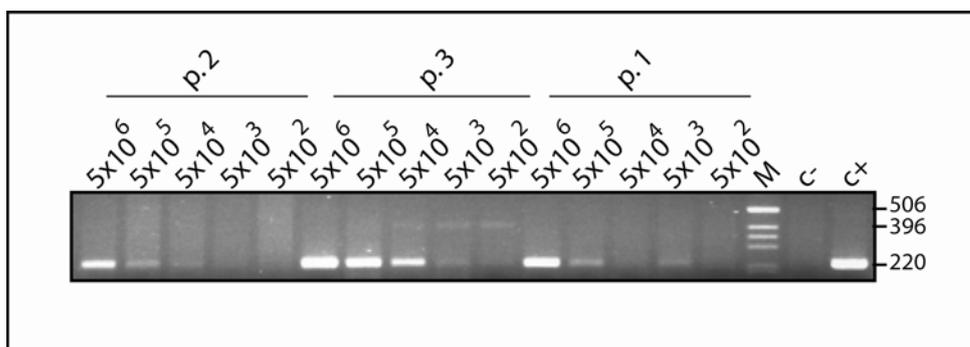


Figura 18. Análisis comparativo de la eficiencia de extracción de ADN de los tres métodos ensayados para células en suspensión. Tras la realización de diluciones seriadas de un cultivo de levadura, se extrajo el ADN de las diferentes diluciones empleando los tres protocolos. p1: protocolo 1, p2: protocolo 2 y p3: protocolo 3. A continuación se realizó amplificación mediante PCR empleando los oligonucleótidos ITS y las muestras se analizaron en geles de agarosa. M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

Como se puede observar en la figura 18, el protocolo 3 mostró una eficiencia de extracción de ADN dos órdenes de magnitud mayor que los otros dos métodos de extracción, lográndose extraer, por tanto, con dicho protocolo, ADN de muestras 100 veces más diluidas.

2.2. Extracción de ADN de sangre

Para la extracción de ADN de muestras de sangre, algunos autores recomiendan el empleo de kits comerciales porque acorta la duración del procedimiento y el ADN que se obtiene es de alta calidad (Bretagne and Costa, 2005; Dixon *et al*, 1998; Maaroufi, 2004; Wahyuningsih *et al*, 2000). Entre ellos, el *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)* ha sido ampliamente utilizado y aplicado con éxito en muestras clínicas, no detectándose prácticamente pérdida en el rendimiento o en la calidad de la extracción del ADN (Flahaut *et al*, 1998; Hendolin *et al*, 2000; Lass-Florl *et al*, 2001; Loeffler *et al*, 1997; Loeffler *et al*, 2000; Maaroufi, 2004; Skladny *et al*, 1999; Van Burik *et al*, 1998). Por este motivo, para la extracción de ADN de muestras sanguíneas se decidió comparar el protocolo 8, o lo que es lo mismo, el kit *QuiAamp DNA Mini Kit (Qiagen)* y el protocolo 9, un método desarrollado en nuestro laboratorio basado en el método descrito por Kenneth H. Rand y colaboradores (Rand *et al*, 1994) (Materiales y Métodos 5.1.4).

Para comparar ambos métodos, se tomaron dos alícuotas de 1ml de sangre humana. Tras la extracción se realizó amplificación mediante PCR simple con la pareja de oligonucleótidos β -globina.

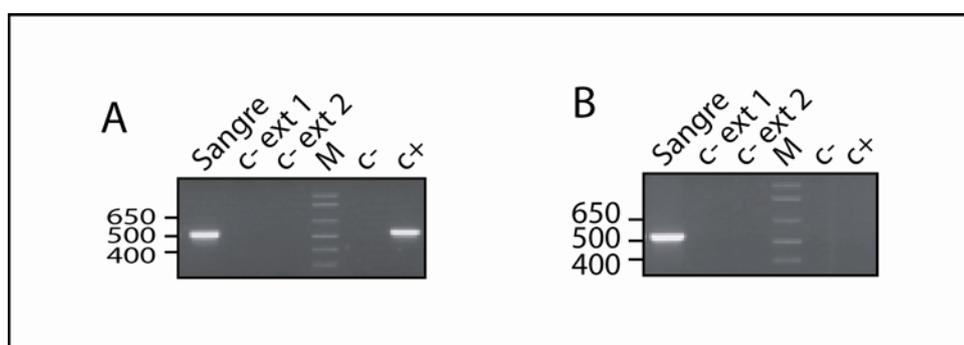


Figura 19. Análisis comparativo de la eficiencia de extracción de ADN humano de los dos métodos ensayados para muestras de sangre. Se extrajo el ADN de cada mililitro de sangre empleando dos protocolos. **(A)** *Kit QuiAamp DNA Mini Kit (Qiagen)* y **(B)** desarrollado en nuestro laboratorio basado en el método descrito por Kenneth H. Rand y col. A continuación se realizó amplificación mediante PCR empleando los oligonucleótidos β -glob y las muestras se analizaron en geles de agarosa. c-ext1 y c-ext2: control de extracción a partir de H₂O. M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

Ambos protocolos presentaron una eficiencia similar en la extracción de ADN de células sanguíneas (figura 19). Por tanto, el siguiente paso fue analizar la eficiencia de cada uno de los protocolos en la extracción de ADN genómico fúngico. Para ello, se preparó un cultivo de *C. famata* según se describe en Materiales y Métodos, se realizaron diluciones seriadas 1/10 y se extrajo el ADN de cada una de ellas con los dos protocolos descritos previamente. Finalmente se realizó PCR simple con los oligonucleótidos ITS.

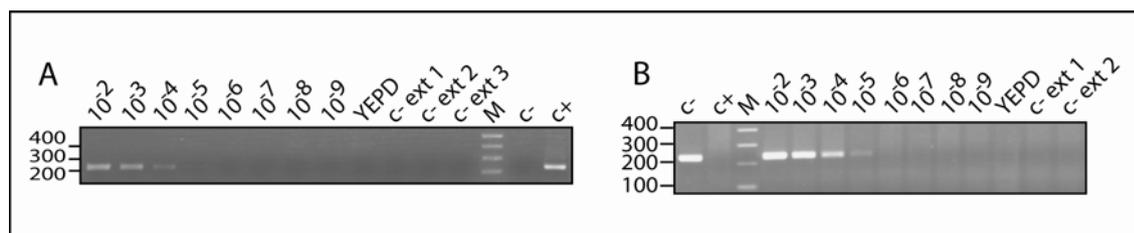


Figura 20. Análisis comparativo de la eficiencia de extracción de ADN fúngico de los dos métodos ensayados para muestras de sangre. Tras la realización de diluciones seriadas de un cultivo de levadura, se extrajo el ADN de las diferentes muestras empleando los dos protocolos. **(A)** *Kit QuiAamp DNA Mini Kit (Qiagen)* y **(B)** desarrollado en nuestro laboratorio basado en el método descrito por Kenneth H. Rand y col. A continuación se realizó amplificación mediante PCR empleando los oligonucleótidos ITS y las muestras se analizaron en geles de agarosa. 10^{-2} - 10^{-9} : dilución correspondiente. YEPD: control de extracción a partir de YEPD. c-ext1 y c-ext2: control de extracción a partir de H_2O . M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

El rendimiento de extracción de ADN del protocolo 9 (figura 20B) resultó ser diez veces superior al obtenido con el protocolo 8 (figura 20A) y por tanto es el que se utilizó en experimentos posteriores.

3. Sensibilidad de los métodos de extracción de ADN y de las técnicas de PCR

Una característica de las infecciones fúngicas es la escasa presencia de microorganismo que hay en las muestras biológicas de los pacientes. Esto dificulta, y a veces imposibilita, la realización de un diagnóstico fiable. Por esta razón, es de gran importancia que los métodos empleados para el diagnóstico de una infección fúngica posean una sensibilidad alta, siendo capaces de detectar una cantidad mínima de cualquier componente fúngico en las muestras. En el caso del método diagnóstico basado en la PCR, desarrollado en este trabajo, el factor limitante radicaba en la capacidad de aislamiento del material genético de una muestra clínica y la sensibilidad de la técnica de PCR para detectarlo. Por ello, se realizó un estudio

detallado de la sensibilidad de dicho método, determinando el número mínimo de células fúngicas detectadas en diferentes tipos de muestras.

3.1. Levaduras en suspensión

Para determinar el límite de detección del método partiendo de un cultivo líquido de levaduras, se tomó un cultivo de *C. famata* de D.O a 600 nm de 0,6. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1/10 y se extrajo el ADN de 200 μ l de cada una de estas diluciones utilizando para ello el protocolo 3. Finalmente se realizó amplificación mediante PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS y Leva 18s, PCR anidada y PCR-Q.

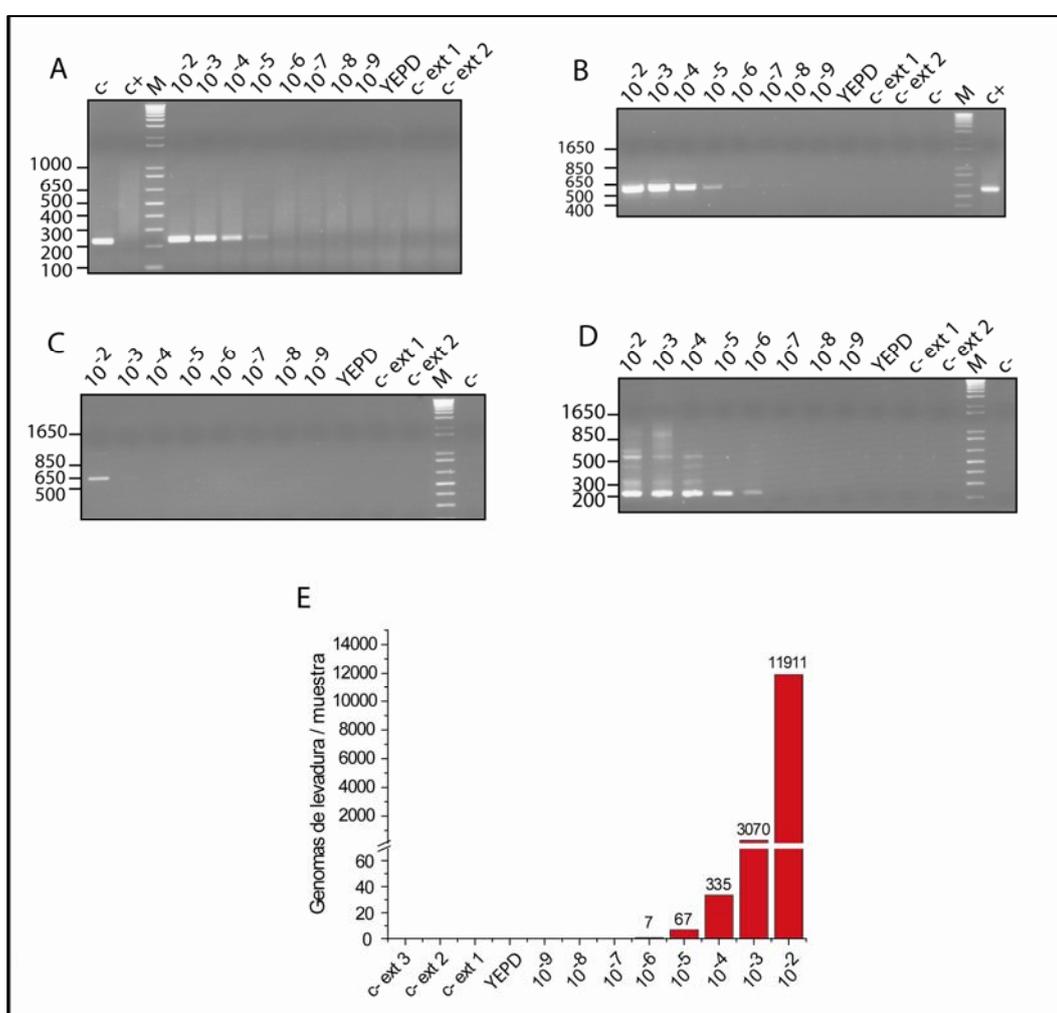


Figura 21. Análisis de la sensibilidad del método de extracción de ADN seleccionado y de las diferentes PCRs desarrolladas partiendo de levaduras en suspensión. Tras la realización de diluciones seriadas de un cultivo de levadura, se extrajo el ADN de las diferentes muestras y se realizaron: **(A)** PCR simple con los oligonucleótidos ITS, **(B)** PCR simple con los oligonucleótidos Leva 18s, **(C y D)** primera y segunda PCR de la PCR anidada respectivamente y **(E)** PCR cuantitativa. 10^{-2} - 10^{-9} : dilución correspondiente. YEPD: control de extracción a partir de YEPD. c-ext 1, c-ext 2 y c-ext 3: control de extracción a partir de H_2O . M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

El empleo de la PCR simple y los correspondientes oligonucleótidos permitió la detección de ADN hasta la dilución 10^{-5} (figuras 21A y 21B). Por otro lado, tanto la PCR anidada (figuras 21C y 21D) como la PCR cuantitativa (figura 21E) permitieron la detección de ADN fúngico hasta la dilución 10^{-6} lo cual permite concluir, que ambas técnicas son las más sensibles y por tanto las más adecuadas, de las empleadas hasta ahora en este trabajo, para la realización de un diagnóstico.

Paralelamente al experimento anterior, se tomó una alícuota del cultivo de $D.O_{600}=0,6$ y de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y se realizaron a su vez cuatro diluciones seriadas $1/10$ de cada uno, tal como se muestra en el esquema de la figura 22. Se sembraron $10 \mu\text{l}$ de cada dilución en una placa de YEPD agar y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se procedió al recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) de cada una de las muestras. A su vez, para contrastar resultados, se realizó un contaje de células de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} con la placa de Neubauer. Los resultados de ambos contajes se presentan en la tabla 9.

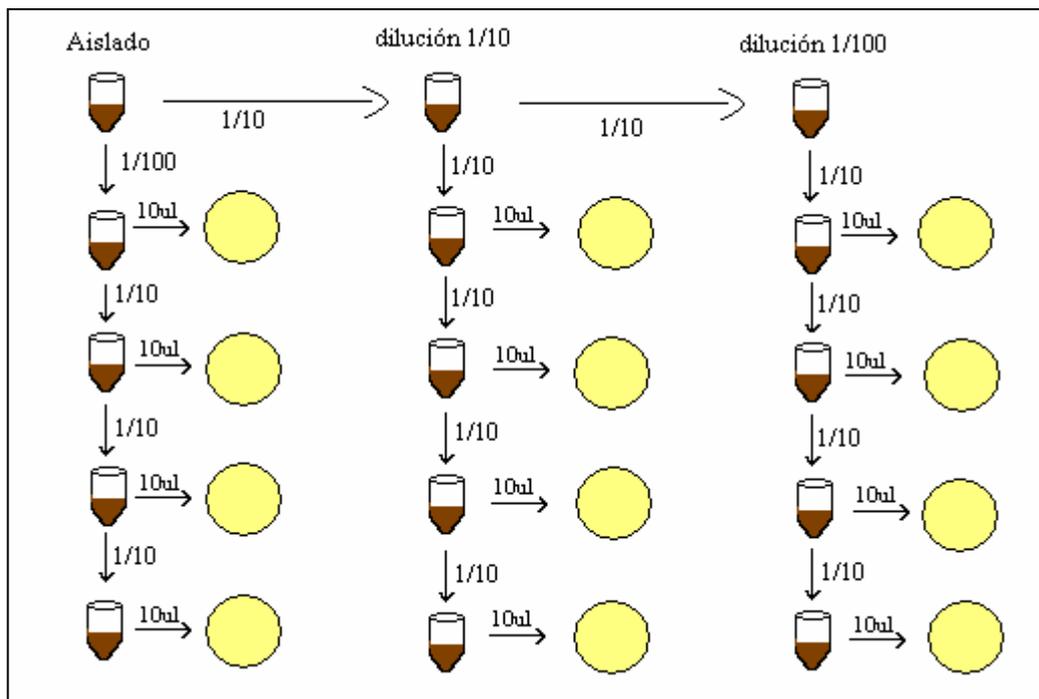


Figura 22. Procedimiento de diluciones seriadas de las muestras empleadas para conocer el número de ufc presentes en cada una de ellas.

Tabla 9. Recuento de ufc

| | Aislado (ufc/10 µl) | Dilución 1/10 (ufc/10 µl) | Dilución 1/100 (ufc/10 µl) |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Dilución 10⁻¹ | incontables | 4080 | 630 |
| Dilución 10⁻² | 4000 | 418 | 89 |
| Dilución 10⁻³ | 475 | 65 | 0 |
| Dilución 10⁻⁴ | 75 | 11 | 0 |

Los datos de la tabla 9 se emplearon para calcular, multiplicando por el factor de dilución correspondiente, el número de colonias presente en el cultivo inicial, siendo aproximadamente 5×10^7 ufc/ml. Asumiendo que el ADN extraído de 200 µl de cada dilución se resuspendió en 50 µl de H₂O (Materiales y Métodos 5.1.1), se determinó el número de genomas presente en cada dilución (tabla 10).

Tabla 10. Genomas/µl en cada dilución

| Muestra | Ufc/µl |
|---------------------------|---------------|
| Cultivo | 200.000 |
| dilución 10 ⁻¹ | 20.000 |
| dilución 10 ⁻² | 2.500 |
| dilución 10 ⁻³ | 250 |
| dilución 10 ⁻⁴ | 25 |
| dilución 10 ⁻⁵ | 2,5 |
| dilución 10 ⁻⁶ | 0,25 |
| dilución 10 ⁻⁷ | 0,025 |
| dilución 10 ⁻⁸ | 0,0025 |
| dilución 10 ⁻⁹ | 0,00025 |

Del análisis de estos datos se concluye que la dilución 10⁻⁵, que era la que amplificaban las PCRs simples, contenía aproximadamente 2 genomas/µl. Teniendo en cuenta que después de la extracción el ADN obtenido se resuspendió en 50 µl de H₂O y de ellos se emplearon 4 µl para la reacción de PCR, el límite de detección de este método se fijó en los aproximadamente 8 genomas/reacción, es decir, 100 genomas por muestra inicial. Este dato revela que, probablemente, la PCR simple no sea suficientemente sensible para realizar un diagnóstico completamente fiable de una infección fúngica, empleando muestras de tejido o sangre humana (Rand *et al*, 1994), debido a que, en general, las muestras pertenecientes a pacientes con infección fúngica presentan una escasa cantidad de hongo (1-120 genomas/ml sangre) (Pontón, 2006). Por otro lado, la PCR anidada y la PCR-Q mostraron

una elevada sensibilidad permitiendo amplificar hasta 1 genoma por reacción de PCR o 1-10 genomas/muestra inicial (dilución 10^{-6}). Por lo tanto, ambas técnicas constituyen un excelente sistema para la detección de células fúngicas en muestras biológicas en las que éstas se encuentran en cantidades muy pequeñas.

3.2. Monocitos THP-1 en suspensión

De forma similar al apartado previo, se analizó el número mínimo de genomas de monocitos que se podían extraer empleando el protocolo seleccionado, protocolo 3 en este caso, y amplificar realizando una PCR simple utilizando los oligonucleótidos β -globina. El procedimiento empleado en el caso de los monocitos fue similar al utilizado para las levaduras, con la excepción de que en este caso únicamente se empleó la placa de Neubauer para el recuento de células (monocitos). Inicialmente se empleó una muestra con una densidad celular de $1,5 \times 10^8$ células/ml y se realizaron diluciones seriadas 1/10. A continuación se seleccionó el rango de diluciones comprendido entre 10^{-2} (2×10^6 células/ml) y 10^{-8} (0,2 células/ml). Se emplearon 200 μ l de cada una de las diluciones para realizar extracción de ADN fúngico.

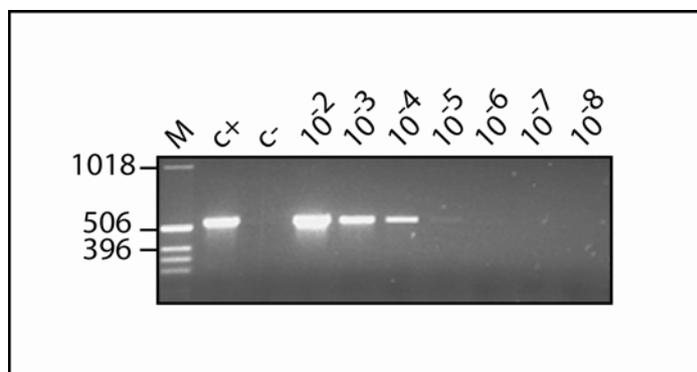


Figura 23. Análisis de la sensibilidad del método de extracción de ADN seleccionado y de la técnica de PCR desarrollada para células humanas en suspensión. Tras la realización de diluciones seriadas de un cultivo de monocitos, se extrajo el ADN de las diferentes muestras y se realizó amplificación mediante PCR empleando los oligonucleótidos β -globina y las muestras se analizaron en geles de agarosa. 10^{-2} - 10^{-8} : dilución correspondiente. M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

El empleo de la PCR simple y de los oligonucleótidos β -globina (figura 23), permitió la detección de ADN hasta la dilución 10^{-5} (6 células/ μ l). Teniendo en cuenta que después de la extracción el ADN obtenido se resuspendió en 50 μ l de H_2O y de ellos se emplearon 4 μ l para la reacción de PCR, se puede concluir que, este método de amplificación, permite la

detección de ADN procedente de 24 células, lo cual equivale a que la muestra inicial contenga un mínimo de aproximadamente 1500 células/ml.

3.3. Mezcla de levaduras y monocitos THP-1 en suspensión

En las muestras biológicas pueden existir diferentes tipos celulares juntos, como es el caso de infecciones fúngicas con hongo circulante en sangre, en las que en una muestra sanguínea del paciente podemos encontrar células humanas y fúngicas. Previamente se ha analizado la eficiencia de las técnicas de extracción de ADN y amplificación de éste en muestras en las que sólo existía un tipo celular, células humanas o células fúngicas. Sin embargo, cabe la posibilidad de la existencia de interferencias en el caso de que en la muestra se encuentre ADN de diferentes organismos, pudiéndose reducir la sensibilidad de la técnica en estos casos. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en preparar artificialmente una muestra que contuviera diferentes ADNs, humano y levadura, y analizar en este caso la eficiencia de los métodos de extracción y amplificación.

Se creció un cultivo de *C. famata* (Materiales y Métodos). A continuación, se realizó un conteo del número de células del cultivo empleando para ello una placa de Neubauer obteniéndose una densidad de 4×10^7 células/ml. Paralelamente se tomó una cantidad equivalente de células humanas (monocitos THP-1) que se mezclaron con las levaduras. La mezcla se centrifugó a 14.000 r.p.m durante 20 minutos y el precipitado resultante se resuspendió en 400 μ l de PBS. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas 1/10 de la mezcla de levaduras y monocitos. A continuación, de manera similar al caso de levaduras en suspensión, se realizó extracción de ADN y se realizaron amplificaciones mediante PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS y los oligonucleótidos β -globina con el fin de analizar las posibles interferencias entre ambos ADNs.

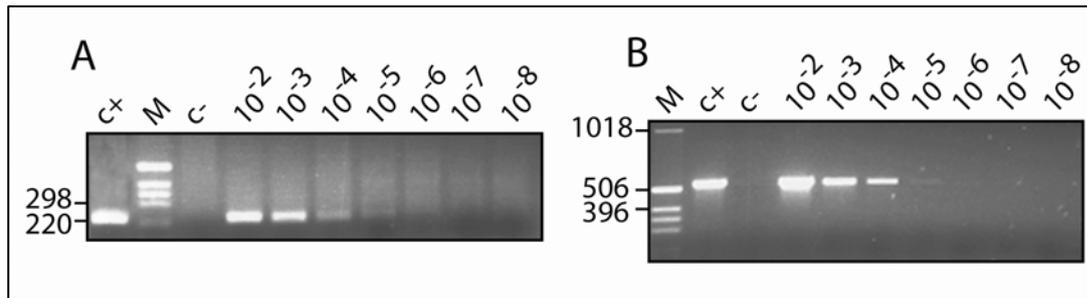


Figura 24. Análisis de la sensibilidad del método de extracción de ADN seleccionado y de las técnicas de PCR desarrolladas para mezclas de levaduras y células humanas en suspensión. Tras la realización de diluciones seriadas de un cultivo de monocitos y de un cultivo de levaduras que posteriormente fueron mezcladas, se extrajo el ADN de las diferentes muestras y se realizó amplificación mediante PCR empleando **(A)** los oligonucleótidos ITS y **(B)** los oligonucleótidos β-globina. A continuación las muestras se analizaron en geles de agarosa. 10⁻²-10⁻⁸: dilución correspondiente. M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

En las figuras 21A, 23 y 24, se puede observar que cuando las cantidades de ADN de ambas especies son similares, no se aprecia interferencia entre ellas. Esta conclusión es válida siempre que no se supere el límite de saturación de cantidad de ADN de la propia técnica (10.000 ng/reacción).

3.4. Mezcla de sangre humana y levaduras

Como se ha descrito previamente, cuando la cantidad de ADN total en la reacción de PCR no es muy elevada y el ADN de las diferentes especies se encuentra en proporciones similares, no se produce ninguna interferencia en el correcto funcionamiento de la técnica de PCR. Sin embargo, el diagnóstico de infecciones fúngicas se realiza generalmente en sangre y biopsias de tejido, muestras en las que la cantidad de ADN humano es muy elevada con respecto al ADN fúngico. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en reproducir artificialmente esta situación y comprobar si la presencia de ADN humano en exceso interfería en la amplificación del ADN fúngico, perdiéndose con ello sensibilidad en el método.

Para ello se tomaron 10 ml de sangre humana de una persona sana y se realizaron alícuotas de 1 ml. Paralelamente se tomó un cultivo de *C. famata* de D.O a 600 nm de 0,6 y se realizaron diluciones seriadas 1/10, seleccionando el intervalo de diluciones de 10⁻² a 10⁻⁹. Se tomaron 200 μl de cada una de las 8 diluciones y se añadieron a 8 de las 10 alícuotas de sangre. Como controles se emplearon una alícuota de sangre a la que se añadió 200 μl de YEPD y otra alícuota a la que no se añadió nada. A continuación se realizó la extracción de

ADN de cada una de las muestras con el método de extracción de ADN para sangre (protocolo 9) seleccionado en el apartado 2 de Resultados. Una vez efectuada la extracción se realizó PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS, los oligonucleótidos Leva 18s y los oligonucleótidos β -globina, PCR anidada y PCR-Q para comprobar si se producía pérdida de sensibilidad en alguna de ellas.

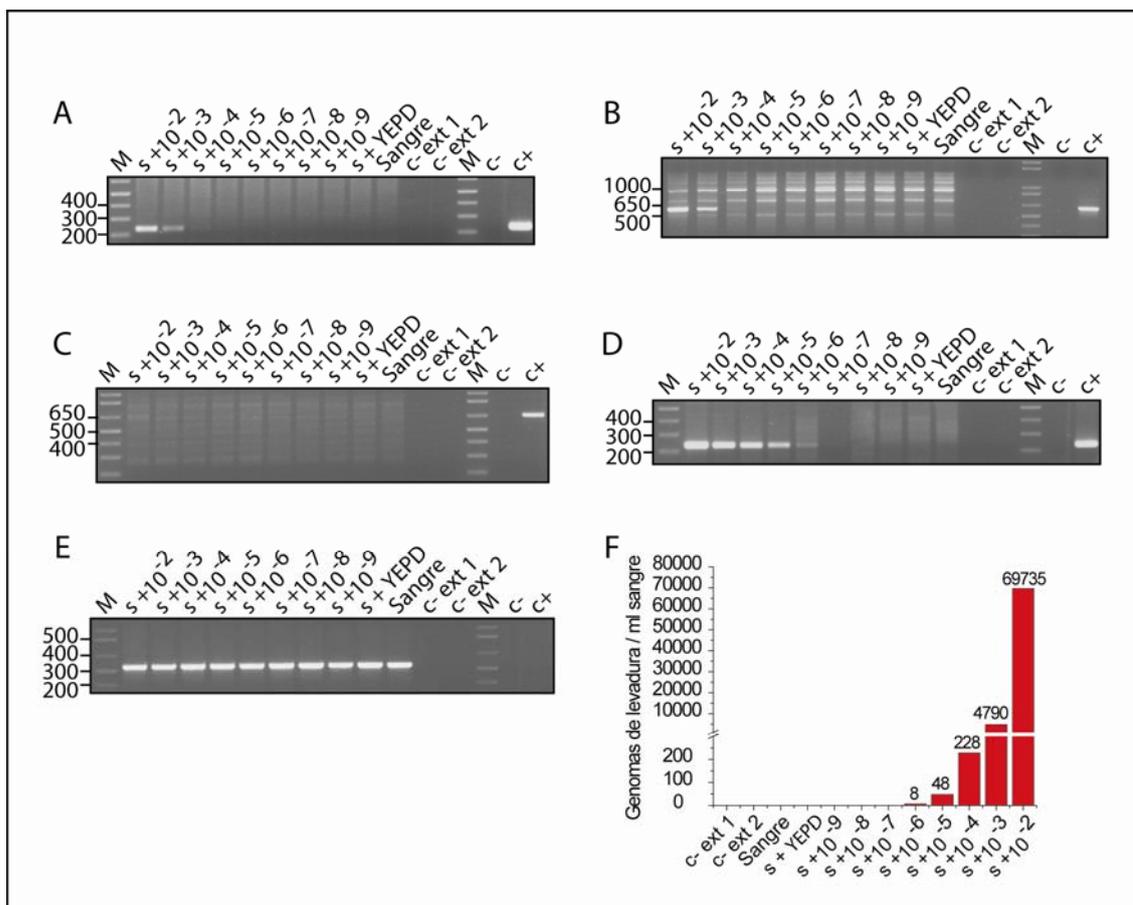


Figura 25. Análisis de la sensibilidad del método de extracción de ADN seleccionado y de las técnicas de PCR desarrolladas para mezclas de sangre humana y levaduras. Tras la realización de diluciones seriadas de un cultivo de levadura y meclar 200 μ l de cada dilución con 1 ml de sangre, se extrajo el ADN de las diferentes muestras y se realizó amplificación mediante las diferentes técnicas de PCR. **(A)** PCR simple con los oligonucleótidos ITS, **(B)** PCR simple con los oligonucleótidos Leva 18s, **(C y D)** primera y segunda PCR de la PCR anidada respectivamente, **(E)** PCR simple con los oligonucleótidos β -globina y **(F)** PCR cuantitativa. s+10⁻²-s+10⁻⁹: sangre + dilución correspondiente. s+YEPD: sangre + YEPD. Sangre: control de extracción a partir de sangre. c-ext 1 y c-ext 2: control de extracción a partir de H₂O. M: marcador de peso molecular. c-: control negativo de PCR y c+: control positivo de PCR.

La amplificación con los oligonucleótidos ITS (figura 25A) y Leva 18s (figura 25B) permitió la detección de ADN hasta la dilución 10⁻³, que equivale a 10000 ufc en la muestra inicial, cuando el ADN fúngico está mezclado con ADN humano. La PCR anidada (figuras 25C y

25D) y la PCR-Q (figura 25F) permitieron amplificar ADN hasta la dilución 10^{-6} y la PCR simple realizada con los oligonucleótidos β -globina (figura 25E) amplificó ADN en todas las diluciones. Comparando estos resultados con la sensibilidad obtenida en muestras que sólo contenían ADN fúngico (figura 21) se puede concluir que la PCR anidada, la PCR-Q y la PCR simple realizada con los oligonucleótidos β -globina siguieron manteniendo la misma sensibilidad que con las muestras que sólo contenían ADN fúngico (figura 21 y tabla 10). La sensibilidad de la PCR simple realizada con los oligonucleótidos ITS disminuye hasta dos órdenes de magnitud, pasando de amplificar un número mayor o igual a 10 genomas por reacción de PCR cuando sólo hay ADN fúngico en la muestra, a un mínimo de 1000 genomas cuando se mezcla con ADN humano. La PCR simple realizada con los oligonucleótidos Leva 18S no sólo pierde sensibilidad, sino que además amplifica productos inespecíficos.

Estos resultados permiten concluir que en muestras de sangre en las que existe ADN humano en exceso y ADN fúngico, el primero interfiere en la sensibilidad de la PCR simple realizada con los oligonucleótidos ITS y los oligonucleótidos Leva 18s mientras que no provoca interferencia en los resultados obtenidos mediante PCR anidada y PCR-Q.

4. Diagnóstico de infecciones fúngicas mediante técnicas inmunológicas: detección de antígeno, componentes no antigénicos y anticuerpo en suero

La presencia de componentes fúngicos en sangre (antigénicos o no) y de anticuerpos generados frente a ellos, puede ser un indicador de infección fúngica. Existen multitud de técnicas para analizar la presencia de estos componentes en muestras biológicas, fundamentalmente en sangre, las cuales son ampliamente utilizadas para el diagnóstico de infecciones fúngicas a nivel clínico (Ellepola and Morrison, 2005; Reiss and Morrison, 1993; Reiss *et al*, 2000). Cada una de estas técnicas por sí sola no permite concluir la existencia de una infección fúngica, pero un análisis detallado de los resultados obtenidos con varias de estas pruebas permite realizar un diagnóstico fiable.

En este trabajo, paralelamente al desarrollo del método diagnóstico basado en la detección de ADN fúngico en muestras de sangre, se inició el desarrollo de métodos diagnósticos basados en la detección en suero de componentes fúngicos antigénicos, no antigénicos ((1,3)- β -D-glucanos), y anticuerpos frente a estos antígenos. Las técnicas empleadas para

ello fueron el dot-blot (Materiales y Métodos 6.3), el kit *Fungitell* (Materiales y Métodos 6.4) y la inmunodetección mediante fluorescencia (Materiales y Métodos 8) respectivamente.

4.1. Detección de antígenos fúngicos: dot-blot

La detección de antígenos fúngicos en suero se realizó mediante inmunodetección por dot-blot. Esta técnica requiere un paso previo y necesario que consiste en la obtención de los anticuerpos que se emplean en ella para la detección de antígenos. Por tanto, siguiendo el método detallado en el apartado 1.5 de Materiales y Métodos se obtuvieron anticuerpos frente a diferentes levaduras [anti-*C. famata* (D21), anti-*C. parapsilosis* (D43), anti-*C. albicans* (D36), anti-*C. glabrata* (D51), anti-*S. cerevisiae* (D34) y anti-*R. mucilaginosa* (D40)] comprobando a continuación la especificidad de los mismos. El análisis de la especificidad y afinidad de todos los anticuerpos se realizó de la misma forma pero sólo se van a mostrar los resultados obtenidos con el D21 (anti-*C. famata*). Primero se realizaron inmunodetecciones mediante fluorescencia y western blot para descartar la existencia de reactividad cruzada con otras levaduras. Por otro lado, se empleó otra técnica inmunológica, la inmunomicroscopía electrónica, que permite conocer la localización celular de el/los componente/s antigénico/s con el/los que reaccionan los anticuerpos.

4.1.1. Inmunodetección mediante fluorescencia

En un primer paso, con el fin de ensayar la especificidad del anticuerpo, se realizó inmunodetección mediante fluorescencia. Para ello se emplearon diferentes levaduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* y *Lacazia*), monocitos humanos y la bacteria *E. coli*, que se analizaron de forma diferente. Por un lado la inmunofluorescencia con las levaduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, se realizó empleando el kit *Euroimmun* y para el resto de muestras se siguió el protocolo descrito en el apartado 8 de Materiales y Métodos.

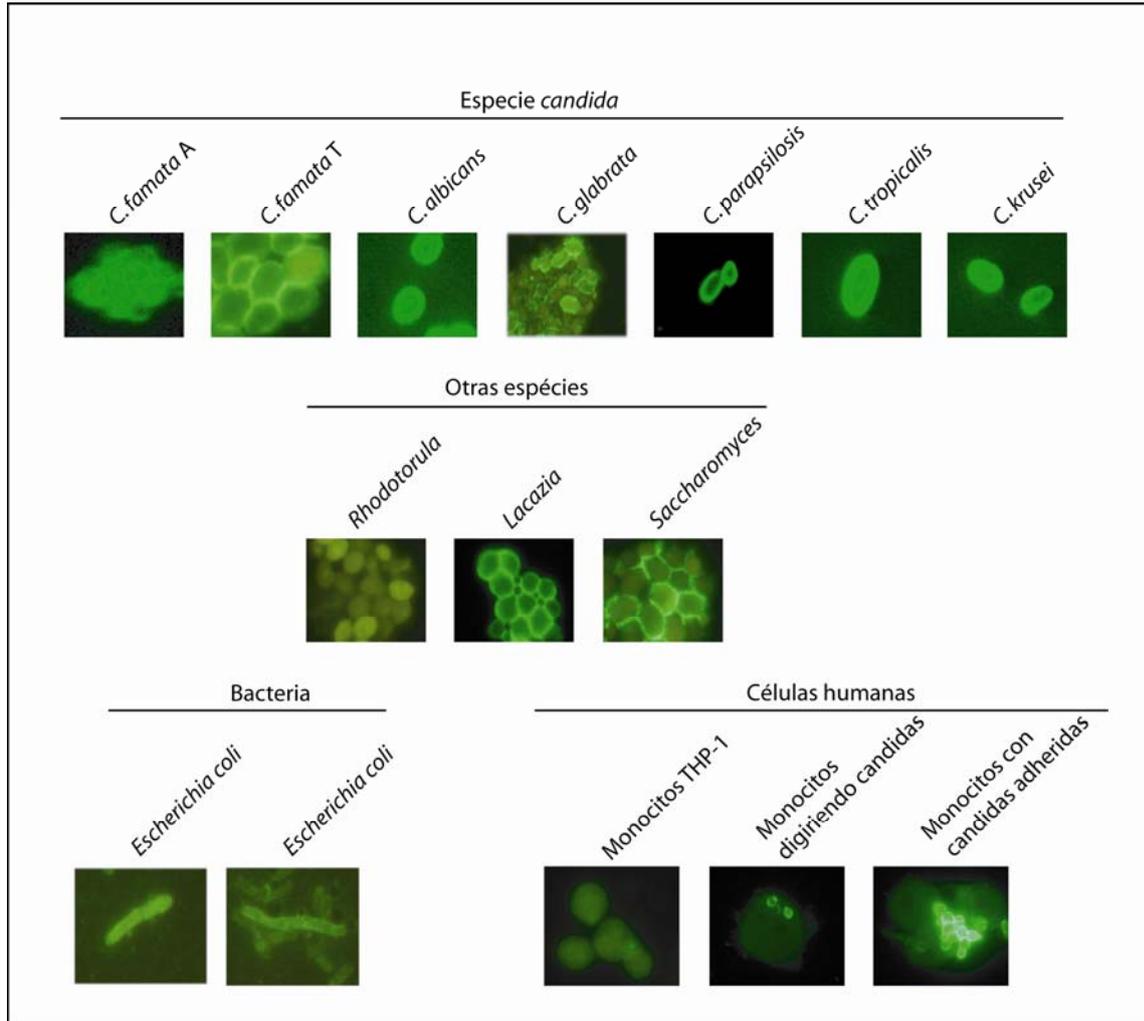


Figura 26. Análisis de la especificidad del anticuerpo D21 (anti-*C. famata*) mediante inmunofluorescencia. El anticuerpo D21 se hizo reaccionar con diferentes especies de levadura, con la bacteria *E. coli* y con células humanas (monocitos). Como anticuerpo secundario se empleó un anti-rabbit.

En la figura 26 se observa como el anticuerpo D21 reacciona eficientemente con *C. famata*, tanto con la cepa tipo como con el aislado. Además presenta reactividad cruzada con otras levaduras como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Lacazia* siendo menos intensa con *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*. En este caso, la reactividad cruzada del anticuerpo no supone un problema, puesto que lo que se pretende con este anticuerpo es detectar levadura en suero de forma generalizada. Para concretar el tipo de levadura detectada se recurrirá a otros anticuerpos y a la secuenciación tras la realización de una PCR. Un aspecto de gran importancia es el hecho de que el anticuerpo no reaccione con componentes de origen no fúngico y como se puede observar en la figura 26, el anticuerpo D21 no reacciona con las bacterias ni con las células humanas ensayadas.

4.1.2. Inmunodetección mediante western blot

Para confirmar el resultado obtenido con la inmunofluorescencia, se analizó la sensibilidad/especificidad del anticuerpo mediante inmunodetección por western blot tal como se describe en Materiales y Métodos. Para ello se emplearon extractos de proteínas de diferentes levaduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa*, *Lacazia*, *Cryptococcus saitoi*) y la bacteria *E. coli* (figura 27) a una concentración final de 25 ng/ml, obtenidos mediante precipitación con TCA tal como se describe en Materiales y Métodos.

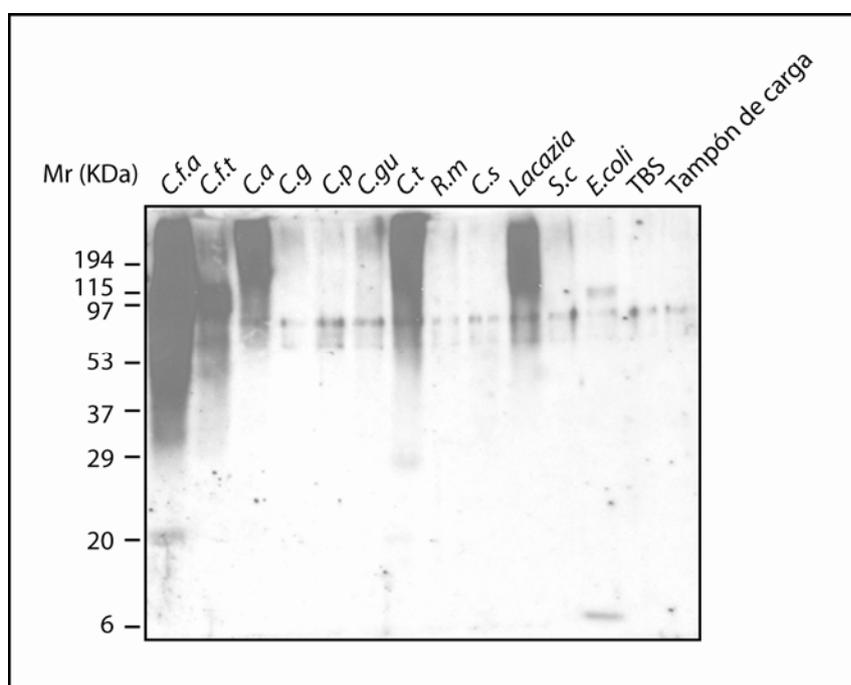


Figura 27. Análisis de la especificidad del anticuerpo D21 (anti-*C. famata*) mediante western blot. El anticuerpo D21 se hizo reaccionar con 1 μ l de los precipitados de proteína de las diferentes especies de levadura y con la bacteria *E.coli*. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-rabbit. C.f.a.: *C. famata* aislado, C.f.t.: *C. famata* tipo, C.a.: *C. albicans*, C.g.: *C. glabrata*, C.p.: *C. parapsilosis*, C.gu.: *C. guilliermouandi*, C.t.: *C. tropicalis*, R.m.: *Rhodotorula mucilaginosa*, C.s.: *Cryptococcus saitoi*, Lacazia: *Lacazia*, S.c.: *Saccharomyces cerevisiae* y E.coli: *Escherichia coli*.

Como se puede observar en la figura 27, el anticuerpo reaccionó eficientemente contra las proteínas de *C. famata*, y también, aunque en menor medida, con *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *Lacazia*. Este resultado es similar al obtenido en la inmunofluorescencia (figura 26), por lo que se puede afirmar que el anticuerpo D21 reacciona eficientemente con la levadura *C. famata* y presenta reactividad cruzada con *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Lacazia*.

4.1.3. Inmunomicroscopía electrónica

Finalmente se realizó una inmunomicroscopía electrónica siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9 de Materiales y Métodos (figura 28). Como ya se comentó anteriormente, esta técnica permite conocer la localización celular de el/los componente/s antigénico/s con el/los que reaccionan los anticuerpos

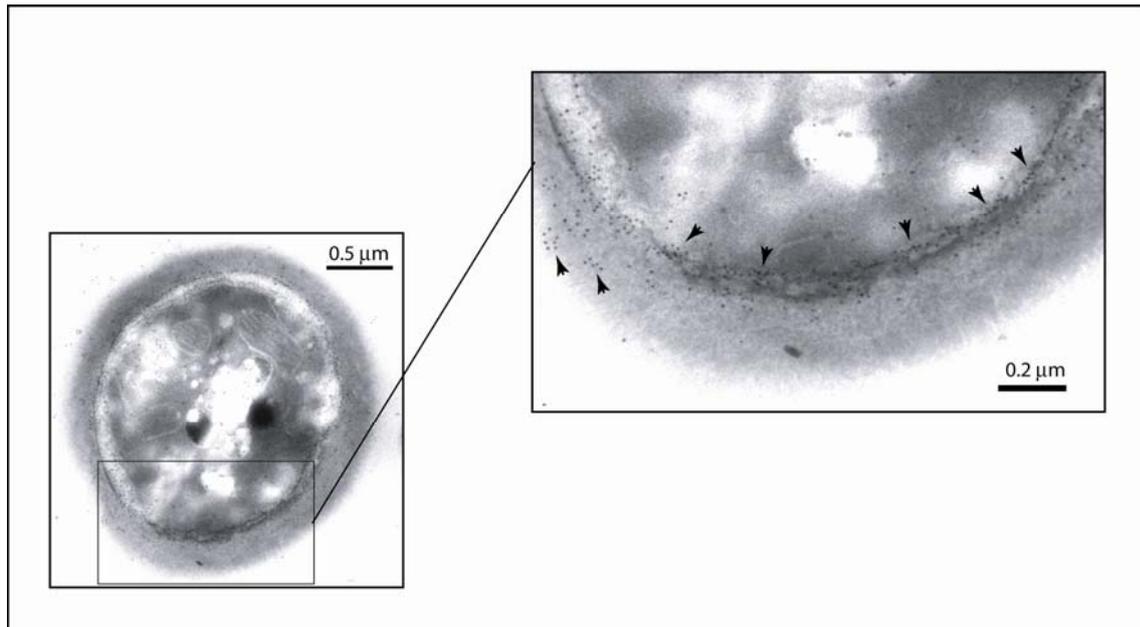


Figura 28. Localización celular de los componentes antigénicos con los que reacciona el anticuerpo D21 puestos de manifiesto mediante inmunomicroscopía electrónica. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-rabbit acoplado a oro coloidal de 10 nm de diámetro.

La inmunomicroscopía (figura 28) reveló una reactividad elevada del anticuerpo policlonal D21 frente a la membrana celular de las levaduras y una reactividad menos específica, hacia la pared celular y el citoplasma de las mismas. De esto puede deducirse que los componentes antigénicos frente a los que reacciona el anticuerpo se encuentran localizados fundamentalmente en la membrana celular, pudiendo localizarse dispersos en menor número en la pared celular y en el citoplasma de la levadura.

Todas estas técnicas, empleadas para analizar la sensibilidad/especificidad del anticuerpo D21 y la localización celular de los componentes frente a los que reacciona, permiten concluir la idoneidad del mismo para ser empleado en técnicas inmunológicas para el diagnóstico de infecciones fúngicas.

4.1.4. Optimización de la técnica de dot-blot

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se trató de aplicar la técnica de dot-blot como prueba diagnóstica adicional (Materiales y Métodos 6.3). En el proceso de optimización de esta técnica, se realizaron dos ensayos. El primero, similar al realizado con el western blot para poder contrastar resultados y el segundo para confirmar que el dot-blot es una técnica apropiada para su empleo en diagnóstico clínico.

Para el primero de los ensayos se tomaron extractos de proteínas de diferentes levaduras y de la bacteria *E.coli*, de concentración 0,1 ng/ μ l, obtenidos mediante precipitación con TCA tal como se describe en Materiales y Métodos, y se realizó inmunodetección mediante dot-blot tal como se describe también en Materiales y Métodos (figura 29).

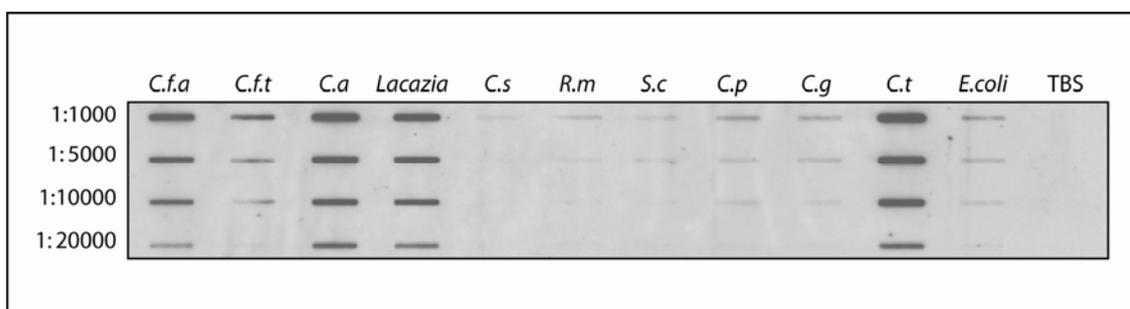


Figura 29. Análisis de la especificidad del anticuerpo D21 mediante dot-blot. El anticuerpo D21 se hizo reaccionar con precipitados de proteína de diferentes especies de levadura y con la bacteria *E.coli*. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-rabbit. *C.f.a.*: *C. famata* aislado, *C.f.t.*: *C. famata* tipo, *C.a.*: *C. albicans*, *Lacazia*, *C.s.*: *Cryptococcus saitoi*, *R.m.*: *Rhodotorula mucilaginosa*, *S.c.*: *Saccharomyces cerevisiae*, *C.p.*: *C. parapsilosis*, *C.g.*: *C. glabrata*, *C.t.*: *C. tropicalis* y *E.coli.*: *Escherichia coli*.

En la figura 29 se observa que en el dot-blot, el anticuerpo D21 reacciona eficientemente contra la levadura *C. famata* y presenta reacción cruzada con otras levaduras como *C. albicans*, *Lacazia* y *C. tropicalis*. Este resultado es similar al obtenido en la inmunofluorescencia (figura 26) y en el western blot (figura 27), por tanto, se confirma de nuevo que el anticuerpo D21 reacciona eficientemente con la levadura *C. famata* y presenta reactividad cruzada con las otras tres levaduras anteriormente citadas. Por otro lado este resultado confirma también que se habían encontrado las condiciones óptimas para la técnica de dot-blot. Además con este experimento se pudo fijar la sensibilidad de la técnica: la cantidad de proteína detectada por este método se encuentra en el rango femtomolar.

La reactividad cruzada mostrada por los anticuerpos empleados en este trabajo se resume en la tabla 11:

Tabla 11. Reactividad cruzada que presentan los diferentes anticuerpos empleados en este trabajo.

| Anticuerpos | Reactividad cruzada con |
|------------------------------------|--|
| Anti- <i>C. famata</i> (D21) | <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Lacazia</i> |
| Anti- <i>C. albicans</i> (D36) | <i>C. guilliermondii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. mucilaginosa</i> |
| Anti- <i>C. glabrata</i> (D51) | <i>C. famata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S. cerevisiae</i> |
| Anti- <i>C. parapsilosis</i> (D43) | <i>C. glabrata</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>R. mucilaginosa</i> |
| Anti- <i>S. cerevisiae</i> (D34) | <i>C. glabrata</i> , <i>R. mucilaginosa</i> |
| Anti- <i>R. mucilaginosa</i> (D40) | <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> |

Una vez comprobado que con la técnica de dot-blot se obtenían resultados semejantes a los obtenidos con las técnicas de inmunofluorescencia y western blot, indicando por tanto que el dot-blot había sido optimizado, se quiso analizar si el anticuerpo D21 reaccionaba con sueros humanos de personas presumiblemente sanas o con proteínas expulsadas por las diferentes levaduras al medio. Para ello se tomaron sueros humanos de personas sanas (controles negativos) y sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa*, *Lacazia*, *Cryptococcus saitoi* y *E. coli* y se realizó de nuevo inmunodetección mediante dot-blot (figura 30).

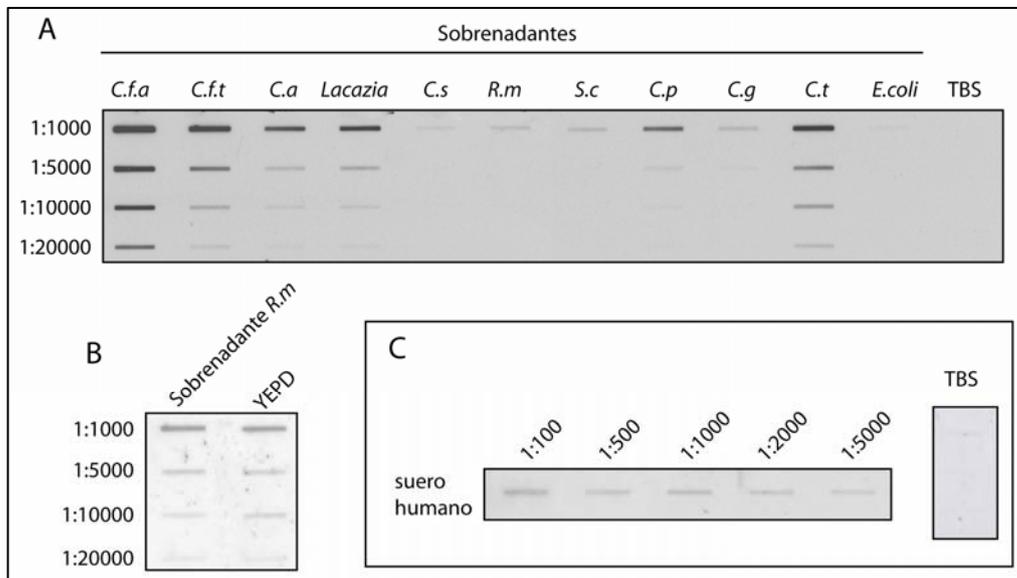


Figura 30. Análisis de la reactividad del anticuerpo D21 frente a los antígenos presentes en los sobrenadantes de cultivos de levadura, de la bacteria *E.coli* y frente a las proteínas presentes en sueros humanos, mediante dot-blot. **(A)** Dot-blot realizado empleando los sobrenadantes de *C.f.a.*: *C. famata* aislado, *C.f.t.*: *C. famata* tipo, *C.a.*: *C. albicans*, *Lacazia*, *C.s.*: *Cryptococcus saitoi*, *R.m.*: *Rhodotorula mucilaginosa*, *S.c.*: *Saccharomyces cerevisiae*, *C.p.*: *C. parapsilosis*, *C.g.*: *C. glabrata*, *C.t.*: *C. tropicalis* y *E.coli.*: *Escherichia coli*, **(B)** dot-blot realizado empleando el sobrenadante de *R. mucilaginosa* (levadura cuyos antígenos no reaccionan con el anticuerpo D21) y YEPD y **(C)** dot-blot realizado empleando suero humano y TBS. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-rabbit.

Como se puede observar en la figura 30, la reacción del anticuerpo D21 con *E. coli* (figura 30A) y con sueros humanos de personas presumiblemente sanas (figura 30C) es casi inapreciable mientras que reacciona eficientemente con los sobrenadantes de ciertas levaduras (figura 30A). En la figura 30B se puede apreciar que la reacción del anticuerpo con el medio de cultivo para levaduras (YEPD) es prácticamente inexistente. Este resultado revela que el anticuerpo D21 reacciona con los antígenos fúngicos expulsados al medio por dichas levaduras. Con estos resultados se confirma que la técnica de dot-blot es un buen método para la detección de antígeno en sangre.

Se decidió no emplear el western blot como método diagnóstico adicional debido a que resultó ser menos sensible que el dot-blot (datos no mostrados). El western blot necesita entre 2,5 y 25 veces más cantidad de proteína que el dot-blot para obtener la misma señal, cantidad que en muchas ocasiones distorsiona el gel de poliacrilamida dificultando con ello la interpretación de los resultados.

4.2. Detección de componentes fúngicos no antigénicos: *Fungitell*

La detección de β -glucanos fúngicos en suero se realizó mediante el kit *Fungitell* (Materiales y Métodos 6.4). La reacción de detección que emplea este kit se basa en la modificación-activación de la cascada biológica de coagulación de lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL), un cangrejo de Norte América. La reacción final la lleva a cabo una enzima coagulante que actúa sobre un sustrato artificial cromogénico liberando un cromóforo que absorbe a 405 nm. De forma similar a los inmunoensayos enzimáticos, el ensayo *Fungitell* se realiza en microplacas y la lectura de los resultados se realiza en un lector de microplacas con incubador.

4.3. Detección de anticuerpos: inmunofluorescencia

La detección de anticuerpos frente a levadura en sueros humanos se realizó mediante inmunofluorescencia siguiendo el método descrito en Materiales y Métodos, empleando como anticuerpo primario el suero de los voluntarios (datos mostrados más adelante). De esta forma, se ha podido comprobar el grado de exposición de los diferentes voluntarios a levadura.

5. Ensayos clínicos

Una vez optimizados los métodos diagnósticos basados en la detección de anticuerpos frente a hongos y de ácidos nucleicos, antígenos y componentes no antigénicos de origen fúngico, se procedió a comprobar la validez de estos métodos a nivel clínico.

5.1. Pacientes diagnosticados con candidiasis crónica y pacientes sanos

Se seleccionó una muestra de 20 voluntarios sanos o controles negativos, que no habían sido diagnosticados con candidiasis, y dos pacientes diagnosticados de candidiasis crónica (tabla 12). El grupo de pacientes sanos se dividió a su vez en dos grupos, el primero, los denominados **c- expuestos**, lo constituían personas que se encontraban habitualmente en contacto con estos microorganismos por motivos de trabajo (trabajo en un laboratorio de microbiología, hospital, etc), y el segundo, o **c- no expuestos** lo constituían personas cuya actividad diaria no llevaba asociado un contacto continuo con hongos/levaduras.

Tabla 12. Características de pacientes sanos y con candidiasis crónica: paciente, enfermedad, sexo y edad

| Paciente | Enfermedad | Sexo | Edad (años) |
|-----------------------|---------------------|-------|-------------|
| Candidiasis crónica 1 | Candidiasis crónica | varón | 30 |
| Candidiasis crónica 2 | Candidiasis crónica | varón | 26 |
| c- expuesto 1 | Sano | varón | 46 |
| c- expuesto 2 | Sano | mujer | 22 |
| c- expuesto 3 | Sano | mujer | 26 |
| c- expuesto 4 | Sano | mujer | 27 |
| c- expuesto 5 | Sano | mujer | 29 |
| c- expuesto 6 | Sano | varón | 26 |
| c- expuesto 7 | Sano | mujer | 26 |
| c- expuesto 8 | Sano | mujer | 24 |
| c- no expuesto 1 | Sano | mujer | 51 |
| c- no expuesto 2 | Sano | varón | 25 |
| c- no expuesto 3 | Sano | varón | 27 |
| c- no expuesto 4 | Sano | mujer | 61 |
| c- no expuesto 5 | Sano | mujer | 92 |
| c- no expuesto 6 | Sano | mujer | 59 |
| c- no expuesto 7 | Sano | varón | 59 |
| c- no expuesto 8 | Sano | varón | 32 |
| c- no expuesto 9 | Sano | mujer | 29 |
| c- no expuesto 10 | Sano | varón | 26 |
| c- no expuesto 11 | Sano | mujer | 28 |
| c- no expuesto 12 | Sano | varón | 30 |

A continuación se inició la obtención de muestras de sangre de los diferentes pacientes en condiciones de esterilidad, empleando para tal fin un vacutainer. Parte de la sangre se recogió en tubos con EDTA para evitar su coagulación y el resto en tubos especiales que permitían la separación de células sanguíneas y suero. Estas muestras se dividieron en alícuotas y conservaron adecuadamente para ser empleadas en las diferentes técnicas utilizadas para la realización del diagnóstico.

El primer paso consistió en analizar la presencia de ADN fúngico en las muestras mediante la técnica de PCR. Para ello se realizó extracción del ADN total de la sangre (Materiales y Métodos 5.1.4) de cada una de las muestras. A continuación se amplificó el ADN mediante PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS y los oligonucleótidos β -globina, PCR anidada (figura 31 y 32) y PCR-Q (tabla 13).

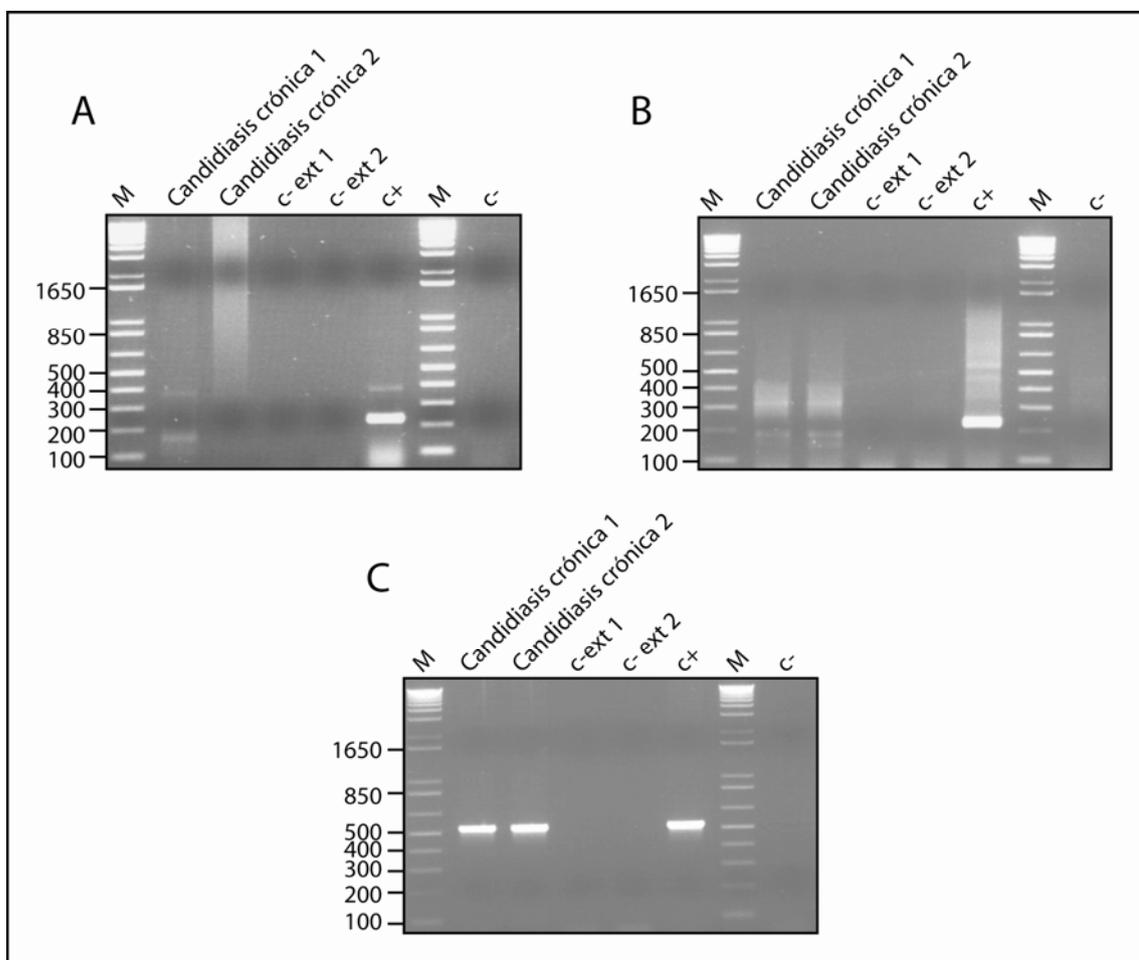


Figura 31. Detección de ADN fúngico en sangre en pacientes con candidiasis crónica. (A) PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS, (B) segunda PCR de la PCR anidada y (C) PCR simple empleando los oligonucleótidos β -globina para amplificar ADN humano. c-ext 1 y c-ext 2: controles negativos de extracción a partir de H₂O, c+: control positivo de PCR, c-: control negativo de PCR y M: marcador de peso molecular.

A lo largo del trabajo, aunque en las diferentes tablas se muestran los resultados completos, para facilitar la comprensión y observar claramente las diferencias, en la mayoría de las figuras se muestran únicamente los casos de los voluntarios cuyos resultados son significativamente diferentes.

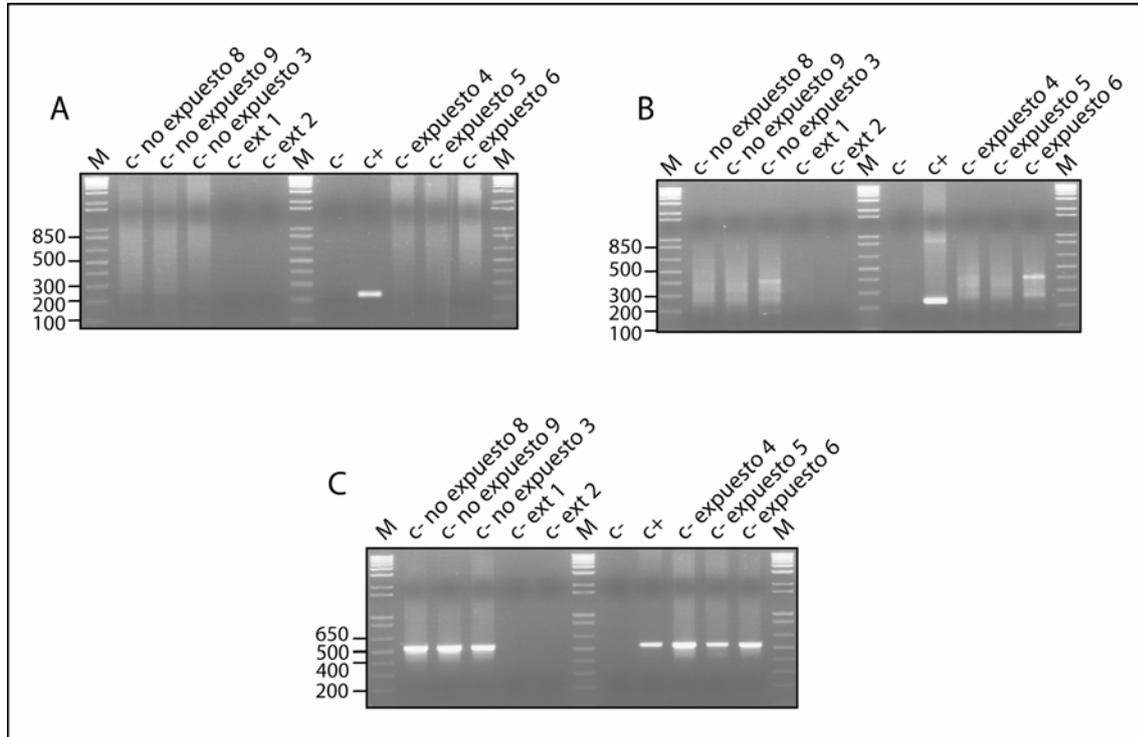


Figura 32. Detección de ADN fúngico en sangre en pacientes controles negativos expuestos y no expuestos a hongos. (A) PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS, (B) segunda PCR de la PCR anidada y (C) PCR simple empleando los oligonucleótidos β -globina para amplificar ADN humano. c-ext 1 y c-ext 2: controles negativos de extracción a partir de H₂O, c+: control positivo de PCR, c-: control negativo de PCR y M: marcador de peso molecular. Sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo.

Los resultados obtenidos revelan que, en las muestras pertenecientes a pacientes con candidiasis crónica (**Candidiasis crónica 1 y 2**), se ha amplificado ADN fúngico en todas las PCRs realizadas (figuras 31A, 31B y tabla 13). Por el contrario, sólo en 3 de las muestras de pacientes **c- no expuestos** se amplificó ADN fúngico en algunas de las PCRs realizadas (PCR anidada y PCR-Q) como se observa en las figuras 32A, 32B (sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo) y tabla 13. De estas tres muestras, una (33,3%) presentó amplificación en dos PCRs y las dos restante (66,6%) sólo en una. Finalmente, en las muestras de pacientes **c- expuestos**, sólo en 2 de los 8 casos (25%) se produjo amplificación de producto fúngico mediante alguna de las técnicas de PCR, concretamente PCR-Q y PCR anidada. Por otro lado, si se observan las figuras 31C y 32C y la tabla 13,

podemos afirmar que en todos los casos se amplificó ADN humano, por lo tanto, se confirma que la calidad del ADN extraído era la adecuada.

Tabla 13. Detección de ADN fúngico en muestras de sangre mediante PCR simple, PCR anidada y PCR-Q.

| Muestras | PCR ITS | PCR β -glob | PCR anidada | PCR cuantitativa (genomas/ml) | Secuenciación |
|-----------------------|---------|-------------------|-------------|-------------------------------|-----------------|
| Candidiasis crónica 1 | + | + | + | 47 | no secuenciable |
| Candidiasis crónica 2 | - | + | + | 29 | no secuenciable |
| c- expuesto 1 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 2 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 3 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 4 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 5 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 6 | - | + | +/- | - | no secuenciable |
| c- expuesto 7 | - | + | - | +/- | x |
| c- expuesto 8 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 1 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 2 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 3 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 4 | - | + | + | 20 | no secuenciable |
| c- no expuesto 5 | - | + | + | - | no secuenciable |
| c- no expuesto 6 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 7 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 8 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 9 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 10 | - | + | - | 194 | no secuenciable |
| c- no expuesto 11 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 12 | - | + | - | - | x |

El segundo paso para el diagnóstico consistió en analizar, en muestras de suero, la presencia de componentes fúngicos antigénicos y no antigénicos y de anticuerpos frente a hongos. La detección de antígeno fúngico se realizó mediante dot blot (empleando el anticuerpo D21) (figura 33 y tabla 16), para analizar la presencia de componente no antigénicos [(1,3)- β -D-glucanos] se empleó el kit *Fungitell* (tabla 15) y finalmente la detección de anticuerpos se realizó mediante inmunofluorescencia (figura 34).

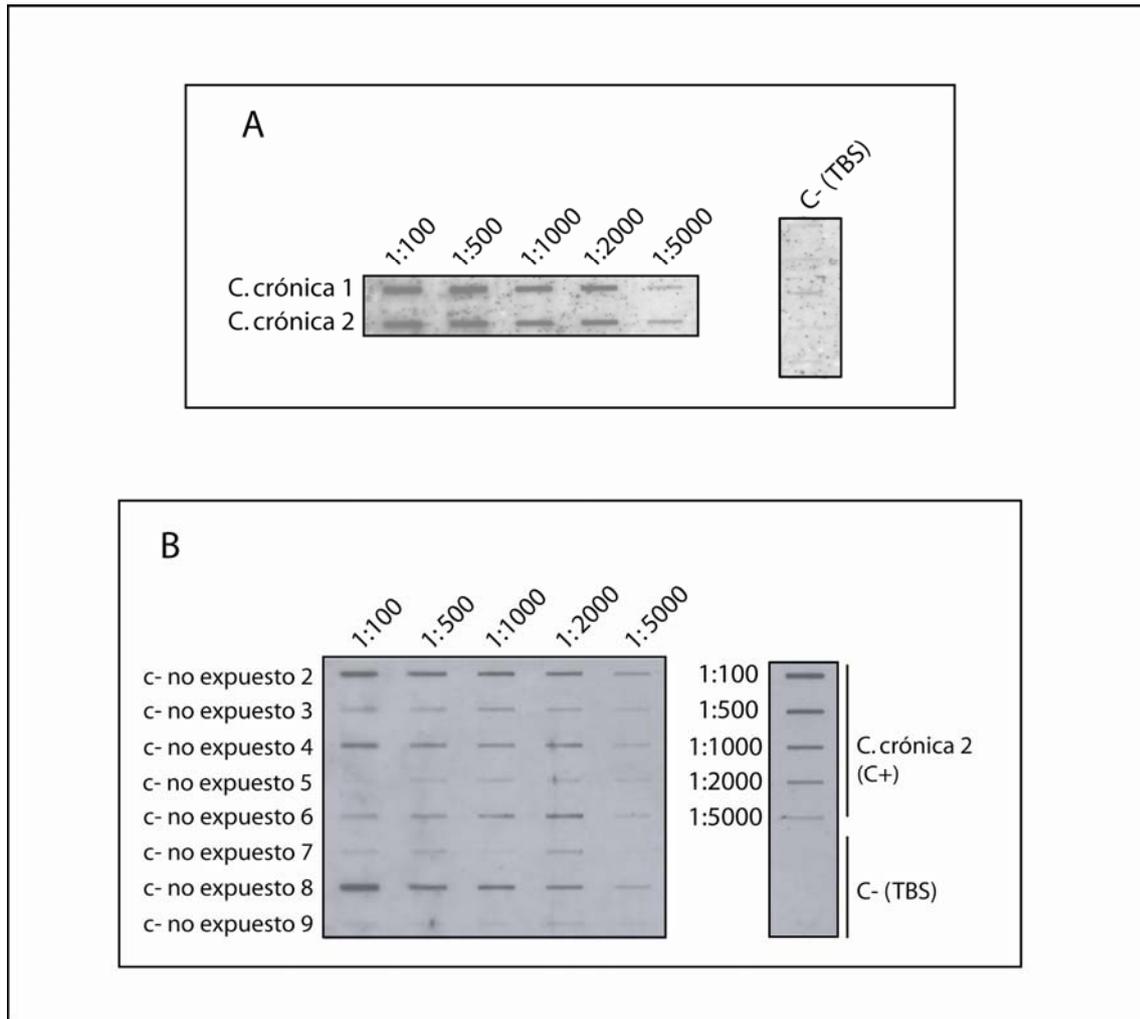


Figura 33. Detección de antígeno fúngico en suero en pacientes con candidiasis crónica y controles negativos. (A) Dot-blot a partir de sueros de pacientes con candidiasis crónica y (B) dot-blot a partir de sueros de pacientes controles negativos (sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo). Como anticuerpo primario se empleó el anticuerpo D21 y como secundario un anti-rabbit.

En la figura 33A se observa que el anticuerpo D21 presenta una reacción similar con las muestras serológicas de los voluntarios de candidiasis crónica (**candidiasis crónica 1 y 2**) a la obtenida con el extracto de proteínas y el sobrenadante de *C. famata* mostrados en las figuras 29 y 30 respectivamente. Por otro lado, únicamente un 20% de las muestras de los pacientes **c- expuestos y c- no expuestos** (figura 33B en la que sólo se muestran algunos de los casos analizados y la tabla 16), se observa una reacción similar a la obtenida con dicho extracto y dicho sobrenadante (figuras 29 y 30). Analizando estos resultados, se decidió tomar como dato de referencia (control positivo) la dilución 1:500 de personas diagnosticadas con candidiasis crónica asignándoles, tras su densitometración, un valor relativo de cantidad de antígeno en sangre del 100%, considerando negativos todos aquellos

voluntarios que presentasen valores por debajo del 10% y dudosos a aquellos con valores entre 11% y 25%. Dentro de los valores positivos se consideraron niveles bajos de antígenos: entre 25% y 50%; niveles medios: entre 51% y 79%; y niveles elevados: $\geq 80\%$. Estos valores se han mantenido para todos los casos estudiados en este trabajo.

Por otro lado, para interpretar los resultados obtenidos con el kit *Fungitell* hay que tener en cuenta que un suero humano normal puede contener (1,3)- β -D-glucanos, normalmente 10-40 pg/ml, presumiblemente de las levaduras comensales presentes en el aparato digestivo. Por ello, los valores de referencia a tener en cuenta para hacer un diagnóstico presuntivo de una infección fúngica empleando *Fungitell* son:

Tabla 14. Valores de referencia del kit *Fungitell*

| Diagnóstico/Infección | (1,3)- β -D-glucanos/SUERO (pg/ml) |
|-----------------------|--|
| Negativo | <60 pg/ml |
| Intermedio (posible) | 60 – 79 pg/ml |
| Positivo | ≥ 80 pg/ml |

Tabla 15. Detección de [(1,3)- β -D-glucanos] fúngicos en suero (x: no realizado).

| Muestra | (1,3)- β -D-glucanos (pg/ml) | |
|-----------------------|------------------------------------|---|
| Candidiasis crónica 1 | x | x |
| Candidiasis crónica 2 | 110 | + |
| c- expuesto 1 | 212 | + |
| c- expuesto 2 | 328 | + |
| c- expuesto 3 | 158 | + |
| c- expuesto 4 | x | x |
| c- expuesto 5 | x | x |
| c- expuesto 6 | 248 | + |
| c- expuesto 7 | 182 | + |
| c- expuesto 8 | x | x |
| c- no expuesto 1 | 498 | + |
| c- no expuesto 2 | x | x |
| c- no expuesto 3 | x | x |
| c- no expuesto 4 | x | x |
| c- no expuesto 5 | x | x |
| c- no expuesto 6 | x | x |
| c- no expuesto 7 | x | x |
| c- no expuesto 8 | x | x |
| c- no expuesto 9 | x | x |
| c- no expuesto 10 | x | x |
| c- no expuesto 11 | x | x |
| c- no expuesto 12 | x | x |

Desafortunadamente, en relación a la cantidad de (1,3)- β -D-glucanos, sólo se dispone de datos del paciente **Candidiasis crónica 2** y de 6 controles negativos de los cuales sólo uno pertenece al grupo **c- no expuestos** (Tabla 15). Se puede observar que todos presentan una cifra elevada de glucanos en suero. Como se ha explicado anteriormente, un suero humano normal puede contener normalmente entre 10-40 pg/ml de (1,3)- β -D-glucanos, presumiblemente de las levaduras comensales presentes en el aparato digestivo. Por tanto una de las razones de la obtención de estos resultados puede ser el contacto del grupo **c- expuesto** a estos microorganismos.

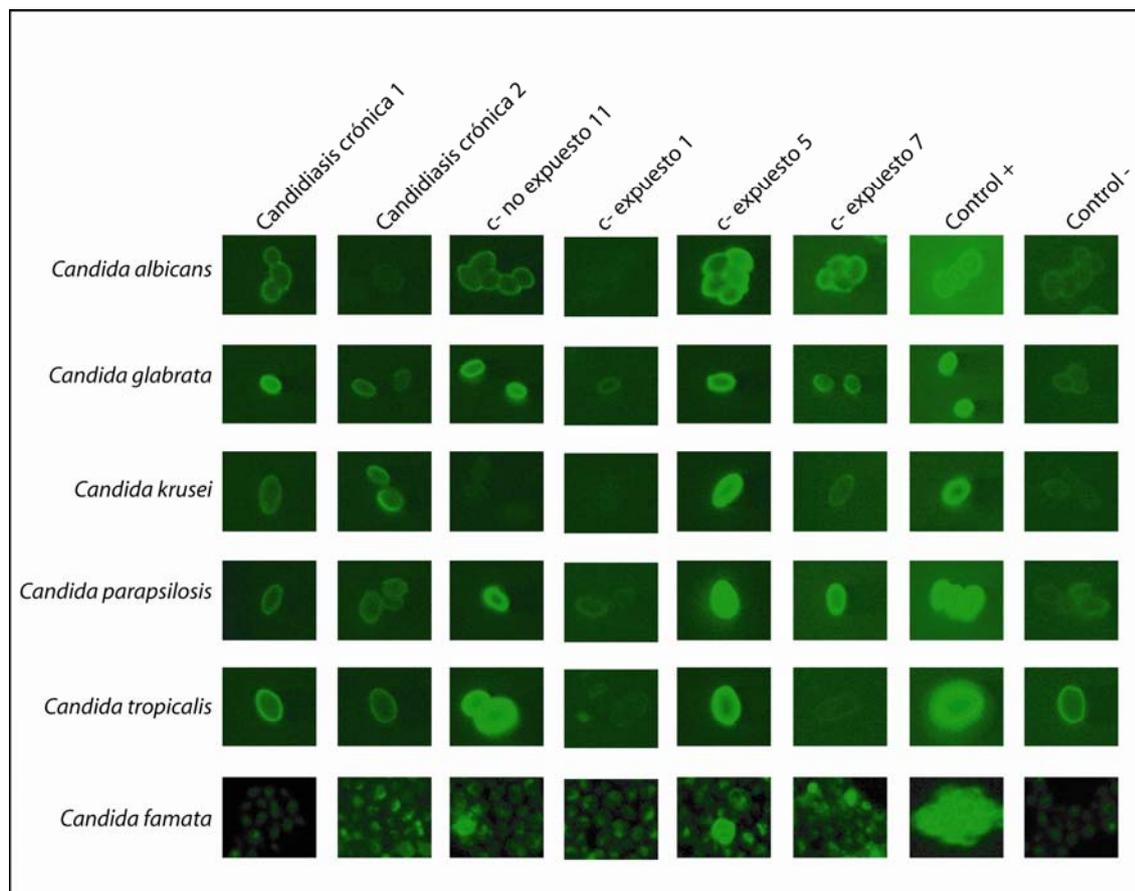


Figura 34. Detección de anticuerpos frente a levadura en suero de pacientes con candidiasis crónica y controles negativos. Sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo. El anticuerpo de los pacientes se hizo reaccionar con diferentes levaduras. Como anticuerpo secundario se empleó un anti-human.

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia (figura 34 donde sólo se muestran algunos de los casos estudiados y tabla 16) permiten afirmar la no existencia de diferencias significativas entre los pacientes con candidiasis crónica y los dos grupos de controles negativos. En general, todos ellos presentaban baja presencia de anticuerpos frente a levadura y sólo dos (16,6%) de los pacientes **c- expuestos** mostraron niveles elevados de

anticuerpos frente a la práctica totalidad de las levaduras que se ensayaron. En el caso de los anticuerpos, se considera negativo cuando los valores son + o -; bajo cuando los valores son ++ o +++; y alto cuando los valores son ++++ o +++++.

La siguiente tabla muestra un resumen (tabla 16) con los resultados de todas las pruebas realizadas a los pacientes con candidiasis crónica y a los controles negativos.

Los resultados obtenidos corroboran la idoneidad de los métodos diagnósticos desarrollados en este trabajo, para su empleo en el diagnóstico de candidiasis crónica. La detección de ácidos nucleicos mediante PCR, especialmente la PCR anidada y la PCR-Q, y el dot-blot parecen ser técnicas más idóneas para la realización de un diagnóstico por sí solas mientras que las otras dos técnicas, *Fungitell* e inmunofluorescencia, necesitan de pruebas adicionales que confirmen sus resultados.

Tabla 16. Resumen de las pruebas de diagnóstico realizadas a los pacientes (x: no realizado).

| Muestra | Enfermedad | Inmunofluorescencia | | | | | | % antígeno (1:500) | (1,3)- β - D- glucano (pg/ml) | PCR | | | | Secuenciación |
|-----------------------|---------------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------|--|-----|-------------------|------|-----------------------------|-----------------|
| | | <i>C.f</i> | <i>C.a</i> | <i>C.p</i> | <i>C.g</i> | <i>C.t</i> | <i>C.k</i> | | | ITS | β - glob | anid | Cuant. (geno- mas/ml) | |
| Candidiasis crónica 1 | Candidiasis crónica | - | - | - | +++ | ++ | - | 100 | x | + | + | + | 47 | no secuenciable |
| Candidiasis crónica 2 | Candidiasis crónica | - | - | - | - | - | + | 100 | 110 | + | + | + | 29 | no secuenciable |
| c- expuesto 1 | Sano | - | - | - | - | - | - | 19 | 212 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 2 | Sano | - | - | - | +/- | + | - | 9 | 328 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 3 | Sano | - | ++ | ++ | ++++ | +++++ | - | 7 | 158 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 4 | Sano | - | - | ++ | - | ++ | - | 11 | x | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 5 | Sano | ++++ | ++++ | +++++ | ++ | +++ | ++++ | 8 | x | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 6 | Sano | - | - | - | - | - | - | 5 | 248 | - | + | - | - | x |
| c- expuesto 7 | Sano | - | ++ | + | - | - | - | 77 | 182 | - | + | - | +/- | x |
| c- expuesto 8 | Sano | +++ | + | +++ | - | + | + | 10 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 1 | Sano | - | - | - | - | - | - | 4 | 498 | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 2 | Sano | - | - | - | - | - | - | 65 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 3 | Sano | - | - | - | - | - | - | 10 | x | - | + | - | - | |
| c- no expuesto 4 | Sano | - | - | - | + | ++ | - | 38 | x | - | + | + | 20 | no secuenciable |
| c- no expuesto 5 | Sano | + | - | - | - | - | - | 6 | x | - | + | + | - | no secuenciable |
| c- no expuesto 6 | Sano | - | - | - | - | + | - | 22 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 7 | Sano | - | - | - | - | + | - | 10 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 8 | Sano | - | - | - | - | + | - | 69 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 9 | Sano | - | - | - | + | +++ | - | 12 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 10 | Sano | - | - | - | - | + | - | 4 | x | - | + | - | 194 | no secuenciable |
| c- no expuesto 11 | Sano | + | - | ++ | ++ | ++++ | - | 0 | x | - | + | - | - | x |
| c- no expuesto 12 | Sano | - | - | + | ++ | +++ | - | -4 | x | - | + | - | - | x |

5.2. Otros pacientes

Nuestro grupo de investigación ha planteado la posibilidad de que determinadas enfermedades cuyo origen es desconocido o no está perfectamente determinado pudieran tener como agente etiológico un patógeno fúngico. Algunas de estas enfermedades, presentan una serie de características similares como su tendencia a la cronicidad con brotes de inflamación recurrentes y que se presentan con baja frecuencia. Algunos ejemplos de estas enfermedades lo constituyen determinadas patologías oculares como la Retinopatía Zonal Oculata Atípica (AZOOR) y ciertas enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Múltiple (EM) que afectan a un número cada vez más elevado de personas. Debido a la importancia de este planteamiento, en este trabajo se decidió emplear las técnicas optimizadas y descritas previamente con el fin de analizar la posible implicación de un patógeno fúngico como posible agente causante de este tipo de enfermedades.

5.2.1. AZOOR y patologías relacionadas

El primer caso analizado, y del que se ha realizado un estudio más detallado, lo constituye un varón caucásico nacido en 1949 diagnosticado en 1996 de retinopatía periférica zonal oclusa atípica (AZOOR) (Carrasco *et al*, 2005). A continuación se presenta un breve resumen del historial clínico del paciente. En 1994 comenzó con problemas oculares caracterizados por una rápida pérdida de la visión periférica en el ojo izquierdo que progresó al ojo derecho en los años siguientes. El paciente se sometió a una serie de pruebas clínicas entre ellas un análisis de fondo de ojo y un electroretinograma. La primera proporcionó un resultado prácticamente normal mientras que la segunda presentó claros signos de patología. Se analizaron también otros parámetros, como la movilidad extraocular e intraocular, la cámara anterior y la presión intraocular, situándose todos ellos dentro del rango normal. Con el progreso de la enfermedad, la angiografía con fluoresceína se volvió más hiperfluoresceínica, aspecto característico de algunos pacientes de AZOOR. Tradicionalmente esta enfermedad está clasificada dentro del grupo de las enfermedades autoinmunes (Gass *et al*, 2002), sin embargo, diferentes parámetros inmunológicos analizados en el paciente estaban dentro de los límites normales. Algunos de estos parámetros fueron la proteína C reactiva, el factor reumatoide, los anticuerpos frente a antígenos nucleares o frente a ADN nativo, el receptor soluble de la interleukina 2, los anticuerpos frente a cardiolipinas, la actividad hemolítica del complemento (C3 y C4), la

enzima convertidora de angiotensina y la población de linfocitos en sangre periférica. Además, el análisis mediante inmunofluorescencia tampoco reveló la presencia de anticuerpos específicos frente a la retina del paciente.

Adicionalmente se realizaron análisis de anticuerpos en sangre frente a diferentes microorganismos, con el fin de identificar la posible implicación de algún agente infeccioso en la enfermedad. Se buscó la presencia de anticuerpos frente a los siguientes agentes infecciosos: virus varicella-zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), herpesvirus tipo 6, parvovirus, virus coxackie, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la leucemia humana de células T (HTLV-I y II), hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), Citomegalovirus (CMV), *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamidia tracomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *Rickettsia conorii*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema spp.* Los resultados de estos análisis revelaron la ausencia de anticuerpos frente a estos organismos, detectándose únicamente unos niveles de anticuerpos ligeramente elevados frente a Citomegalovirus (CMV). También se realizaron análisis microbiológicos mediante siembra/cultivo de exudado conjuntival del paciente, no detectándose ningún microorganismo extraño y adicional a los propios de la flora ocular normal. Posteriormente se repitió este último análisis microbiológico, empleando en este caso exudados conjuntivales extraídos al paciente en Septiembre de 1999, obteniéndose un crecimiento rápido de la levadura *C. famata*. Este aislado se comparó mediante inmunofluorescencia con un cultivo de colección de dicha levadura, la *C. famata* tipo (figuras 35A y 35B respectivamente). Además, los análisis de PCR empleando los oligonucleótidos Leva 18s de los exudados conjuntivales tomados desde 1999, revelaban la amplificación de un fragmento que evidenciaba de nuevo la presencia de levaduras (figura 36).

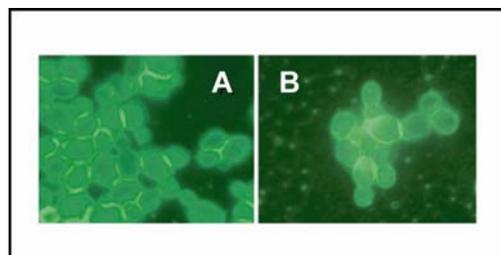


Figura 35. Análisis comparativo mediante inmunofluorescencia de (A) la levadura *Candida famata* aislada del exudado conjuntival de un paciente con AZOOR y (B) un cultivo de colección de dicha levadura.

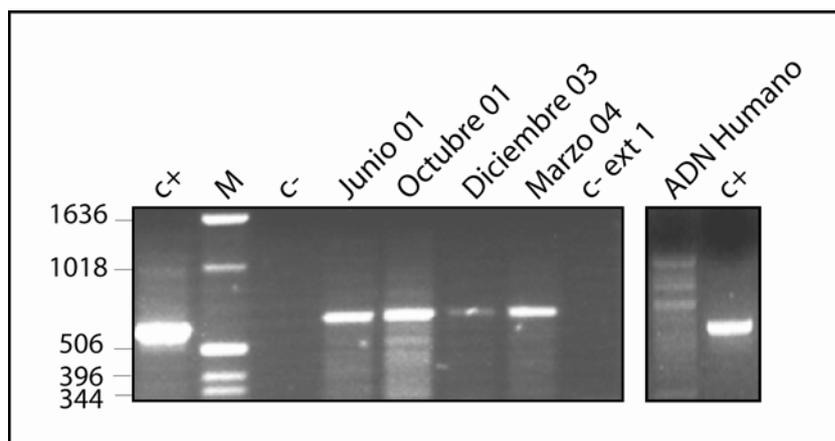


Figura 36. Amplificación de ADN fúngico mediante PCR, empleando los oligonucleótidos Leva 18S, de los exudados conjuntivales del paciente tomados a diferentes tiempos. c-ext 1: control negativo de extracción a partir de H₂O, c+: control positivo de PCR, c-: control negativo de PCR y M: marcador de peso molecular

Por otra parte, se obtuvieron linfocitos a partir de sangre fresca del paciente mediante gradientes de ficoll. En estos linfocitos se ensayó la estimulación con Fitohemaglutinina (PHA), comparándola con la de un control sano anónimo. En el caso de la PHA, la estimulación fue más baja en el paciente que en el control, como se puede observar en la figura 37A. Sin embargo, en la estimulación con *C. famata* resultaron más elevados en el paciente, lo que indicaban la presencia de linfocitos-T antígeno-específicos (figura 37B). De igual forma, el análisis mediante ELISA para detectar presencia de anticuerpos frente a *C. famata* en suero, también reveló un número más elevado de dichos anticuerpos en el paciente que en el control (figura 37C).

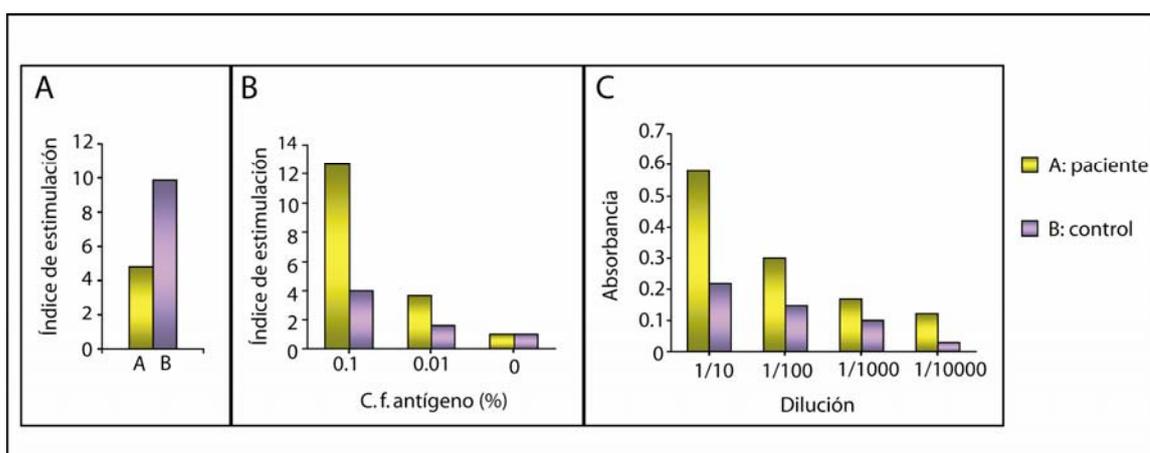


Figura 37. Análisis de estimulación del sistema inmune del paciente mediante: (A) Fitohemaglutinina, (B) *Candida famata*, y (C) detección de anticuerpos frente a *Candida famata* mediante la realización de un test de ELISA.

Finalmente, se realizó un ensayo clínico de hipersensibilidad en la piel del paciente mediante estimulación con *C. famata*. Transcurridas 24 horas desde la estimulación, en la piel del paciente se apreció una reacción de sensibilidad provocada como respuesta del sistema inmune del paciente a dicha estimulación (figura 38A). También se detectó reacción positiva frente a otras levaduras, especialmente frente a *C. albicans* (figura 38B). Sin embargo no hubo reacción en el caso de *S. cerevisiae*.

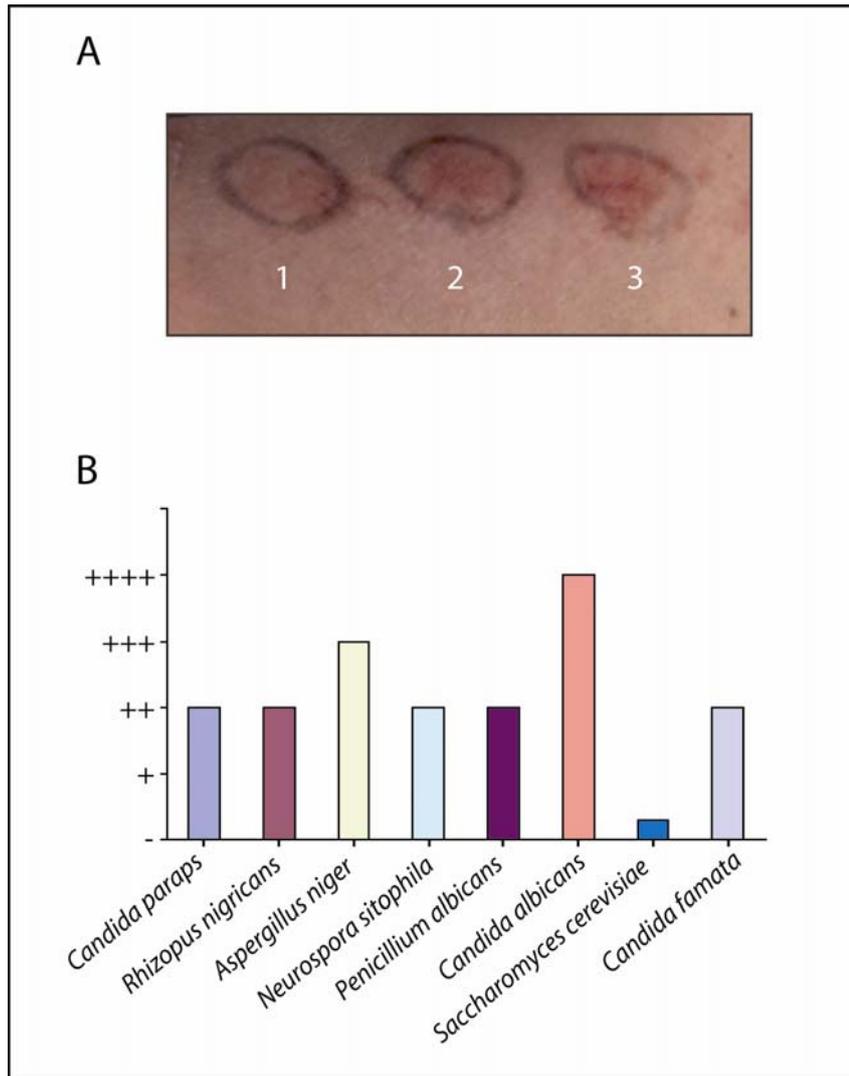


Figura 38. Ensayo de hipersensibilidad en la piel del paciente. (A) Se autoclavó y liofilizó la levadura *C. famata* y se mezcló con petrolatum. (1) Petrolatum solo, (2) petrolatum mezclado con 0,2 g de *C. famata* por ml o (3) con 0,5 g de *C. famata* por ml. (B) 0,5 g/ml de células de diferentes especies fúngicas se mezclaron con petrolatum y se aplicaron en la piel del paciente. La hipersensibilidad se observó a las 24h postaplicación.

Los resultados obtenidos en algunas de estas pruebas permitieron plantear la posibilidad de la implicación de patógenos fúngicos en el estado del paciente. Por tanto, el siguiente paso

consistió en examinar la posible presencia de levaduras en sangre. Se extrajeron muestras de sangre del paciente a diferentes intervalos de tiempo y se procedió a la extracción del ADN, tal como se describe en Materiales y Métodos, de suero en las muestras tomadas entre 1996 y 2004, y de sangre completa en las muestras extraídas posteriormente. A continuación, se realizó con todas las muestras PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS y los oligonucleótidos β -globina, PCR anidada y PCR cuantitativa (Figura 39, en la que sólo se exponen algunos casos a modo de ejemplo, y tabla 17). La PCR simple realizada con los oligonucleótidos ITS (figura 39A) permitió la amplificación de producto en una de las muestras (6,6%)(tabla 17). Sin embargo, empleando la PCR anidada (figura 39B y tabla 17) se amplificó producto en 8 de las 15 muestras analizadas (53,3%), observándose una disminución progresiva en la cantidad de producto obtenido a partir del suero de 1999, salvo un pico que se obtuvo en la sangre tomada en junio de 2005 que coincide con el momento en el que el paciente finalizó un tratamiento con el antifúngico caspofungina. En marzo de 2006 se vuelve a observar otro pico probablemente debido al comienzo de un nuevo tratamiento con el antifúngico voriconazol. De las 4 muestras de las que se pudo realizar secuenciación el 75% resultó ser *Debaryomyces hansenii*. Por otro lado con la técnica de PCR-Q se amplificó producto en el 40% de las muestras (tabla 17), observándose, como ocurría con la PCR anidada, una disminución progresiva en el número de genomas amplificados en las muestras de suero posteriores a la de 1999 con la excepción del pico obtenido en junio de 2005.

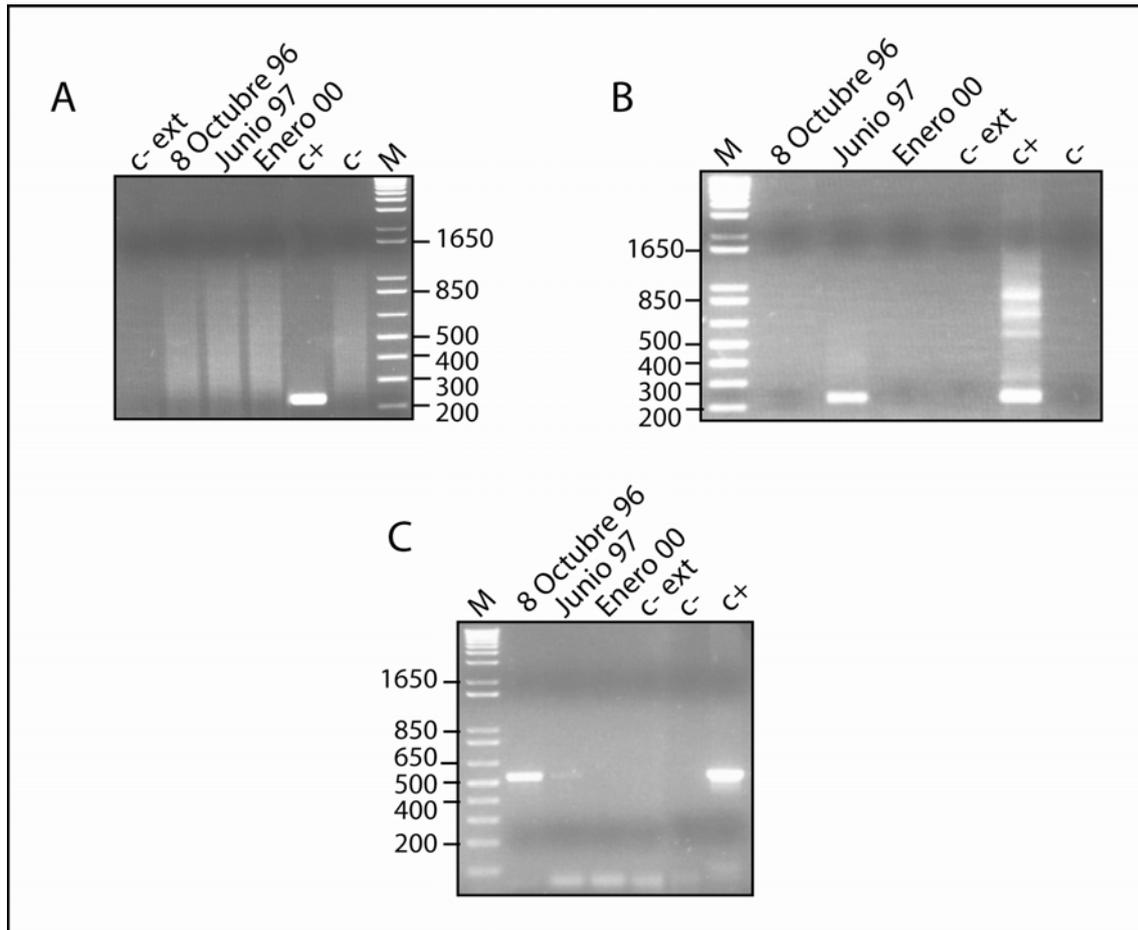


Figura 39. Detección de ADN fúngico en sangre. (A) PCR simple empleando los oligonucleótidos ITS, (B) segunda PCR de la PCR anidada y (C) PCR simple empleando los oligonucleótidos β -globina para amplificar ADN humano. c-ext: control negativo de extracción a partir de H₂O, c+: control positivo de PCR, c-: control negativo de PCR y M: marcador de peso molecular. Sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo.

Tabla 17. Detección de ADN fúngico en muestras de sangre mediante PCR simple, PCR anidada y PCR-Q (x: no realizado).

| Muestra | PCR simple (ITS) | PCR simple (β -glob) | PCR anidada | PCR cuantitativa | Secuenciación | |
|----------|------------------|-----------------------------|-------------|------------------|------------------------------|------------------------------|
| Sueros | Junio 96 | x | x | x | x | x |
| | 8-Octubre-96 | - | + | - | - | x |
| | 21-Octubre-96 | - | + | + | 79 | no secuenciable |
| | Junio 97 | - | + | + | 38 | <i>Debaryomyces hansenii</i> |
| | Junio 99 | - | + | - | 3,4 | no secuenciable |
| | Septiembre 99 | - | + | - | - | x |
| | Octubre 99 | - | - | + | 0,5 | no secuenciable |
| | Enero 00 | - | - | - | - | x |
| | Enero 01 | - | + | + | - | <i>S.caroticolor</i> |
| | Agosto 01 | - | - | - | 1,97 | no secuenciable |
| Junio 04 | - | + | + | - | <i>Debaryomyces hansenii</i> | |
| Sangre | Abril 05 | - | + | + | - | <i>Debaryomyces hansenii</i> |
| | Junio 05 | + | + | + | 58 | no secuenciable |
| | Octubre 05 | - | + | - | - | x |
| | Enero 06 | - | + | - | - | x |
| | Marzo 06 | - | + | + | - | no secuenciable |
| | Abril 06 | x | x | x | x | x |
| | Mayo 06 | x | x | x | x | x |
| Junio 06 | x | x | x | x | x | |

El análisis del caso continuó con un estudio inmunológico del paciente. Para ello se realizó una inmunodetección mediante dot-blot de antígenos fúngicos en diluciones del suero del paciente, empleando como anticuerpo primario el policlonal de conejo frente a *C. famata* (D21) (figura 40A en la que sólo se muestran unos casos a modo de ejemplo). Como controles negativos se utilizaron sueros de voluntarios sanos y una muestra de suero del paciente incubada con el suero preinmune del conejo. En la figura 40B se aprecia que la presencia de antígenos de levadura es evidente en los sueros de los años 1996 y 1997, disminuyendo en años posteriores hasta producirse un nuevo incremento en el año 2006. En el mes de marzo de este mismo año, el paciente comienza un tratamiento con voriconazol, que pudiera ser la explicación a este aumento debido a la acción de los compuestos antifúngicos sobre la infección. Paralelamente también se realizó inmunodetección mediante dot-blot, para detectar antígenos que reaccionasen con anticuerpos fabricados frente a otras levaduras: (D36) anti-*C. albicans*, (D43) anti-*C. parapsilosis*, (D51) anti-*C. glabrata*, (D34) anti-*S. cerevisiae* y (D40) anti-*R. mucilaginosa*, revelando datos similares a los obtenidos con la levadura *C. famata* (Figura 40C). En todos los casos, salvo en *S. cerevisiae*, se observa presencia elevada de antígeno que va disminuyendo progresivamente con el paso del tiempo, reflejando probablemente el efecto

de los tratamientos antifúngicos a los que se ha ido sometiendo el paciente. Simultáneamente se analizó la presencia de (1,3)- β -D-glucanos, componentes fúngicos no antigénicos, en las muestras de suero del paciente empleando el kit *Fungitell* (figura 40D). Con este test se encontró presencia de β -D-glucanos en la práctica totalidad de las muestras del paciente, aunque presentaba muchas variaciones entre los diferentes sueros ensayados, observándose una disminución progresiva a partir del suero obtenido en abril de 2005.

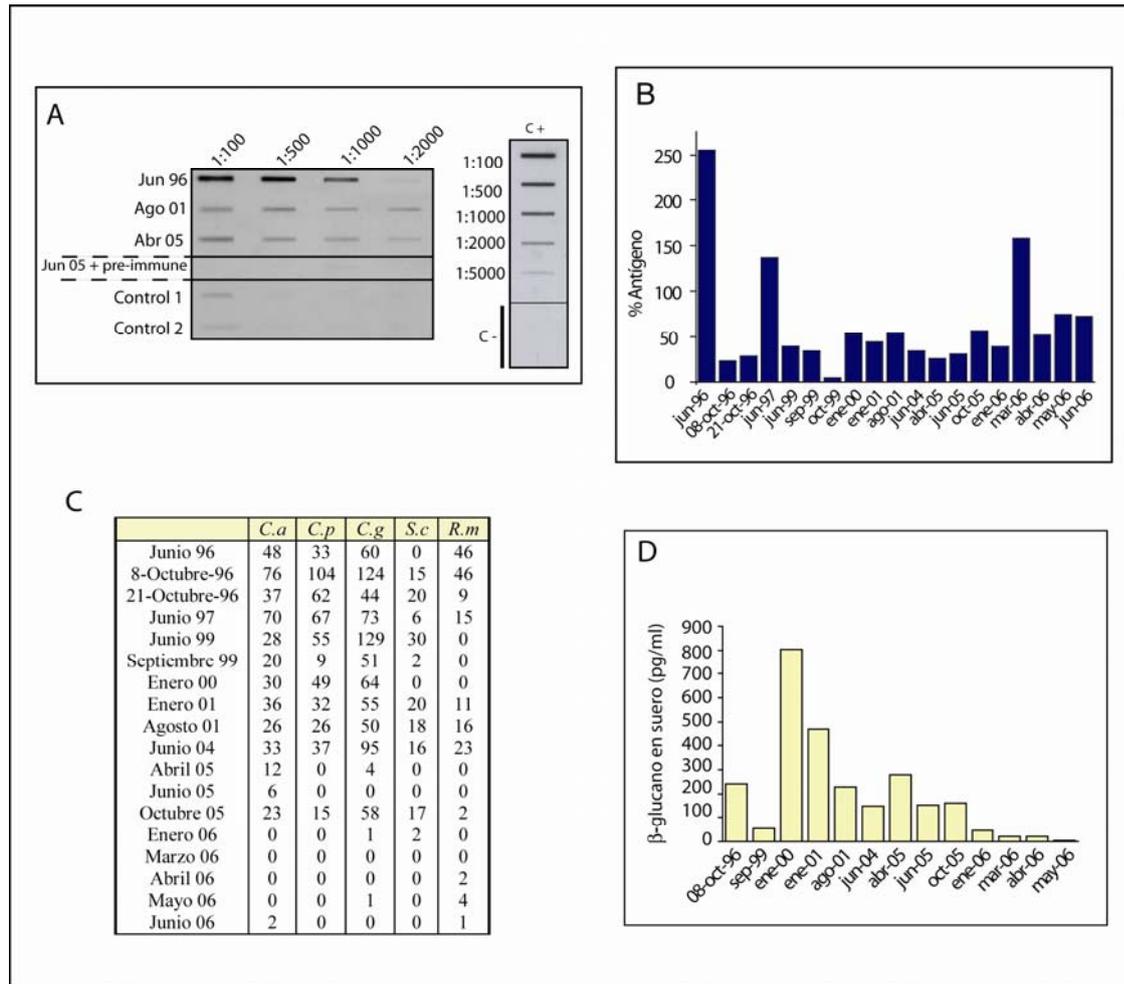


Figura 40. Detección de antígeno y β -glucanos en el suero del paciente. (A) inmunodetección mediante dot-blot de antígenos fúngicos en diluciones de diferentes sueros del paciente empleando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo frente a *C. famata* (D21). Como controles negativos se utilizaron sueros de voluntarios sanos y una muestra de suero del paciente incubada con el suero preimmune del conejo. **(B)** Detección de antígeno fúngico mediante dot-blot, **(C)** antígenos detectados en suero que reaccionan con anticuerpos fabricados frente a diferentes especies de levadura: *C.a*: *C. albicans*, *C.p*: *C. parapsilosis*, *C.g*: *C. glabrata*, *S.c*: *S. cerevisiae*, *R.m*: *R. mucilaginosa* y **(D)** detección de (1,3)- β -D-glucanos mediante el kit *Fungitell* en los sueros del paciente.

Por otro lado, las muestras se analizaron mediante inmunofluorescencia para detectar anticuerpos frente a diferentes levaduras empleando por un lado el kit *Euroimmun* para la

detección de anticuerpos frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (figura 41), y por otro lado el protocolo general descrito en el apartado 8 de Materiales y Métodos para analizar la presencia de anticuerpos frente a *C. famata* (figura 42A). En la figura 42A se puede observar una señal de fluorescencia elevada con *C. famata* en los sueros obtenidos en Junio de 1999, septiembre de 1999, enero de 2000 y enero de 2001. En los sueros de junio de 1996 y agosto de 2001 también se observa fluorescencia pero mucho menor. Sin embargo, no se ha encontrado señal de fluorescencia con otras levaduras con las que se ha testado el suero (figura 41) salvo una mínima reacción con *C. tropicalis* en los sueros obtenidos en 1999 y 2005, sugiriendo que los anticuerpos de este paciente son específicos contra *C. famata*. A continuación, también mediante inmunofluorescencia, se realizó una caracterización de los anticuerpos del suero obtenido en el año 1999 que reaccionaban con *C. famata* con el fin de analizar su tipología, empleando para ello, el método descrito en el apartado 8 de Materiales y Métodos pero utilizando anticuerpos secundarios contra diferentes inmunoglobulinas (figura 42B). Los resultados obtenidos muestran que son las IgM del paciente las que reaccionan con la levadura *C. famata*. Además se puede observar también que estos anticuerpos no reaccionan con otras levaduras como *C. albicans*.

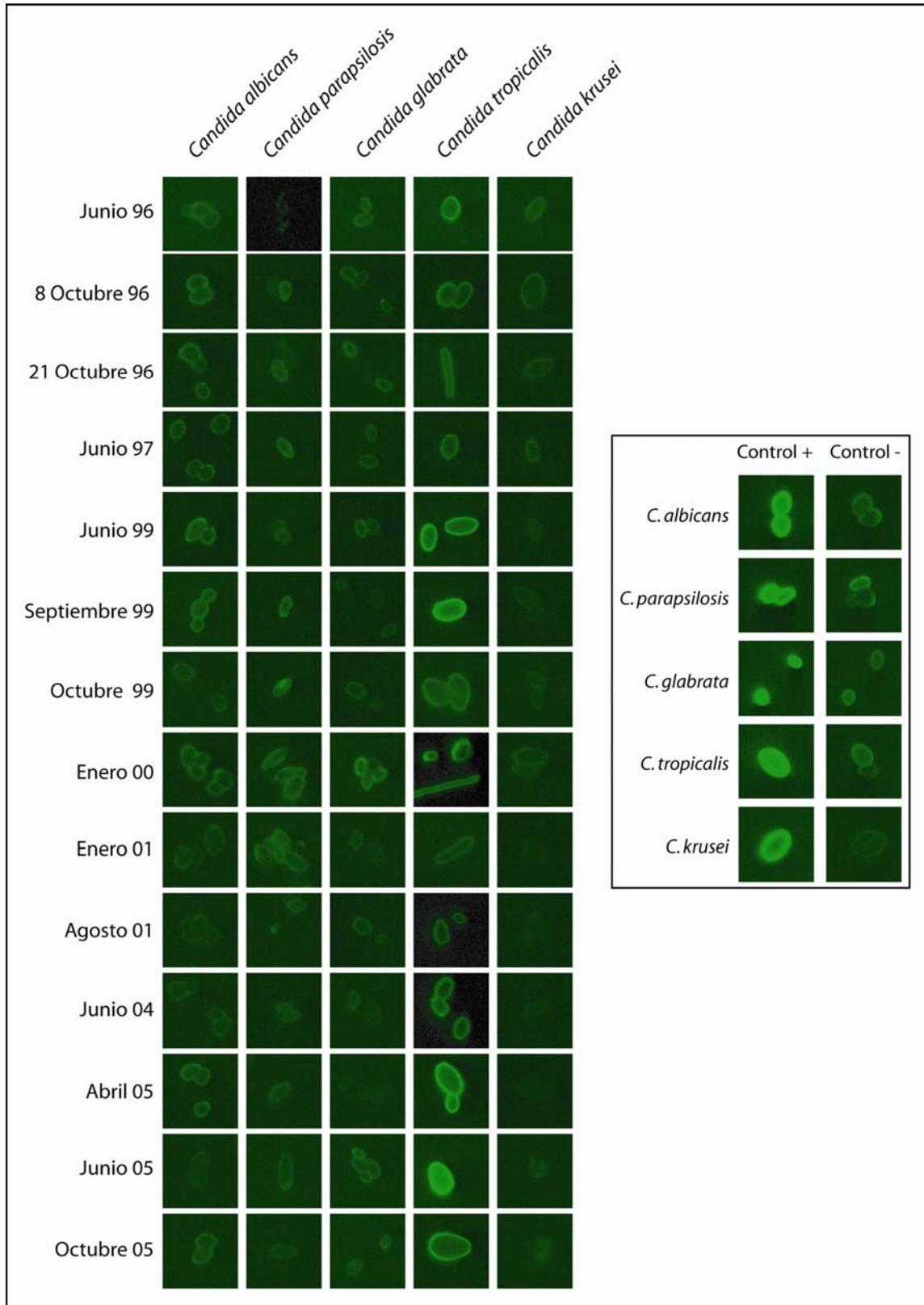


Figura 41. Inmunodetección mediante fluorescencia de anticuerpos frente a diferentes levaduras: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* en distintos sueros del paciente empleando el kit *Euroimmun*.

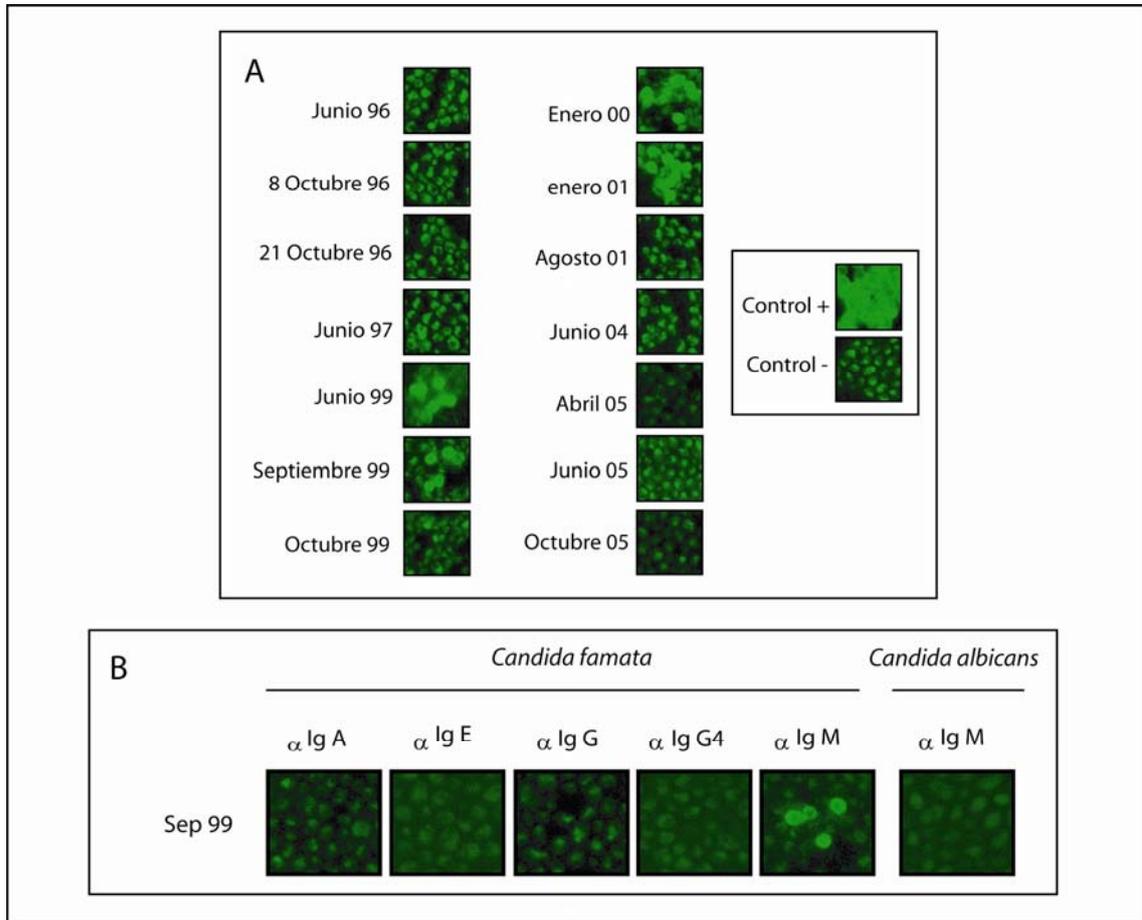


Figura 42. (A) Inmunodetección mediante fluorescencia de anticuerpos frente a *C. famata* en el suero del paciente y (B) análisis de la tipología de las inmunoglobulinas que reaccionan contra dicha levadura.

A continuación, en la tabla 18 se resumen los resultados de todas las pruebas de diagnóstico realizadas al paciente.

Tabla 18. Resumen de las pruebas diagnósticas realizadas al paciente (x: no realizado).

| Muestra | Enfermedad | Inmunofluorescencia | | | | | | % de antígeno (1:500) | (1,3)- β -D-glucanos (pg/ml) | PCR | | | | Secuenciación |
|---------------|------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------|------------------------------------|-----|---------------|---------|---------------------------|------------------------------|
| | | C.f | C.a | C.p | C.g | C.t | C.k | | | ITS | β -glob | anidada | cuantitativa (genomas/ml) | |
| Junio 96 | AZOR | + | - | - | - | - | - | 255 | x | x | x | x | x | x |
| 8-Octubre-96 | AZOR | + | - | - | - | - | - | 23 | 240 | - | + | - | - | x |
| 21-Octubre-96 | AZOR | + | - | - | - | - | - | 29 | x | - | + | + | 79 | no secuenciable |
| Junio 97 | AZOR | + | - | - | - | - | - | 137 | x | - | + | + | 38 | <i>Debaryomyces hansenii</i> |
| Junio 99 | AZOR | +++ | - | - | - | ++ | - | 39 | x | - | + | - | 3,4 | no secuenciable |
| Septiembre 99 | AZOR | ++ | - | - | - | ++ | - | 34 | 55 | - | + | - | - | x |
| Octubre 99 | AZOR | - | - | - | - | - | - | 4 | x | - | - | + | 0,5 | no secuenciable |
| Enero 00 | AZOR | +++ | - | - | - | - | - | 53 | 802 | - | - | - | - | x |
| Enero 01 | AZOR | +++ | - | - | - | - | - | 45 | 471 | - | + | + | - | <i>S.caroticolor</i> |
| Agosto 01 | AZOR | + | - | - | - | - | - | 54 | 229 | - | - | - | 1,97 | no secuenciable |
| Junio 04 | AZOR | + | - | - | - | - | - | 35 | 146 | - | + | + | - | <i>Debaryomyces hansenii</i> |
| Abril 05 | AZOR | - | - | - | - | ++ | - | 26 | 278 | - | + | + | - | <i>Debaryomyces hansenii</i> |
| Junio 05 | AZOR | + | - | - | - | + | - | 31 | 152 | + | + | + | 58 | no secuenciable |
| Octubre 05 | AZOR | - | - | - | - | + | - | 56 | 159 | - | + | - | - | x |
| Enero 06 | AZOR | - | - | - | - | - | - | 39 | 47 | - | + | - | - | x |
| Marzo 06 | AZOR | - | - | - | - | + | - | 158 | 20 | - | + | + | - | no secuenciable |
| Abril 06 | AZOR | - | - | - | - | + | - | 52 | 21 | x | x | x | x | x |
| Mayo 06 | AZOR | - | - | - | - | + | - | 74 | 4 | x | x | x | x | x |
| Junio 06 | AZOR | - | - | - | - | ++ | - | 72 | x | x | x | x | x | x |

Para ampliar los resultados obtenidos con este paciente, se inició el estudio de un grupo de individuos afectados de diferentes enfermedades oculares similares al primer caso analizado. Este grupo estaba compuesto por un total de 16 pacientes, 5 de ellos diagnosticados de AZOOR, 5 de coroidopatía serpiginosa y 5 de coroiditis multifocal (tabla 19). La selección de los pacientes fue realizada por los Drs. Escoto y Barraquer del Centro de Oftalmología Barraquer de Barcelona.

Tabla 19. Características de pacientes con enfermedades oculares: paciente, enfermedad, sexo y edad.

| Pacientes | Enfermedad | Sexo | Edad (años) |
|-----------|---------------------------------------|-------|-------------|
| E.O 1 | AZOOR | Mujer | 54 |
| E.O 2 | AZOOR | Mujer | 35 |
| E.O 3 | AZOOR | Mujer | 11 |
| E.O 4 | AZOOR | Varón | 56 |
| E.O 5 | AZOOR | Mujer | 62 |
| E.O 6 | Coroidopatía serpiginosa | Varón | 59 |
| E.O 7 | Coroidopatía serpiginosa | Varón | 70 |
| E.O 8 | Coroidopatía serpiginosa | Varón | 70 |
| E.O 9 | Coroidopatía serpiginosa | Varón | 61 |
| E.O 10 | Coroidopatía serpiginosa | Mujer | 64 |
| E.O 11 | Coroiditis multifocal con paneuveitis | Mujer | 35 |
| E.O 13 | Coroiditis multifocal con paneuveitis | Mujer | 28 |
| E.O 13 | Coroiditis multifocal con paneuveitis | Varón | 40 |
| E.O 14 | Coroiditis multifocal con paneuveitis | Varón | 44 |
| E.O 15 | Coroiditis multifocal con paneuveitis | Varón | 58 |

El procedimiento empleado para el estudio de estos pacientes fue similar al descrito para el primer caso analizado. Este estudio se inició con la extracción de muestras sanguíneas a los pacientes en condiciones de esterilidad. Parte de la sangre se recogió en dos tubos con EDTA para evitar su coagulación y el resto en tubos especiales que permitían la separación de células sanguíneas y suero. Estas muestras se dividieron en alícuotas y se conservaron adecuadamente para ser analizadas mediante las diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas.

El primer paso consistió en analizar la presencia de ADN fúngico en las muestras mediante la técnica de PCR. Para ello se realizó extracción del ADN total de la sangre de cada una de las muestras y a continuación se amplificó el ADN mediante PCR simple, empleando los oligonucleótidos ITS y los oligonucleótidos β -globina, PCR anidada y PCR-Q. Por otra

parte, el suero se empleó para detectar presencia de antígenos de *Candida* y otras levaduras mediante dot-blot, (1,3)- β -D-glucanos mediante el kit *Fungitell* y anticuerpos anti-candida mediante inmunofluorescencia.

Tabla 20. Detección de ADN fúngico en muestras de sangre mediante PCR simple, PCR anidada y PCR-Q.

| Muestras | PCR ITS | PCR β -glob | PCR anidada | PCR cuantitativa (genomas/ml) | Secuenciación |
|----------|---------|-------------------|-------------|-------------------------------|-----------------|
| E.O 1 | - | + | + | 24 | no secuenciable |
| E.O 2 | - | + | - | - | x |
| E.O 3 | - | + | - | - | x |
| E.O 4 | - | + | - | - | x |
| E.O 5 | - | + | - | - | x |
| E.O 6 | + | + | + | 125 | no secuenciable |
| E.O 7 | - | + | - | - | x |
| E.O 8 | - | + | - | 15 | no secuenciable |
| E.O 9 | - | + | - | 20 | no secuenciable |
| E.O 10 | - | + | - | 14 | no secuenciable |
| E.O 11 | - | + | - | 62 | no secuenciable |
| E.O 12 | - | + | - | - | x |
| E.O 13 | - | + | - | - | x |
| E.O 14 | - | + | - | - | x |
| E.O 15 | - | + | - | - | x |

La técnica de PCR simple realizada con los oligonucleótidos ITS amplificó producto en uno de los cinco pacientes (20%) con coroidopatía serpiginosa, no detectándose producto en el resto de los casos. Sin embargo, mediante PCR anidada se amplificó producto detectable en uno de los pacientes con AZOOR (20%) y en uno de los pacientes con coroidopatía serpiginosa (20%) mientras que no se detectó producto en el caso de los pacientes con coroiditis multifocal con paneuveítis. Por otra parte, la PCR cuantitativa permitió la amplificación de producto en uno de los pacientes con AZOOR (20%), en un 80% de los pacientes con coroidopatía serpiginosa y en uno de los pacientes con coroiditis multifocal con paneuveítis (20%) (tabla 20).

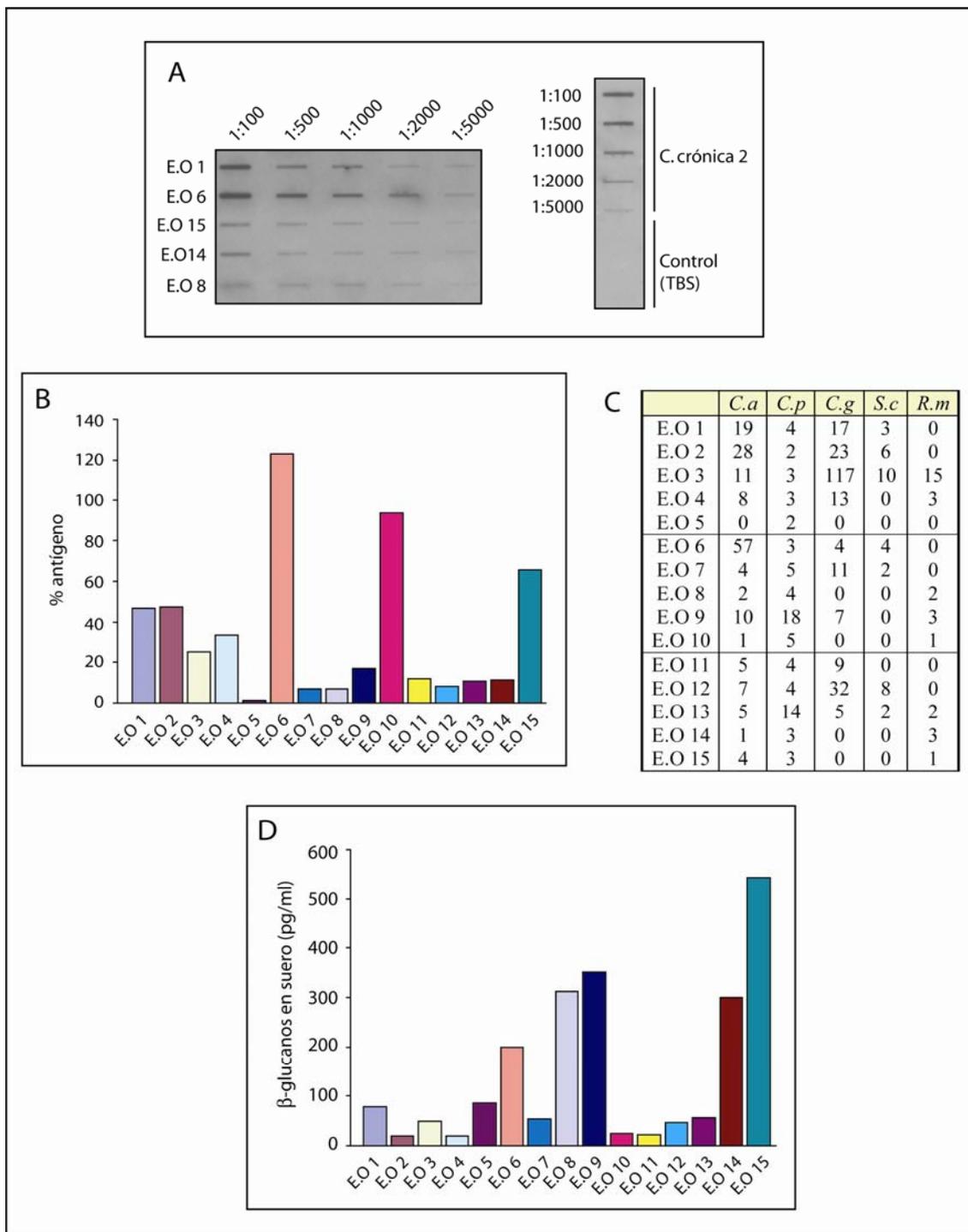


Figura 43. Detección de antígeno y β -glucanos en el suero de los pacientes. (A) Inmunodetección mediante dot-blot de antígenos fúngicos en diluciones de sueros de diferentes pacientes empleando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo frente a *C. famata* (D21). **(B)** Detección de antígeno fúngico mediante dot-blot, **(C)** antígenos detectados en suero que reaccionan con anticuerpos fabricados frente a diferentes especies de levadura: *C.a.* *C. albicans*, *C.p.* *C. parapsilosis*, *C.g.* *C. glabrata*, *S.c.* *S. cerevisiae*, *R.m.* *R. mucilaginosa* y **(D)** detección de (1,3)- β -D-glucanos mediante el kit *Fungitell* en los sueros de los pacientes.

La detección de antígenos fúngicos mediante dot-blot empleando el anticuerpo D21 (figura 43A, en la que se muestran algunos casos a modo de ejemplo, y 43B) revela la presencia de niveles bajos de antígeno fúngico en suero en el 60% de los pacientes con AZOOR y niveles medio/alto de antígeno en el 40% de los pacientes con coroidopatía serpiginosa y en uno de los pacientes con coroiditis multifocal (20%). Paralelamente también se realizó inmunodetección mediante dot-blot para detectar antígenos que reaccionasen frente a anticuerpos fabricados contra otras especies de levaduras (anticuerpos detallados en Materiales y Métodos), revelando niveles de antígeno medio/alto que reaccionaban con el anticuerpo frente a *C. albicans* en uno de los pacientes con coroidopatía serpiginosa, niveles elevados de antígeno que reaccionaban con el anticuerpo frente a *C. glabrata* en uno de los pacientes con AZOOR y niveles bajos de antígeno que reaccionaban con el anticuerpo frente a *C. glabrata* en uno de los pacientes con coroiditis multifocal (figura 43C). Por otro lado, la presencia de (1,3)- β -D-glucanos en suero fue elevada en el 60% de los pacientes con coroidopatía serpiginosa y en el 40% de los pacientes con coroiditis multifocal (figura 43D).

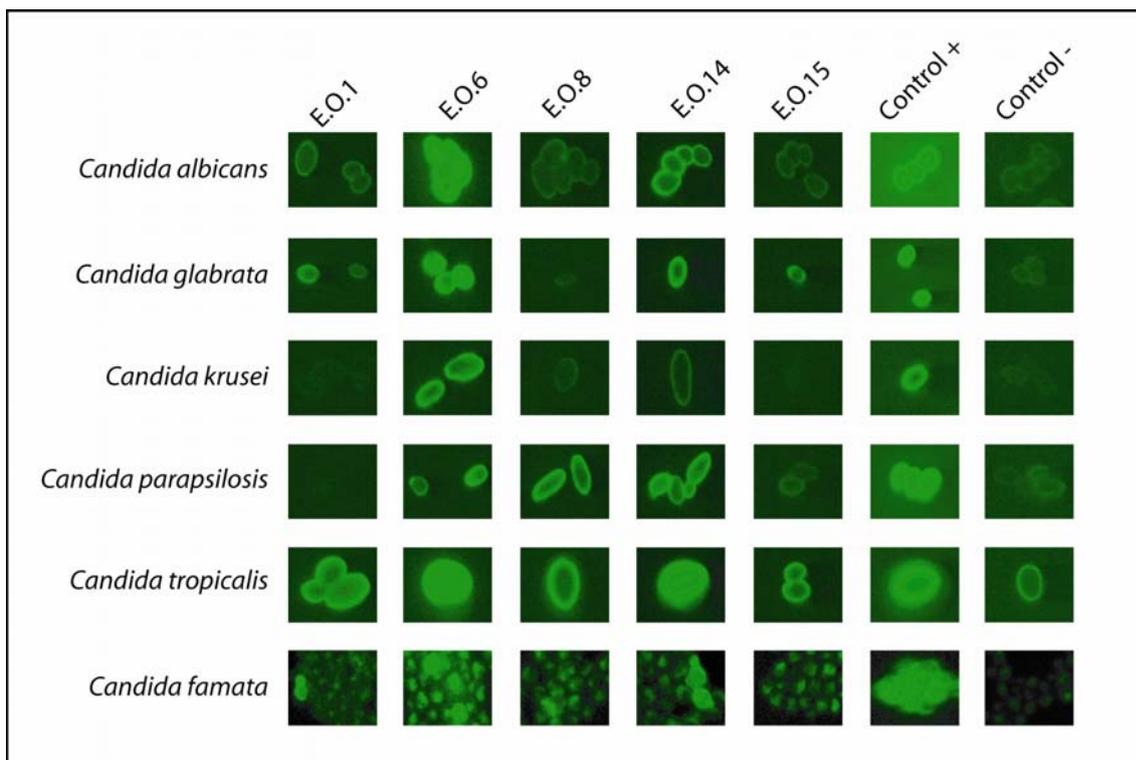


Figura 44. Inmunodetección mediante fluorescencia de anticuerpos frente a diferentes levaduras: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. famata* en sueros de diferentes pacientes (sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo).

Tabla 21. Detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia.

| Muestras pacientes | Levaduras | | | | | |
|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
| | <i>C. famata</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> | <i>C. glabrata</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>C. krusei</i> |
| E.O 1 | +++ | - | - | - | +++ | - |
| E.O 2 | - | ++ | - | + | +++++ | - |
| E.O 3 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++++ | + |
| E.O 4 | ++++ | ++++ | + | ++++ | +++++ | + |
| E.O 5 | - | - | - | - | + | - |
| E.O 6 | + | +++++ | + | ++++ | +++++ | +++ |
| E.O 7 | ++++ | ++ | ++ | +++ | ++++ | - |
| E.O 8 | - | - | + | - | + | - |
| E.O 9 | + | ++++ | - | +++++ | +++++ | + |
| E.O 10 | - | ++ | ++ | + | +++ | - |
| E.O 11 | - | - | - | + | ++++ | + |
| E.O 12 | - | + | - | ++ | +++ | - |
| E.O 13 | + | ++ | ++ | ++ | ++++ | + |
| E.O 14 | - | - | - | - | - | - |
| E.O 15 | - | - | - | - | - | - |

La detección de anticuerpos en suero mediante inmunofluorescencia (figura 44 donde sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo y tabla 21), reveló niveles medio/altos de estos frente a las diferentes levaduras en el 40% de los pacientes con AZOOR, en un 60% de los pacientes con coroidopatía serpiginosa y en uno de los pacientes con coroiditis multifocal con paneuveítis (20%).

La siguiente tabla muestra un resumen con los resultados de todas las pruebas realizadas a los pacientes con patologías oculares (tabla 22).

Tabla 22. Resumen de las pruebas de diagnóstico realizadas a los pacientes con enfermedades oculares.

| Muestra | Enfermedad | Inmunofluorescencia | | | | | | % de antígeno (1:500) | Ag (otras lev) | (1,3)- β -D-glucano (pg/ml) | PCR | | | | Secuenc. |
|---------|-----------------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|----------------|-----------------------------------|-----|---------------|---------|--------------------|------------|
| | | <i>C.f</i> | <i>C.a</i> | <i>C.p</i> | <i>C.g</i> | <i>C.t</i> | <i>C.k</i> | | | | ITS | β -glob | anidada | Cuant. (genom./ml) | |
| E.O 1 | AZoor | +++ | - | - | - | +++ | - | 47 | - | 78 | + | + | + | 24 | no secuenc |
| E.O 2 | AZoor | - | ++ | - | + | +++++ | - | 47 | - | 19 | - | + | - | - | X |
| E.O 3 | AZoor | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | + | 25 | <i>C.g</i> | 49 | - | + | - | - | X |
| E.O 4 | AZoor | +++++ | +++++ | + | +++++ | +++++ | + | 33 | - | 20 | - | + | - | - | X |
| E.O 5 | AZoor | - | - | - | - | + | - | 1 | - | 87 | - | + | - | - | X |
| E.O 6 | Cor.serp. | + | +++++ | + | +++++ | +++++ | +++ | 123 | <i>C.a</i> | 199 | + | + | + | 125 | no secuenc |
| E.O 7 | Cor.serp | +++++ | ++ | ++ | +++ | +++++ | - | 6 | - | 53 | - | + | - | - | X |
| E.O 8 | Cor.serp | - | - | + | - | + | - | 7 | - | 312 | - | + | - | 15 | no secuenc |
| E.O 9 | Cor.serp | + | +++++ | - | +++++ | +++++ | + | 17 | - | 352 | - | + | - | 20 | no secuenc |
| E.O 10 | Cor.serp | - | ++ | ++ | + | +++ | - | 94 | - | 23 | - | + | - | 14 | no secuenc |
| E.O 11 | Coroiditis mult. Pan. | - | - | - | + | +++++ | + | 12 | - | 22 | - | + | - | 62 | no secuenc |
| E.O 12 | Coroiditis mult. Pan. | - | + | - | ++ | +++ | - | 8 | <i>C.g</i> | 47 | - | + | - | - | X |
| E.O 13 | Coroiditis mult. Pan. | + | ++ | ++ | ++ | +++++ | + | 11 | - | 57 | - | + | - | - | X |
| E.O 14 | Coroiditis mult. Pan. | - | - | - | - | - | - | 11 | - | 300 | - | + | - | - | X |
| E.O 15 | Coroiditis mult. Pan. | - | - | - | - | - | - | 65 | - | 543 | - | + | - | - | X |

5.2.2. Esclerosis múltiple

El primer caso que se consideró y sobre el que se ha realizado un estudio en mayor profundidad, lo presenta un varón caucásico nacido en 1977 diagnosticado en 2002 de Esclerosis Múltiple. A continuación se resume el historial clínico del paciente. En el año 2000 comenzó con paresia en la extremidad superior derecha con recuperación espontánea. En los años posteriores el paciente experimentó otra serie de brotes en los que sufrió paresia en las extremidades inferiores. En 2002 se le realizó una resonancia magnética craneal y medular que mostró la existencia de múltiples lesiones desmielinizantes, diagnosticándosele la enfermedad. Tras el último brote, ocurrido en junio de 2002, persiste en el paciente una paresia moderada-grave que le obliga a caminar con dos muletas y usar silla de ruedas para desplazamientos largos. Además, el paciente presenta también alteraciones de esfínteres.

El paciente fue sometido a una serie de pruebas clínicas como la detección de anticuerpos frente a diferentes microorganismos y el análisis inmunoglobulínico. Los resultados del primer análisis revelaron la ausencia de anticuerpos frente a herpesvirus tipo 6 detectándose sin embargo IgG frente al virus Epstein-Barr (EBV). Por otro lado, el análisis inmunoglobulínico reveló una elevada cifra de IgG en el líquido cefalorraquídeo del paciente. A partir de mayo de 2005 el paciente comienza a tratarse con antifúngicos de forma intermitente.

Teniendo en cuenta estos datos, el siguiente paso consistió en examinar la posible presencia de levaduras en sangre. Para ello se tomaron muestras de sangre del paciente a diferentes intervalos de tiempo y se realizó extracción de ADN de sangre completa. El ADN extraído de cada una de las muestras se analizó mediante PCR simple, empleando los oligonucleótidos β -globina y los oligonucleótidos ITS, PCR anidada y PCR cuantitativa (tabla 23). En el caso de este paciente, y debido a la naturaleza de la enfermedad diagnosticada, también se realizó una extracción de líquido cefalorraquídeo y se procesó de forma similar a la descrita previamente para muestras sanguíneas. La PCR simple realizada con los oligonucleótidos ITS (tabla 23) reveló presencia de ADN fúngico en el 50% de las muestras de sangre, obteniéndose el mismo resultado con la PCR anidada (tabla 23). A continuación se intentó la secuenciación del ADN amplificado de cada una de las muestras, pudiéndose secuenciar finalmente sólo una de ellas, concretamente la tomada en abril de 2005. El resultado obtenido fue que el ADN amplificado de esa muestra pertenecía a

Rhodotorula mucilaginosa. La PCR cuantitativa (tabla 23) reveló presencia de ADN fúngico en el 75% de las muestras de este paciente, obteniéndose el número más alto de genomas en la sangre extraída en noviembre de 2005 y apreciándose una disminución en la cantidad de ADN fúngico en las muestras sanguíneas de este paciente extraídas a partir de febrero de 2006. El análisis del líquido cefalorraquídeo mediante PCR no reveló presencia de ADN fúngico en la muestra.

Tabla 23. Detección de ADN fúngico en muestras de sangre mediante PCR simple, PCR anidada y PCR-Q (x: no realizado).

| Muestras | PCR ITS | PCR β -glob | PCR anidada | PCR cuantitativa (genomas/ml) | Secuenciación |
|------------|---------|-------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------|
| Abr-05 | + | + | + | 55 | <i>R.mucilaginosa</i> |
| Nov-05 | - | + | - | 223 | no secuenciable |
| Feb-06 | - | + | - | - | x |
| Mar-06 | + | + | + | 27 | no secuenciable |
| Jun-06 | x | x | x | x | x |
| Jun-05 LCR | - | - | - | - | x |

El análisis del caso continuó con un estudio inmunológico del paciente. En las figuras 45A, 45B y tabla 25 (dot-blot para la detección de antígenos fúngicos empleando el anticuerpo D21) se observa la presencia de un nivel elevado de antígeno fúngico, tanto en el 60% de las muestras de sangre, como en el líquido cefalorraquídeo del paciente. De igual forma, en el dot-blot realizado con anticuerpos fabricados frente a otras especies de levaduras (Materiales y Métodos), el resultado fue negativo para todos los casos (Figura 45C). Paralelamente se analizó la presencia de (1,3)- β -D-glucanos, componentes fúngicos no antigénicos, en las muestras de suero del paciente empleando el kit *Fungitell* (figura 45D). Con este test se ha encontrado presencia de β -D-glucanos en la práctica totalidad de las muestras del paciente, a excepción fundamentalmente de la muestra de suero tomada en febrero de 2006, en la que se detectaron niveles de (1,3)- β -D-glucanos no indicativos de infección.

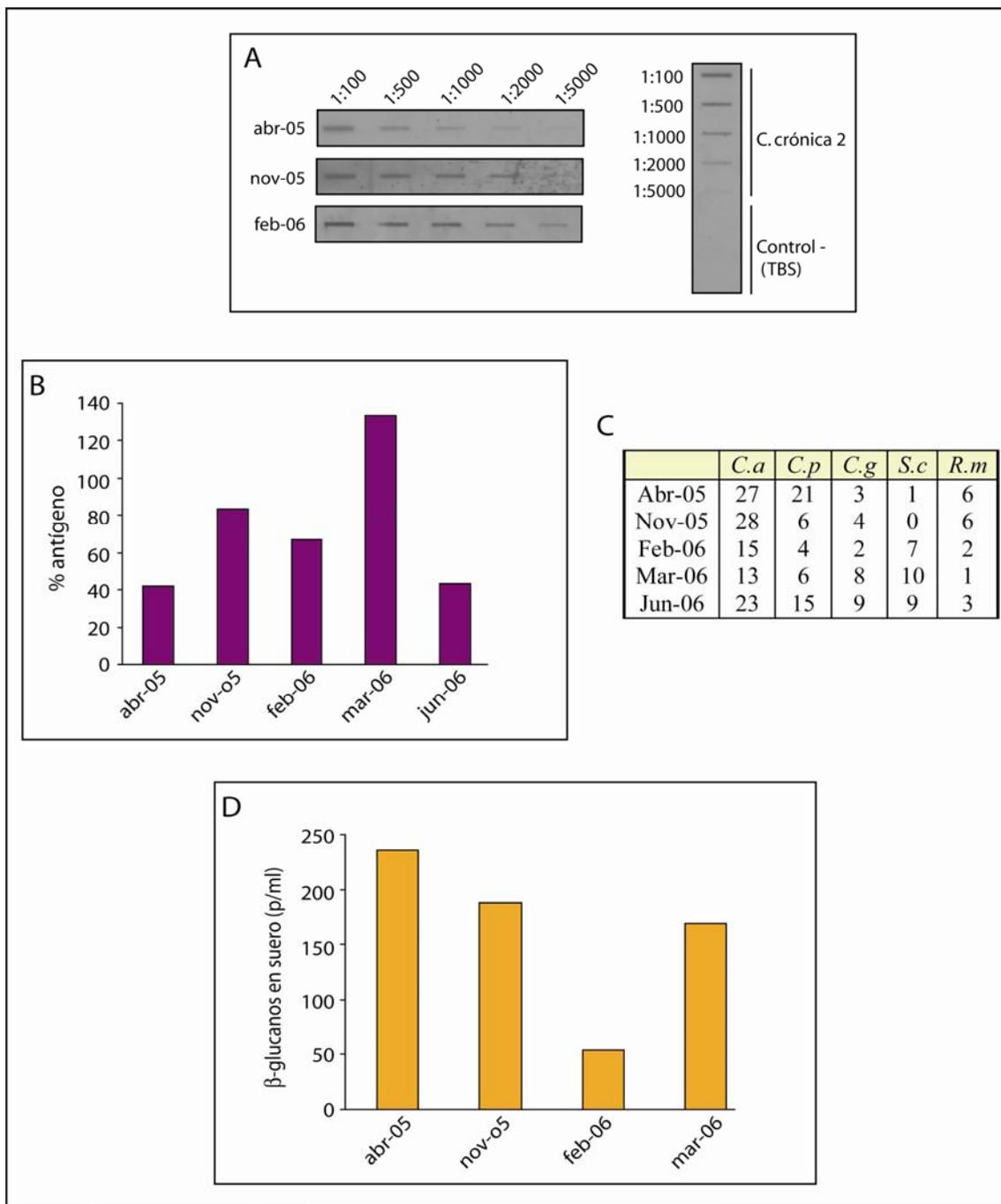


Figura 45. Detección de antígeno y β -glucanos en el suero del paciente. (A) Inmunodetección mediante dot-blot de antígenos fúngicos en diluciones de diferentes sueros del paciente empleando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo frente a *C. famata* (D21) (sólo se muestran las tres primeras fechas a modo de ejemplo). **(B)** Detección de antígeno fúngico mediante dot-blot, **(C)** antígenos detectados en suero que reaccionan con anticuerpos fabricados frente a diferentes especies de levadura: *C.a.* *C. albicans*, *C.p.* *C. parapsilosis*, *C.g.* *C. glabrata*, *S.c.* *S. cerevisiae*, *R.m.* *R. mucilaginosa* y **(D)** detección de (1,3)- β -D-glucanos mediante el kit *Fungitell* en los sueros del paciente.

Paralelamente, las muestras se analizaron mediante inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos frente a diferentes levaduras, tal como se describe en Materiales y Métodos. Se observa una señal de fluorescencia media/alta, y por lo tanto niveles de anticuerpo también medio/altos, frente a la práctica totalidad de las levaduras ensayadas en las tres primeras muestras de sangre analizadas (figura 46A y tabla 24). En febrero y marzo de 2006 se detecta un descenso en la señal de fluorescencia y por tanto en los niveles de anticuerpo frente a las diferentes levaduras, observándose de nuevo un leve aumento en el suero de junio de 2006. De igual forma se analizó la presencia de anticuerpos frente a las diferentes levaduras en el líquido cefalorraquídeo, detectándose anticuerpos frente a *C. famata*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. A continuación, también mediante inmunofluorescencia, se realizó una caracterización de los anticuerpos del líquido cefalorraquídeo que reaccionaban frente a *C. famata*, con el fin de analizar su tipología. Para ello se empleó el método descrito en Materiales y Métodos pero utilizando anticuerpos secundarios frente a diferentes inmunoglobulinas. Los resultados obtenidos muestran que son las IgG del paciente las que reaccionan con la levadura *C. famata* siendo estas mismas inmunoglobulinas las que presentan reacción también con otras levaduras, *C. albicans* en este caso, como se puede apreciar en la figura 46B.

La tabla 25 muestra un resumen con los resultados de todas las pruebas realizadas al paciente diagnosticado con esclerosis múltiple.

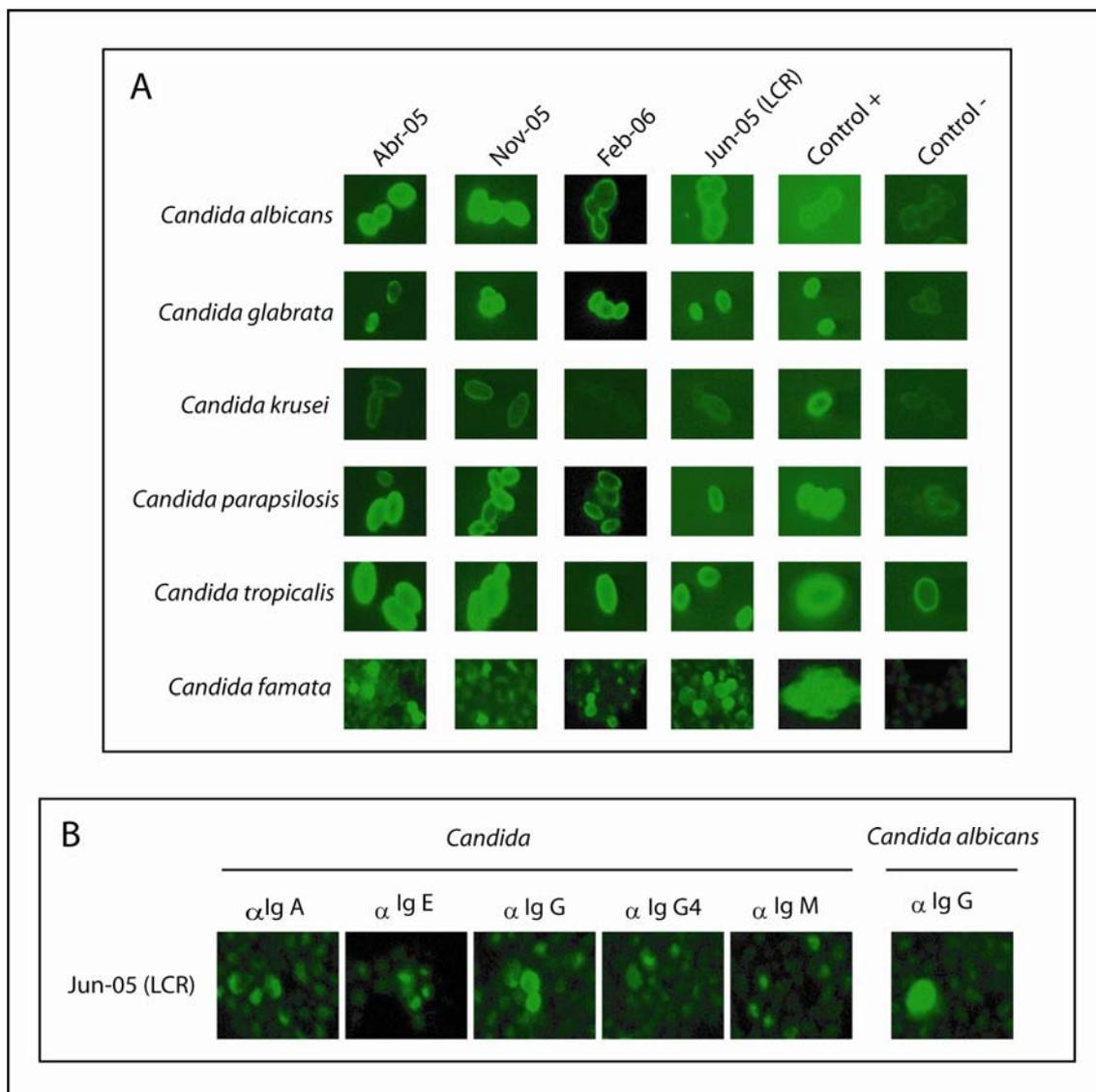


Figura 46. (A) Inmunodetección mediante fluorescencia de anticuerpos frente a diferentes levaduras: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. famata* en el suero del paciente (sólo se muestran las tres primeras fechas a modo de ejemplo) y (B) análisis de la tipología de las inmunoglobulinas presentes en el líquido cefalorraquídeo que reaccionan contra dicha levadura.

Tabla 24. Detección de anticuerpos en suero mediante inmunofluorescencia.

| Muestras | Levaduras | | | | | |
|------------|------------------|--------------------|------------------------|--------------------|----------------------|------------------|
| | <i>C. famata</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> | <i>C. glabrata</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>C. krusei</i> |
| Abr-05 | +++ | +++++ | +++ | + | +++++ | - |
| Nov-05 | +++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | - |
| Feb-06 | + | + | - | +++ | +++ | - |
| Mar-06 | + | - | - | - | ++ | - |
| Jun-06 | - | +++ | + | + | +++++ | - |
| jun-05 LCR | +++ | + | - | ++ | +++ | - |

Tabla 25. Resumen de las pruebas de diagnóstico realizadas al paciente con esclerosis múltiple (x: no realizado).

| Muestra | Enfermedad | Inmunofluorescencia | | | | | | % de Ag (1:500) | (1,3)- β -D-glucano (pg/ml) | PCR | | | | Secuenc. |
|------------|---------------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|-----------------------------------|-----|---------------|---------|---------------------------|-----------------------|
| | | <i>C.f</i> | <i>C.a</i> | <i>C.p</i> | <i>C.g</i> | <i>C.t</i> | <i>C.k</i> | | | ITS | β -glob | anidada | cuantitativa (genomas/ml) | |
| Abr-05 | Esclerosis múltiple | +++ | +++++ | +++ | + | +++++ | - | 42 | 236 | + | + | + | 55 | <i>R.mucilaginoso</i> |
| Nov-05 | Esclerosis múltiple | +++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | - | 83 | 188 | - | + | - | 223 | no secuenciable |
| Feb-06 | Esclerosis múltiple | + | + | - | +++ | +++ | - | 67 | 53 | - | + | - | - | x |
| Mar-06 | Esclerosis múltiple | + | - | - | - | ++ | - | 133 | 169 | + | + | + | 27 | no secuenciable |
| Jun-06 | Esclerosis múltiple | - | +++ | + | + | +++++ | - | 43 | x | x | x | x | x | x |
| jun-05 LCR | Esclerosis múltiple | +++ | + | - | ++ | +++ | - | 172 | x | - | - | - | - | x |

A continuación se inició el estudio de un grupo de 7 pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple, siguiendo el mismo procedimiento que con el paciente previamente analizado (tabla 26).

Tabla 26. Características de pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple: paciente, enfermedad, sexo, edad y sintomatología.

| Paciente | Enfermedad | Sexo | Edad (años) | Síntomas |
|----------|---------------------|-------|-------------|--------------------|
| E.M 1 | Esclerosis múltiple | mujer | 35 | Silla de ruedas |
| E.M 2 | Esclerosis múltiple | mujer | 28 | Problemas motrices |
| E.M 3 | Esclerosis múltiple | varón | 54 | Silla de ruedas |
| E.M 4 | Esclerosis múltiple | mujer | 40 | Vida normal |
| E.M 5 | Esclerosis múltiple | mujer | 50 | Silla de ruedas |
| E.M 6 | Esclerosis múltiple | mujer | 51 | Problemas motrices |
| E.M 7 | Esclerosis múltiple | mujer | 22 | Silla de ruedas |

Tras la obtención de las muestras sanguíneas, el primer paso consistió en analizar la presencia de ADN fúngico en las muestras mediante las 5 técnicas diferentes de PCR. Por otra parte, el suero fue utilizado para detectar presencia de antígenos de *Candida* y otras levaduras mediante dot-blot, (1,3)- β -D-glucanos mediante el kit *Fungitell* y anticuerpos anti-*Candida* mediante inmunofluorescencia.

Tabla 27. Detección de ADN fúngico en muestras de sangre mediante PCR simple, PCR anidada y PCR-Q (x: no realizado).

| Muestras | PCR ITS | PCR β -glob | PCR anidada | PCR cuantitativa (genomas/ml) | Secuenciación |
|----------|---------|-------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------|
| E.M 1 | + | + | + | 54 | No secuenciable |
| E.M 2 | x | + | + | - | <i>D.hansenii</i> |
| E.M 3 | + | + | + | 17 | <i>R.mucilaginoso</i> |
| E.M 4 | - | + | + | 50 | No secuenciable |
| E.M 5 | - | + | - | 67 | <i>M.restricta</i> |
| E.M 6 | + | + | + | 71 | No secuenciable |
| E.M 7 | - | + | - | - | x |

En la tabla 27 se puede observar que con la PCR simple, realizada con los oligonucleótidos ITS, se detectó producto en 3 de las 6 muestras de sangre (50%), sin embargo, empleando la técnica de PCR anidada se amplificó producto en 5 de los 7 casos (71,4%). La secuenciación de las muestras que resultaron positivas en la PCR anidada, permitió concluir que en un 20% de estos casos el ADN amplificado pertenecía a *Rhodotorula mucilaginoso*, en un 20% a *Debaryomyces hansenii* y en un 20% a *Malassezia restricta*, mientras que el 40% de las muestras restantes no pudieron ser secuenciadas. La PCR cuantitativa reveló la presencia de ADN fúngico también en 5 de las 7 muestras analizadas (71,4%).

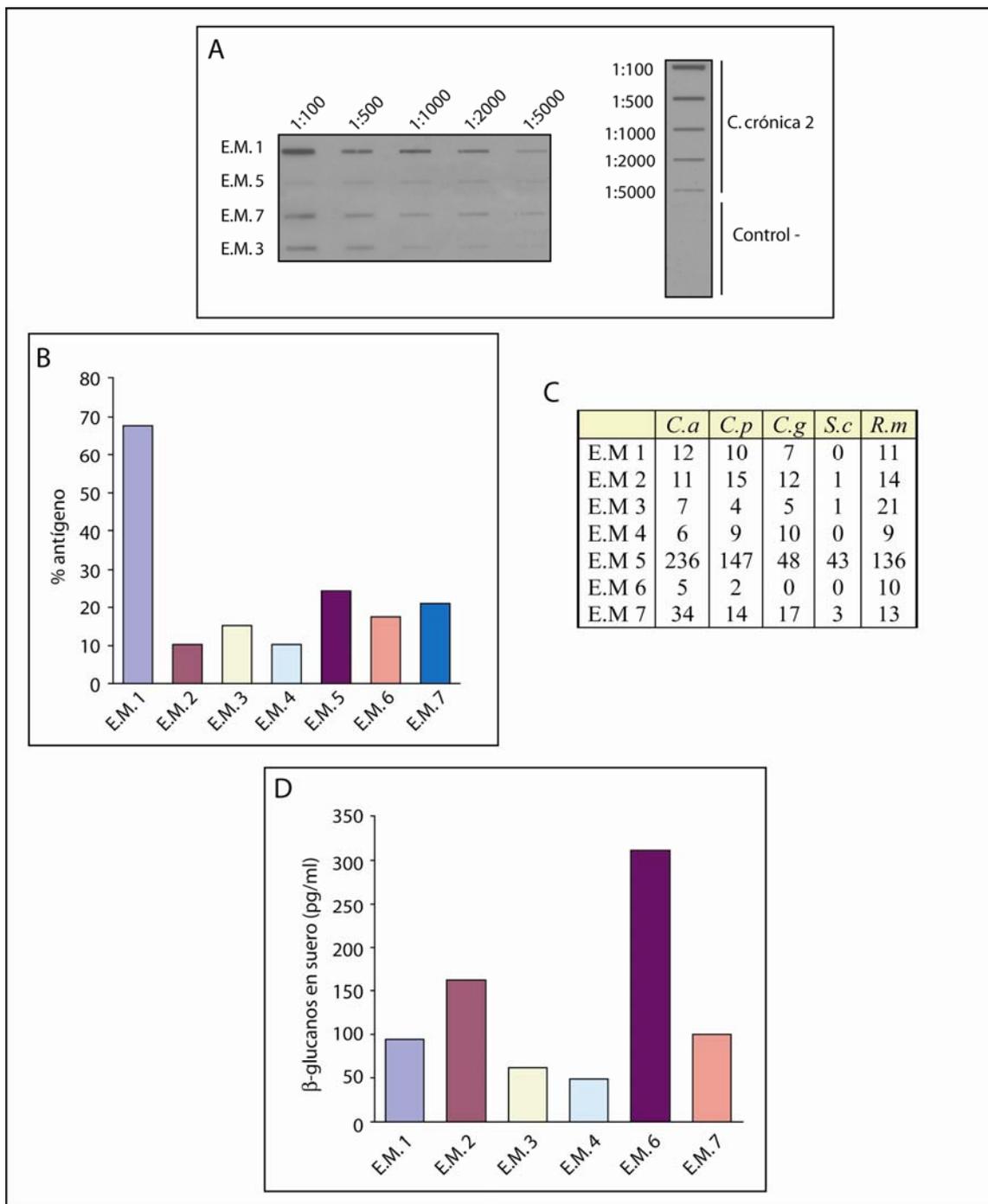


Figura 47. Detección de antígeno y β -glucanos en el suero del paciente. (A) Inmunodetección mediante dot-blot de antígenos fúngicos en sueros de diferentes pacientes empleando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo frente a *C. famata* (D21) (sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo). (B) Detección de antígeno fúngico mediante dot-blot empleando el anticuerpo D21, (C) antígenos detectados en suero que reaccionan con anticuerpos fabricados frente a diferentes especies de levadura: *C.a*: *C. albicans*, *C.p*: *C. parapsilosis*, *C.g*: *C. glabrata*, *S.c*: *S. cerevisiae*, *R.m*: *R. mucilaginosa* y (D) detección de (1,3)- β -D-glucanos mediante el kit *Fungitell* en los sueros de los pacientes.

En la inmunodetección de antígenos fúngicos mediante dot-blot empleando el anticuerpo D21 (anti-*C. famata*) (figura 47A y 47B), sólo se observó presencia de estos componentes fúngicos en uno de los pacientes (paciente número 1). Sin embargo, en el paciente número 5 se observaron niveles medio/alto de antígenos que reaccionaban con el resto de anticuerpos empleados (D43, D46, D51, D34 y D40) y en el paciente número 7 se detectaron niveles bajos de antígenos que reaccionaban con el anticuerpo D36 (anti-*C. albicans*) (figura 47C). Por otro lado, en el análisis de presencia de (1,3)- β -D-glucanos en las muestras de suero de los pacientes empleando el kit *Fungitell*, se observaron niveles elevados de este polisacárido en 4 de los pacientes analizados (66,6%) (figura 47D).

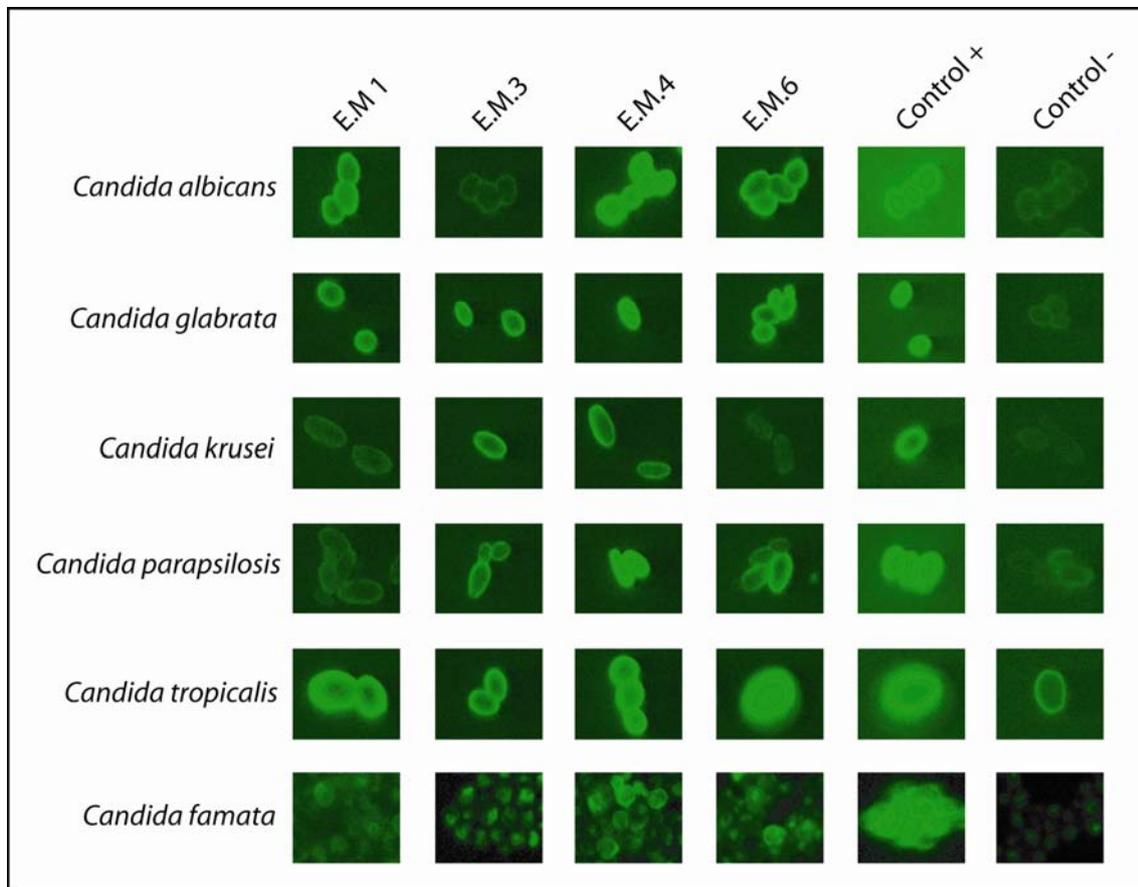


Figura 48. Inmunodetección mediante fluorescencia de anticuerpos frente a diferentes levaduras: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. famata* en sueros de diferentes pacientes (sólo se muestran algunos casos a modo de ejemplo).

Tabla 28. Detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia.

| Muestras | Levaduras | | | | | |
|----------|------------------|--------------------|------------------------|--------------------|----------------------|------------------|
| | <i>C. famata</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> | <i>C. glabrata</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>C. krusei</i> |
| E.M 1 | ++ | ++++ | - | +++ | +++++ | - |
| E.M 2 | + | +++ | - | ++ | ++++ | - |
| E.M 3 | - | - | - | +++ | +++ | + |
| E.M 4 | + | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | ++ |
| E.M 5 | + | + | + | + | + | - |
| E.M 6 | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++++ | - |
| E.M 7 | - | - | - | - | - | - |

Finalmente, en la inmunofluorescencia se obtuvieron niveles elevados de anticuerpo en suero frente a una gran fracción de las levaduras ensayadas en 4 de los pacientes (57,14%), una de las muestras (14,2%) presentó niveles bajos reaccionando únicamente con dos de las levaduras testadas, y dos (el 28,57%) resultaron ser negativas en cuanto a presencia de anticuerpos en suero frente a las levaduras ensayadas (figura 48 y tabla 28).

La siguiente tabla muestra un resumen con los resultados de todas las pruebas de diagnóstico realizadas a los pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple (tabla 29).

Tabla 29. Resumen de las pruebas de diagnóstico realizadas a los pacientes con esclerosis múltiple (x: no realizado).

| Muestra | Enferm. | Inmunofluorescencia | | | | | | % de Ag (1:500) | Ag (otras lev) | (1,3)- β -D-glucano (pg/ml) | PCR | | | | Secuenc. |
|---------|---------------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|--|-----------------------------------|-----|---------------|---------|-------------------------|-----------------------|
| | | <i>C.f</i> | <i>C.a</i> | <i>C.p</i> | <i>C.g</i> | <i>C.t</i> | <i>C.k</i> | | | | ITS | β -glob | anidada | Cuantitativa (genom/ml) | |
| E.M 1 | Esclerosis múltiple | ++ | ++++ | - | +++ | +++++ | - | 68 | - | 95 | - | + | + | 54 | no secuenciable |
| E.M 2 | Esclerosis múltiple | + | +++ | - | ++ | ++++ | - | 10 | - | 162 | x | + | + | - | <i>D.hansenii</i> |
| E.M 3 | Esclerosis múltiple | - | - | - | +++ | +++ | + | 15 | - | 62 | - | + | + | 17 | <i>R.mucilaginoso</i> |
| E.M 4 | Esclerosis múltiple | + | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | ++ | 10 | - | 48 | - | + | + | 50 | no secuenciable |
| E.M 5 | Esclerosis múltiple | + | + | + | + | + | - | 24 | <i>C.a,</i> <i>C.p,</i> <i>C.g,</i> <i>S.c,</i> <i>R.m</i> | x | - | + | + | 67 | <i>M. restricta</i> |
| E.M 6 | Esclerosis múltiple | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++++ | - | 17 | - | 312 | - | + | - | 1,6 | x |
| E.M 7 | Esclerosis múltiple | - | - | - | - | - | - | 21 | <i>C.a</i> | 100 | - | + | - | - | x |

6. Relación entre distintos tipos de enfermedades y presencia de hongo en los individuos que las padecen

Empleando los datos obtenidos en el presente estudio, mostrados anteriormente, se ha realizado un análisis estadístico con el objetivo de verificar la existencia o no de relaciones estadísticamente significativas, entre los datos obtenidos con cada una de las técnicas de diagnóstico empleadas y los individuos pertenecientes a los diferentes grupos considerados, tal como se describe en Materiales y Métodos.

6.1. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a *C. albicans*

A continuación se presenta la tabla de contingencia con las frecuencias observadas (recuento) en el caso de la variable “presencia de anticuerpos frente a *C. albicans* en suero” de los diferentes grupos estudiados:

Tabla 30. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a *Candida albicans* en suero. (-)=presencia de Ac frente a *C. albicans* no detectable; (+)=presencia de Ac frente a *C. albicans* baja; (++)=presencia de Ac frente a *C. albicans* media; y (+++)=presencia de Ac frente a *C. albicans* alta.

| | | | Anticuerpos frente a <i>C.albicans</i> | | | | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|----------|--|--------|---|-------|----|-------|-----|-------|
| | | | - | | + | | ++ | | +++ | |
| | | | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Enfermedad | control (-) lab N= 8 | Recuento | 4 | 50,0% | 1 | 12,5% | 2 | 25,0% | 1 | 12,5% |
| | control (-) N= 12 | Recuento | 12 | 100,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| | control + N=2 | Recuento | 2 | 100,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| | ΔZOOOR N=5 | Recuento | 2 | 40,0% | 0 | 0,0% | 1 | 20,0% | 2 | 40,0% |
| | Coroidopatía serpiginosa N=5 | Recuento | 1 | 20,0% | 0 | 0,0% | 2 | 40,0% | 2 | 40,0% |
| | Coroiditis multifocal N=5 | Recuento | 3 | 60,0% | 1 | 20,0% | 1 | 20,0% | 0 | 0,0% |
| | Esclerosis múltiple N=7 | Recuento | 2 | 28,6% | 1 | 14,3% | 1 | 14,3% | 3 | 42,9% |
| Asociación lineal por lineal | | | $\chi^2 = 5.44$ g.l.= 1 p= .020 | | | | | | | |

En la tabla 30 se aprecia la existencia de diferencias significativas en cuanto a la presencia de anticuerpos frente a *C. albicans* en suero, observándose en los casos de esclerosis múltiple y

AZOOOR un mayor porcentaje de individuos con un título elevado de anticuerpos (+++). Por el contrario los dos grupos de controles negativos, especialmente en el de no expuestos, y los controles positivos presentan un porcentaje muy reducido de individuos en los que se han detectado anticuerpos frente a esta levadura. Se observa que $p \leq 0.05$, lo que indica no sólo la existencia de una relación entre la variable “presencia de anticuerpos frente a *C. albicans* en suero” y las enfermedades estudiadas, sino que además dicha relación no se debe al azar.

6.2. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a *C. glabrata*

De manera similar a lo realizado con la variable anterior, a continuación se presenta la tabla de contingencia con las frecuencias observadas en el caso de la variable “presencia de anticuerpos frente a *C. glabrata* en suero” de los diferentes grupos estudiados:

Tabla 31. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a *Candida glabrata* en suero. (-)=presencia de Ac frente a *C. glabrata* no detectable; (+)=presencia de Ac frente a *C. glabrata* baja; (++)=presencia de Ac frente a *C. glabrata* media; y (+++)=presencia de Ac frente a *C. glabrata* alta.

| | | | Anticuerpos frente a <i>C. glabrata</i> | | | | | | | |
|------------------------------------|--|----------|---|-------|---|-------|----|-------|-----|-------|
| | | | - | | + | | ++ | | +++ | |
| | | | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Enfermedad | control (-) lab N= 8 | Recuento | 5 | 62,5% | 1 | 12,5% | 1 | 12,5% | 1 | 12,5% |
| | control (-) N= 12 | Recuento | 8 | 66,7% | 2 | 16,7% | 2 | 16,7% | 0 | 0,0% |
| | control + N=2 | Recuento | 1 | 50,0% | 0 | 0,0% | 1 | 50,0% | 0 | 0,0% |
| | AZOOOR N=5 | Recuento | 2 | 40,0% | 1 | 20,0% | 0 | 0,0% | 2 | 40,0% |
| | Coroidopatía serpiginosa N=6 | Recuento | 1 | 20,0% | 1 | 20,0% | 1 | 20,0% | 2 | 40,0% |
| | Coroiditis multifocal N=4 | Recuento | 2 | 40,0% | 1 | 20,0% | 2 | 40,0% | 0 | 0,0% |
| | Esclerosis múltiple N=7 | Recuento | 1 | 14,3% | 1 | 42,9% | 3 | 42,9% | 2 | 28,6% |
| Asociación lineal por lineal | $\chi^2 = 6.18$ g.l.= 1 $p = .013$ | | | | | | | | | |

De manera comparable a la presencia de anticuerpos frente a *C. albicans*, en este caso también existen diferencias significativas en cuanto a la presencia de anticuerpos frente a *C. glabrata* en suero (tabla 31). De nuevo en los grupos AZOOOR y esclerosis múltiple,

además del grupo coroidopatía serpiginosa, hay un mayor porcentaje de individuos con un título elevado de anticuerpos frente a esta levadura. Por el contrario, los dos grupos de controles negativos y el grupo de controles positivos presentan un porcentaje muy reducido de individuos en los que se han detectado cantidades significativas de anticuerpos frente a *C. glabrata*. Se observa de nuevo que $p \leq 0.05$, lo que indica que la relación entre presencia de anticuerpos anti-*C. glabrata* y enfermedades no se debe al azar.

6.3. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a *C. tropicalis*

Tabla 32. Relación entre enfermedades y presencia de anticuerpos frente a *Candida tropicalis* en suero. (-)=presencia de Ac frente a *C. tropicalis* no detectable; (+)=presencia de Ac frente a *C. tropicalis* baja; (++)=presencia de Ac frente a *C. tropicalis* media; y (+++)=presencia de Ac frente a *C. tropicalis* alta.

| | | | Anticuerpos frente a <i>C. tropicalis</i> | | | | | | | |
|------------------------------------|--|----------|---|-------|---|-------|----|-------|-----|-------|
| | | | - | | + | | ++ | | +++ | |
| | | | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Enfermedad | control (-) lab N= 8 | Recuento | 3 | 37,5% | 2 | 25,0% | 2 | 25,0% | 1 | 12,5% |
| | control (-) N= 12 | Recuento | 4 | 33,3% | 4 | 33,3% | 3 | 25,0% | 1 | 8,3% |
| | control + N=2 | Recuento | 1 | 50,0% | 0 | 0,0% | 1 | 50,0% | 0 | 0,0% |
| | AZOOR N=5 | Recuento | 0 | 0,0% | 1 | 20,0% | 1 | 20,0% | 3 | 60,0% |
| | Coroidopatía serpiginosa N=6 | Recuento | 0 | 0,0% | 1 | 20,0% | 1 | 20,0% | 3 | 60,0% |
| | Coroiditis multifocal N=4 | Recuento | 2 | 40,0% | 0 | 0,0% | 1 | 30,0% | 2 | 40,0% |
| | Esclerosis múltiple N=7 | Recuento | 1 | 14,3% | 1 | 14,3% | 1 | 14,3% | 4 | 57,1% |
| Asociación lineal por lineal | $\chi^2 = 5.70$ g.l.= 1 $p = .017$ | | | | | | | | | |

En la tabla 32 se observa que en los grupos AZOOR, coroidopatía serpiginosa, coroiditis multifocal y esclerosis múltiple, el número de individuos con niveles elevados de anticuerpos en suero (+++) es mayor que en el caso de los grupos controles negativos y controles positivos. De nuevo se comprueba a partir del valor de p , que la relación entre anticuerpos frente a *C. tropicalis* y enfermedades no es aleatoria.

Los resultados obtenidos en los análisis estadísticos realizados hasta el momento permiten concluir que los grupos de pacientes con AZOOR, coroidopatía serpiginosa y esclerosis múltiple muestran, en general, un elevado porcentaje de individuos con niveles altos de

anticuerpos en suero frente a *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Por el contrario, un aspecto destacable lo constituye el hecho de que los controles negativos no expuestos presentan un porcentaje muy reducido de individuos en los que se han detectado anticuerpos frente a las levaduras ensayadas. En todos los casos se ha encontrado una relación no aleatoria entre las variables “presencia de anticuerpos frente a *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* en suero” y las enfermedades estudiadas.

6.4. Relación entre enfermedades y presencia de ADN fúngico en sangre

Para realizar el estudio estadístico que permite analizar la posible relación entre enfermedades y presencia de ADN fúngico en sangre, se emplearon los resultados de dos de las técnicas empleadas en este trabajo, PCR anidada y PCR cuantitativa o a tiempo real.

En primer lugar, y empleando los resultados obtenidos con la técnica de PCR anidada, se presenta a continuación la tabla de contingencia con las frecuencias observadas (recuento) en el caso de la variable “presencia de ADN fúngico en sangre mediante la técnica de PCR anidada” de los diferentes grupos estudiados:

Tabla 33. Relación entre enfermedades y presencia de ADN fúngico en sangre (técnica de PCR anidada). (+)=PCR anidada positiva y (-)=PCR anidada negativa

| | | | Presencia de ADN fúngico en sangre (PCR anidada) | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------|--|--------|---|--------|
| | | | - | | + | |
| | | | N | % | N | % |
| Enfermedad | control (-) lab N= 8 | Recuento | 7 | 87,5% | 1 | 12,5% |
| | control (-) N= 12 | Recuento | 12 | 100,0% | 0 | 0,0% |
| | control + N=2 | Recuento | 0 | 0,0% | 2 | 100,0% |
| | AZOOOR N=5 | Recuento | 4 | 80,0% | 1 | 20,0% |
| | Coroidopatía serpiginosa N=6 | Recuento | 4 | 80,0% | 1 | 20,0% |
| | Coroiditis multifocal N=4 | Recuento | 5 | 100,0% | 0 | 0,0% |
| | Esclerosis múltiple N=7 | Recuento | 2 | 28,6% | 5 | 71,4% |
| Asociación lineal por lineal | $\chi^2 = 5.44$ g.l.= 1 p= .020 | | | | | |

Los datos de la tabla 33 muestran diferencias significativas entre los grupos estudiados, en cuanto a la presencia de ADN fúngico en sangre, observándose en el grupo de controles positivos y de esclerosis múltiple un mayor porcentaje de individuos con ADN fúngico en sangre (PCR positiva), que en el resto. Por el contrario, los dos grupos de controles negativos y los tres grupos de enfermedades oculares (AZOOR, coroidopatía serpiginosa y coroiditis multifocal) presentan un reducido porcentaje de individuos con ADN fúngico en sangre (PCR positiva).

De la misma forma, pero empleando en este caso los resultados obtenidos con la técnica de PCR cuantitativa o PCR a tiempo real, se presenta a continuación la tabla de contingencia con las frecuencias observadas (recuento) en el caso de la variable “presencia de ADN fúngico en sangre mediante la técnica de PCR cuantitativa” de los diferentes grupos estudiados:

Tabla 34. Relación entre enfermedades y presencia de ADN fúngico en sangre (técnica de PCR cuantitativa). (+)=PCR-Q positiva y (-)=PCR-Q negativa

| | | | Presencia de ADN fúngico en sangre (PCR cuantitativa) | | | |
|-------------------|-------------------------------------|----------|---|--------------------------------------|---|--------|
| | | | - | | + | |
| | | | N | % | N | % |
| Enfermedad | control (-) expuesto N= 8 | Recuento | 7 | 87,5% | 1 | 12,5% |
| | control (-) no expuesto N= 12 | Recuento | 9 | 75,0% | 3 | 25,0% |
| | control + N=2 | Recuento | 0 | 0,0% | 2 | 100,0% |
| | AZOOR N=5 | Recuento | 4 | 80,0% | 1 | 20,0% |
| | Coroidopatía serpiginosa N=6 | Recuento | 1 | 20,0% | 4 | 80,0% |
| | Coroiditis multifocal N=4 | Recuento | 4 | 80,0% | 1 | 20,0% |
| | Esclerosis múltiple N=7 | Recuento | 2 | 28,6% | 5 | 71,4% |
| | Asociación lineal por lineal | | | $\chi= 4.76$ g.l.= 1 $p= .029$ | | |

De forma similar a lo ocurrido en el caso de la PCR anidada, después de analizar los datos obtenidos para la variable “presencia de ADN fúngico en sangre” empleando la técnica de PCR cuantitativa (tabla 34), se observa que los grupos coroidopatía serpiginosa y esclerosis

múltiple, de igual forma que el grupo control positivo, tienen un porcentaje de individuos con PCR positiva mayor que el resto. Por el contrario los dos grupos de controles negativos y los grupos AZOOR y coroiditis multifocal presentan un reducido porcentaje de individuos con ADN fúngico en sangre (PCR +).

Los resultados obtenidos en los análisis estadísticos en los que se ha empleado como variable “presencia de ADN fúngico en sangre” empleando PCR anidada y PCR cuantitativa, permiten concluir que el grupo de pacientes con coroidopatía serpigínea y especialmente los grupos de esclerosis múltiple y control positivo, muestran un elevado porcentaje de individuos con ADN fúngico en sangre (PCR positiva). Por el contrario, los controles negativos y los grupos AZOOR y coroiditis multifocal presentan un porcentaje reducido de individuos en los que se ha detectado ADN fúngico en sangre. Además, como se puede observar en las tablas 33 y 34 en ambos casos $p \leq 0.05$. Esto indica, no sólo que existe una relación entre la variable “presencia de ADN fúngico en sangre” y las enfermedades estudiadas, sino que además dicha relación no se debe al azar.

El análisis estadístico realizado empleando las muestras de pacientes con diferentes enfermedades y los resultados obtenidos para cada una de ellas mediante las diferentes técnicas de diagnóstico, plantean la posibilidad de la existencia de una posible relación entre las enfermedades estudiadas en este trabajo y la presencia de componentes fúngicos en muestras biológicas de los individuos que las padecen. En cualquier caso, el número de pacientes estudiado es muy reducido y por tanto, para poder confirmar estos resultados sería necesario realizar un mayor número de ensayos, partiendo de una muestra más amplia de pacientes que permitiera realizar un análisis estadístico aún más preciso y concluyente.

DISCUSIÓN

1. Sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCR

El diagnóstico de las infecciones fúngicas diseminadas resulta difícil debido a la inespecificidad de los síntomas clínicos que presentan y a que el cultivo, la técnica convencional de identificación de hongos, requiere la presencia de organismos viables en las muestras biológicas (sangre, fluidos corporales, etc.) que se vayan a testar (Ellepola and Morrison, 2005; Rand *et al*, 1994). Además, se precisan varios días e incluso semanas para realizar el diagnóstico a través de la técnica del cultivo (Castro, 2001). Por esta razón, la búsqueda de técnicas más sensibles y específicas que permitan una identificación temprana de la infección se ha convertido en objetivo prioritario en el diagnóstico fúngico. En los últimos años han despertado un especial interés las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos fúngicos en muestras biológicas debido a la elevada sensibilidad y especificidad que presentan (Chen *et al*, 2002; Ellepola and Morrison, 2005; Reiss *et al*, 2000; Yeo and Wong, 2002).

En este estudio se ha descrito el desarrollo de un método, basado en la detección de ADN fúngico en distintos tipos de muestras (sangre, líquido cefalorraquídeo, exudados conjuntivales, etc.) para su aplicación en diagnóstico clínico. La optimización de las

condiciones para cada tipo de muestra ha permitido obtener resultados muy satisfactorios, principalmente en el análisis de muestras de sangre, donde el empleo de las técnicas de PCR anidada y PCR-Q han permitido establecer el límite de detección en 1 genoma (20 fg de ADN fúngico/reacción de PCR). Esta sensibilidad es muy superior a la obtenida en la mayoría de los estudios publicados (100fg) (Flahaut *et al*, 1998; Fujita, 1995; Khan and Mustafa, 2001; Pryce *et al*, 2003). Aunque hay grupos, como Einsele y colaboradores, (Einsele *et al*, 1997; Rand *et al*, 1994) que han obtenido una sensibilidad del mismo orden, el método utilizado por ellos presenta dos grandes desventajas como son su complejidad y restricción en la detección de especies que no se dan en nuestro sistema. Por tanto nuestros resultados son de gran interés clínico debido a que los pacientes con infecciones sistémicas causadas por hongos suelen presentar niveles bajos de levadura/hongo en sangre encontrándose frecuentemente entre 1 y 100 ufc/ml (Reiss and Morrison, 1993).

Además de la sensibilidad del método, otro de los factores limitantes para el diagnóstico de las enfermedades causadas por hongos, es la capacidad de dicho método para la determinación de la especie fúngica causante de la infección. Esto adquiere especial importancia en el tratamiento de un paciente con fungemia puesto que la administración del fármaco más eficaz variará en función de la especie causante de la infección, debido fundamentalmente a las resistencias que presentan ciertos hongos a los compuestos antifúngicos, como es el caso de *C. glabrata* o *C. krusei* al fluconazol (Bretagne and Costa, 2005). Hasta el momento, la mayoría de los métodos ensayados para identificar la especie, incluyen el empleo de enzimas de restricción tras la amplificación de segmentos de diferentes genes; la utilización de diferentes oligonucleótidos, por lo general, específicos de género en una primera PCR y específicos de especie en una segunda; o de sondas específicas para cada especie (Einsele *et al*, 1997; Guiver *et al*, 2001; Imhof *et al*, 2003; Jaeger *et al*, 2000; Kamiya *et al*, 2005; Kanbe *et al*, 2002; Khan and Mustafa, 2001; Okhravi *et al*, 1998; Pryce *et al*, 2003). Estos métodos, generalmente no son capaces de detectar todas las especies fúngicas de interés clínico, diferenciando en el mejor de los casos descritos, un máximo de 11 especies (Einsele *et al*, 1997). El método desarrollado en este trabajo se caracteriza por la sencillez y rapidez de las técnicas empleadas para realizar el diagnóstico. A ello se suma la ventaja adicional de que todos los cebadores utilizados son universales para los hongos, lo que permite la amplificación de cualquier especie fúngica además de la determinación del organismo causante de la infección mediante secuenciación.

Durante la realización de todos los ensayos clínicos, tanto en pacientes con distintas enfermedades oculares como en pacientes con esclerosis múltiple, se ha observado que la PCR cualitativa funciona muy bien para identificar especies partiendo de cultivos puros. Sin embargo, tiene el inconveniente de que al examinar muestras complejas donde la mayoría del ADN es humano, la cantidad de ADN fúngico amplificado a veces no es suficiente para realizar una secuenciación. En el caso de la PCR cuantitativa, se ha observado que es una técnica muy fiable para determinar el número de genomas existentes en una muestra pero no para la determinación de la especie. Por esta razón, se debe seguir profundizando en este punto en investigaciones posteriores.

2. Sensibilidad y especificidad de la técnica de dot-blot

Además de las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos, en los últimos años también se han desarrollado otras técnicas de diagnóstico de infecciones fúngicas como la detección de antígenos, componentes no antigénicos y anticuerpos frente a hongos en muestras biológicas. Se ha comprobado en múltiples ocasiones, que la combinación de varias de estas pruebas supera las deficiencias de cada técnica individual porque se aumenta la sensibilidad y especificidad de las mismas (Ellepolá and Morrison, 2005; Pontón, 2006; Quindos *et al*, 2004). En este caso, la detección de antígenos mediante dot-blot presenta la ventaja de diferenciar entre una colonización y una infección. La presencia de abundantes levaduras en mucosas donde *Candida* es un habitante normal, hace que con facilidad la colonización se extienda a sangre mediante el fenómeno de translocación, y un método tan sensible como la PCR puede detectar en sangre ADN de levaduras procedentes de la colonización de mucosas (Colom, 2006; Yeo and Wong, 2002).

Cierto es que en la literatura se aconseja la no utilización de anticuerpos policlonales para la detección de antígenos debido a la reactividad cruzada que suelen presentar con otras levaduras (Yeo and Wong, 2002). Esto es lo que efectivamente ha ocurrido con los anticuerpos desarrollados en el laboratorio contra las diferentes especies de levadura: anti-*C. famata* (D21), anti-*C. parapsilosis* (D43), anti-*C. albicans* (D36), anti-*C. glabrata* (D51), anti-*S. cerevisiae* (D34) y anti-*R. mucilaginosa* (D40)

En este caso, esta característica no supone un problema puesto que el objetivo de esta técnica es detectar la presencia de antígenos fúngicos en muestras biológicas de un determinado paciente independientemente de la especie fúngica a la que pertenezcan. Sin

embargo, es fundamental que la técnica posea una sensibilidad elevada puesto que, generalmente la cantidad de antígeno en suero no es muy alta debido entre otras causas a que es rápidamente eliminado del torrente circulatorio (Yeo and Wong, 2002). En relación a la sensibilidad, se pudo comprobar mediante inmunomicroscopía electrónica que el D21 reacciona con una afinidad muy elevada contra la membrana celular fúngica ya que dicho anticuerpo tuvo que emplearse 100 veces más diluido de lo que es habitual para esta técnica. La afinidad del anticuerpo se reconfirmó cuando se advirtió que en dot-blot era capaz de poner de manifiesto cantidades de proteína fúngica que se encontraban en el rango femtomolar. Este dato resulta especialmente relevante si se tiene en cuenta, que la sensibilidad de la mayoría de las técnicas diseñadas para detectar antígenos fúngicos en muestras clínicas se sitúa en el rango nanomolar o picomolar (Mitsutake *et al*, 1996; Reboli, 1993; Walsh *et al*, 1991).

El diagnóstico se complementó con la detección de (1,3)- β -D-glucanos (componentes de la pared celular fúngica) y de anticuerpos frente a hongos en el suero de los pacientes mediante el *kit Fungitell* e inmunofluorescencia respectivamente.

Un dato importante a destacar de todas las técnicas empleadas en esta Tesis doctoral para la realización de un diagnóstico, es que no se precisa de técnicas invasivas para la obtención de las muestras que se van a analizar. Con un simple análisis de sangre es suficiente para poder aplicar todas las técnicas anteriormente citadas por tanto, se evitan riesgos innecesarios y situaciones incómodas a los pacientes.

3. Aplicación de los diversos métodos diagnósticos desarrollados en este trabajo en pacientes afectados de candidiasis crónica

A partir de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas empleadas, se trató de comprobar la validez de las mismas intentando poner de manifiesto la presencia de componentes fúngicos en pacientes diagnosticados de candidiasis crónica. Las pruebas indican efectivamente, presencia de hongo en estos pacientes. Ciertamente es que no se encontraron anticuerpos frente a levadura en suero en ninguno de estos casos pero este dato no es significativo porque normalmente la presencia de antígenos y anticuerpos en suero no suele ser simultánea (Ellepola and Morrison, 2005). En el caso de los controles negativos, aunque varios individuos dieron positivo en alguna de las pruebas, en la mayoría de los casos resultó ser en las pruebas realizadas para detectar la presencia de anticuerpos

frente a levadura. Este dato tampoco es significativo puesto que puede indicar simplemente una exposición a estos microorganismos, ya que los hongos son ubicuos y se pueden encontrar en la piel, en el intestino o en cualquier ambiente. Por esta misma razón, la presencia de anticuerpos en los pacientes sólo se pudo tener en cuenta para un posible diagnóstico, si el resto de pruebas, o la mayoría de ellas, resultaban positivas.

Respecto a la prueba de detección de (1,3)- β -D-glucanos, el hecho de que todas las muestras testadas fueran positivas puede deberse a la continua exposición del grupo **C- expuesto** a levaduras, aunque se necesitaría realizar un estudio más profundo. En cualquier caso, el resultado se debe corroborar y/o complementar con los resultados obtenidos en las demás pruebas diagnósticas realizadas, tal como recomienda el proveedor.

Tras comprobar la validez de todos los métodos desarrollados en esta Tesis en el diagnóstico de infecciones fúngicas en muestras clínicas, se puede afirmar que la detección de ácidos nucleicos mediante PCR, especialmente la PCR anidada y la PCR-Q, y el dot-blot parecen ser las técnicas más fiables para la realización de un diagnóstico por sí solas, si bien la combinación de varias pruebas es muy útil para superar las deficiencias de cada prueba individual (Ellepola and Morrison, 2005; Pontón, 2006; Quindos *et al*, 2004). Por tanto, una vez realizado este primer estudio, se decidió considerar como positivos a los pacientes cuyas muestras dieran resultados positivos en varias de las pruebas a las que fueron sometidas, siempre que una de ellas fuese PCR o dot-blot.

4. Presencia de componentes fúngicos en sangre y suero en pacientes con enfermedades oculares o esclerosis múltiple

Algunas enfermedades raras, presentan características comunes como son la cronicidad y la recurrencia en brotes (Gass *et al*, 2002; Jampol and Wiredu, 1995; Lucchinetti *et al*, 2005). Entre estas enfermedades se encuentran el AZOOR y la esclerosis múltiple. En muchas publicaciones se ha sugerido la posibilidad de que sea un microorganismo el agente causante de dichas afecciones (Barnett and Sutton, 2006; Gass, 1993; Gass, 2003; Gass *et al*, 2002; Gilden, 2005; Giovannoni *et al*, 2006; Kantarci and Wingerchuk, 2006; Priya *et al*, 2002; Rudich *et al*, 2003; Scheider, 1993; Spaide *et al*, 1991; Tiedeman, 1987; Vandenbelt *et al*, 2003). En este trabajo hemos planteado la hipótesis de que ese microorganismo causante sea un hongo, a razón de una serie de similitudes en las características patológicas que muestran las infecciones fúngicas y las enfermedades anteriormente mencionadas. La mayoría de los hongos cuando colonizan los tejidos, provocan un aumento de la respuesta

proinflamatoria del hospedador que podría corresponderse con los brotes de inflamación que caracterizan al AZOOR y la esclerosis múltiple (Villar *et al*, 2005). Por otro lado, uno de los factores de virulencia que poseen las levaduras, consiste en rodearse de un ambiente mucoso que les facilita el crecimiento en biopelículas. Estas agrupaciones les ayudan a evadir el sistema inmune y les hace resistentes a los compuestos antifúngicos (Cerikcioglu *et al*, 2004). Además, algunas levaduras en ciertas condiciones tienden a producir calcificaciones (Ennever and Summers, 1975). Esto podría corresponderse con la calcificación de los axones que se produce tras un proceso de inflamación y desmielinización en las lesiones cerebrales características en los pacientes de esclerosis múltiple (Frohman *et al*, 2006).

Por tanto, debido a las similitudes en cuanto a brotes, depósitos de calcio y su naturaleza inflamatoria, se pensó en la existencia de una posible relación entre algunas enfermedades raras (AZOOR, coroiditis multifocal, corioidopatía serpiginosa y esclerosis múltiple) y ciertos hongos (Hintzen and van den Born, 2006).

4.1. Enfermedades oculares (AZOOR, corioidopatía serpiginosa o coroiditis multifocal) y hongos

El AZOOR se caracteriza por una pérdida progresiva en la función retiniana. Se ha especulado mucho sobre su etiología y recientemente se ha descrito que su origen podría ser fúngico (Carrasco *et al*, 2005). En este trabajo, el primer caso estudiado lo constituye un paciente diagnosticado hace 10 años con esta enfermedad. Se ha realizado un seguimiento de la presencia de antígenos en suero y de la respuesta humoral del paciente desde 1996 hasta junio de 2006. Para ello se ha tenido en cuenta que dicho paciente se ha sometido a diferentes tratamientos antifúngicos entre noviembre de 1999 y junio de 2006.

En primer lugar, el hecho de que la presencia de células de candida viables en los cultivos del paciente fuera muy escasa, sólo en dos de las diez muestras de sangre (años 1996 y 1997) se observó crecimiento de levadura (datos no mostrados), no elimina la posibilidad de infección fúngica. Como ya se ha comentado en diversas ocasiones, la técnica del cultivo posee una sensibilidad muy baja (50%) (Colom, 2006; Reiss and Morrison, 1993). Por otro lado, tanto la detección de ADN fúngico en sangre como la detección de antígeno (empleando el anticuerpo D21) en suero revelaron una elevada presencia de ambos componentes en la sangre del paciente en las muestras tomadas en los primeros años del estudio. Ambos componentes fueron disminuyendo progresivamente en muestras

posteriores, seguramente debido a los efectos de los tratamientos antifúngicos a los que estaba sometido el paciente. Sin embargo, tanto en junio de 2005 como en marzo de 2006, se observó un incremento de ADN y antígeno fúngico respectivamente en las muestras del paciente. El primer pico coincide con la finalización de un tratamiento con el antifúngico caspofungina al que había estado sometido el paciente durante veinte días (el paciente contenía en sangre cantidades elevadas de dicho compuesto antifúngico [datos no mostrados]). Este antifúngico actúa inhibiendo la síntesis de (1,3)- β -D-glucano, componente clave de la pared de la célula fúngica, produciendo inestabilidad osmótica y muerte celular, lo que provocaría una liberación del material genético y otros componentes (Carrillo-Munoz *et al*, 2006).

El aumento de antígeno observado en marzo de 2006 se corresponde con el período en el que el paciente comienza un nuevo tratamiento con voriconazol, pudiendo ser esta la explicación de dicho aumento, debido al efecto del antifúngico sobre la levadura. El voriconazol, al igual que el resto de los azoles, inhibe el sistema citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación la enzima C-14- α -demetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios y aumenta la permeabilidad de la membrana, lo que puede dar lugar a la salida de diversos componentes celulares de la levadura (Carrillo-Munoz *et al*, 2006).

La presencia de antígenos pertenecientes a otras especies de levadura en las muestras del paciente, puede deberse a la existencia de una infección fúngica mixta o a la reacción cruzada que poseen los diferentes anticuerpos empleados, puesto que cuando la concentración de antígeno de *C. famata* es muy elevada dicho antígeno es capaz de reaccionar con la mayoría de los anticuerpos testados. Otro dato que apoya la hipótesis de reactividad cruzada es el hecho de que todos los antígenos detectados disminuyan con el tiempo a partir del momento en que el paciente comienza con la toma de compuestos antifúngicos. Como ya se ha comentado anteriormente, no todas las especies de levadura reaccionan por igual a los distintos antifúngicos existentes. En este caso el paciente poseía antígenos que reaccionaban con anticuerpos fabricados frente *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *R. mucilaginosa* y por ejemplo las especies de *Rhodotorula* son resistentes a la mayoría de los azoles.

De manera similar a las pruebas anteriores, el test *Fungitell* resultó ser positivo en todas las muestras del paciente hasta abril de 2005, fecha en que inició el tratamiento con el

antifúngico caspofungina y en la que comenzó a observarse una disminución progresiva de β -glucanos en suero, hasta desaparecer en marzo de 2006 coincidiendo con el momento en que el paciente comenzó su nuevo tratamiento con voriconazol. Por otro lado, se observó que el título de anticuerpos del paciente que reaccionaban frente a *C. famata* fue incrementándose hasta 1999. Tras la administración de los tratamientos antifúngicos se observó una clara disminución de los mismos, manteniéndose en la actualidad. Sin embargo, no se observó presencia de anticuerpos que reaccionaran frente a otras especies de levadura, con la excepción de *C. tropicalis*, sugiriendo que los anticuerpos del paciente son específicos frente a la levadura *C. famata* en el test de inmunofluorescencia. Este dato vuelve a apoyar la teoría de la reactividad cruzada de los anticuerpos empleados para la detección de antígenos fúngicos.

Todos estos datos indican presencia de componentes fúngicos y anticuerpos frente a hongos en el torrente circulatorio del paciente, revelando la existencia de una infección fúngica. La disminución progresiva de estos componentes en sangre a partir de la fecha en que el paciente comenzó el tratamiento antifúngico, apunta a que dicho paciente estaría reaccionando positivamente al tratamiento.

Asimismo, mediante inmunomicroscopía electrónica se reveló que los anticuerpos del paciente reaccionaban con la levadura *C. famata*, de manera similar al anticuerpo policlonal anti-*C. famata* (D21), sugiriendo de nuevo que el paciente había estado o estaba expuesto a esta levadura. Además, los anticuerpos detectados en el paciente correspondían al isotipo IgM. Generalmente esto indica exposición a un antígeno o infección reciente, mientras que la presencia del isotipo IgG suele indicar persistencia de enfermedad. Sin embargo, hay enfermedades como la esclerosis múltiple, en las que la presencia de IgM se asocia con un pronóstico más grave de la enfermedad y una posibilidad de incapacidad a corto plazo (Alvarez Cermeno, 2002). Esto es lo que ha podido ocurrir en el paciente objeto de estudio, que presenta uno de los casos más agudos de la enfermedad, habiendo perdido la visión en los dos ojos. Este resultado apoyaría nuestra hipótesis, relacionando el AZOOR y la infección fúngica.

En varias ocasiones se ha planteado la posibilidad de que el AZOOR, la coroiditis multifocal y el síndrome de los puntos blancos evanescentes, junto con otras entidades clínicas sean una misma enfermedad debido a las similitudes que presentan: retinogramas anormales, se presentan principalmente en mujeres jóvenes y muchos de los pacientes, antes de padecer los primeros síntomas de la enfermedad, experimentan algo parecido a una

infección viral (Holz et al, 1994; Jampol and Wiredu, 1995). Por esta razón, los resultados obtenidos en el paciente anterior se ampliaron con el estudio de otros pacientes diagnosticados con la misma o enfermedades relacionadas (coroidopatía serpiginosa y coroiditis multifocal), en conjunto, un total de 15 pacientes.

Al realizar un estudio por enfermedades, se observaron diferencias significativas tanto en el título y especificidad de anticuerpos como en la presencia de componentes fúngicos en sangre entre las diferentes enfermedades estudiadas. Los pacientes del grupo de coroiditis multifocal fueron los que menores niveles de anticuerpos y componentes fúngicos (ADN, antígenos y β -glucanos) poseían, diagnosticándose infección fúngica al 60% de los mismos. El grupo intermedio resultó ser el grupo de AZOOR. En función de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas, utilizando las técnicas descritas en este trabajo, se diagnosticó infección fúngica al 80% de los pacientes de este grupo. Finalmente, el grupo de coroidopatía serpiginosa mostró, tanto un título elevado de anticuerpos, especialmente frente a *C. albicans* y *C. glabrata*, como niveles elevados de componentes fúngicos en suero. En este caso, en función de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas, se diagnosticó infección fúngica al 100% de los pacientes. Esto parece indicar que un elevado porcentaje de los pacientes estudiados padece una infección por hongos.

La posibilidad de que estas tres enfermedades estén causadas por una infección por levadura se refuerza con los datos clínicos que se conocen: las tres enfermedades son de progresión lenta y recurrente, y por otro lado, tenemos que el crecimiento prolongado de levadura puede producir necrosis en los tejidos, cicatrices y atrofia de la retina y de los vasos sanguíneos de la coroides. Además, el fondo de ojo en estos pacientes es pálido y blanquecino y en algunos casos se aprecia la aparición de puntos blancos. Por otro lado, la retención de fluoresceína al realizarles angiografías fluoresceínicas podría reflejar la presencia de células fúngicas o material mucoso en la retina y en los vasos coroidales. Asimismo, el análisis de fondo de ojo revela similitudes clínicas entre el AZOOR y la histoplasmosis, una enfermedad causada por el hongo *Hystoplasma capsulatum* (Dreyer and Gass, 1984; Holz et al, 1994).

Los distintos grados de infección encontrados en los tres grupos de pacientes se explicaría si efectivamente, estas enfermedades se corresponden con distintos estadios de una misma enfermedad como se ha sugerido en diferentes ocasiones (Holz et al, 1994; Jampol and Wiredu, 1995). Estas diferencias también pueden deberse al hecho de que con las técnicas empleadas en este trabajo, se pone de manifiesto el reflejo en sangre de una infección que se

encuentra localizada en un foco. Por tanto, la presencia de componentes fúngicos en el torrente circulatorio puede variar en función de la especie fúngica causante de la infección (que puede ser distinta para cada una de las enfermedades) y del estado del paciente.

Por otro lado, los efectos de los tratamientos con corticosteroides en algunos pacientes no muestran efectos claros de mejora de la enfermedad (Holz *et al*, 1994). Sin embargo, el tratamiento antifúngico al que se ha sometido el primer paciente estudiado, ha mostrado tener un efecto positivo en varios de los síntomas clínicos que presentaba el mismo.

En cualquier caso, para poder establecer una relación causa-efecto entre las infecciones fúngicas y las tres enfermedades aquí consideradas, sería necesario realizar un estudio con un mayor número de pacientes y un seguimiento más exhaustivo de los mismos. Lo más contundente sería la realización de ensayos clínicos con compuestos antifúngicos.

4.2. Esclerosis múltiple y hongos

La esclerosis múltiple, enfermedad clasificada dentro de las enfermedades autoinmunes, presenta enormes similitudes con la enfermedad de AZOOR. Entre ellas se puede destacar la presencia de anomalías en la materia blanca del cerebro, un curso de recaídas seguido a menudo por un empeoramiento gradual y lesiones inflamatorias localizadas predominantemente en áreas alrededor de vasos sanguíneos junto con signos de pérdida neuronal secundaria (Hintzen and van den Born, 2006). Además, entre los desórdenes conocidos asociados con la esclerosis múltiple se encuentran también problemas oculares como neuritis óptica, uveítis óptica y vasculitis retinal.

El primer caso estudiado lo constituye un paciente diagnosticado de esclerosis múltiple en el año 2002. Se ha realizado seguimiento de la presencia de antígenos en suero y de la respuesta humoral del paciente desde abril de 2005 hasta junio de 2006. Para ello se tuvo en cuenta que dicho paciente comenzó a tratarse con antifúngicos en junio de 2005 de forma intermitente y continúa en la actualidad.

Los resultados obtenidos con este paciente presentan un patrón similar a los datos obtenidos en el primer paciente con AZOOR estudiado. Tanto el número de genomas en sangre, como la cantidad de antígeno de *Candida* y la cantidad de β -glucanos, disminuyeron progresivamente a partir de noviembre de 2005, pudiendo ser el reflejo del tratamiento antifúngico al que se estaba sometiendo el paciente. En la muestra obtenida en marzo de 2006 se observó un pico a todos los niveles salvo en la cantidad de anticuerpos, que por el

contrario, mostraron su cifra más baja. Sin embargo, en junio de 2006 la cantidad de anticuerpos en la sangre del paciente volvió a experimentar una subida, momento en que la cantidad de antígeno volvió a disminuir. Esta alternancia entre los picos de antígeno y anticuerpo resulta lógica, puesto que los anticuerpos contribuyen a que los antígenos sean eliminados del torrente circulatorio (Ellepola and Morrison, 2005). Por tanto, podemos volver a afirmar que todos estos datos indican una presencia de componentes fúngicos en el torrente circulatorio del paciente. La disminución progresiva de estos componentes en sangre, se correlaciona con las épocas en que el paciente está sometido a los diferentes tratamientos antifúngicos, indicando que dicho paciente está reaccionando positivamente al tratamiento.

El análisis del líquido cefalorraquídeo no sólo reveló presencia de anticuerpos sino también de antígenos que reaccionaban con el D21, es decir antígenos de *C. famata*. El análisis de los anticuerpos desveló que se trataba del isotipo IgG, que son las inmunoglobulinas que presentan la mayoría (95%) de los pacientes con esclerosis múltiple y que se han encontrado al inicio de la formación de las placas en el cerebro (Alvarez Cermeno, 2002; Andersson *et al*, 1994). La presencia de antígenos y anticuerpos IgG frente a diferentes levaduras en el líquido cefalorraquídeo de este paciente, sugiere la presencia de infección en el cerebro, encéfalo o médula ósea, apoyando la hipótesis de que puede existir una relación entre esta enfermedad y ciertos hongos.

Los resultados obtenidos en este primer paciente con esclerosis múltiple se han ampliado con el estudio de otros pacientes diagnosticados con la misma enfermedad.

De los otros siete pacientes estudiados, un elevado porcentaje mostró presencia de componentes fúngicos y anticuerpos frente a hongo en sangre. Con los datos obtenidos en las diferentes pruebas realizadas, se diagnosticó infección fúngica al 85% de los pacientes. De nuevo esto parece indicar que un elevado porcentaje de los pacientes con esclerosis múltiple estudiados en este trabajo, padece una infección por hongos

Para explicar la existencia de infección fúngica en pacientes con esclerosis múltiple se pueden proponer dos alternativas. Una de ellas es que esta infección sea la causa etiológica de la enfermedad. La otra posibilidad es que dicha infección sea una consecuencia como resultado de la disfunción inmune de estos pacientes. En cualquier caso, si existe una infección fúngica, esta debería ser tratada adecuadamente con compuestos antifúngicos.

Existe un elevado número de observaciones que favorecen la posibilidad de que sea una infección fúngica la causa etiológica de la esclerosis múltiple. En primer lugar, se cuenta con que las infecciones fúngicas son persistentes y recurrentes si no son tratadas. El diagnóstico de infecciones causadas por especies de levadura con baja capacidad inflamatoria resulta difícil de localizar para los análisis rutinarios que se llevan a cabo en los laboratorios hospitalarios. Además se ha observado que animales infectados con *C. famata*, contrariamente a lo que ocurre con *C. albicans*, sobreviven a la infección (Khan *et al*, 1980); y que después de una infección con *C. famata*, en algunos tejidos de los ratones infectados se desarrollan granulomas donde la presencia de células de levadura es difícil de detectar (Pacheco, 2006). Estos granulomas son cúmulos de infiltrados de diferentes células inmunes como monocitos y neutrófilos, que se asemejan a los descritos en esclerosis múltiple (Lucchinetti *et al*, 2005). A esto se suma que la formación de granulomas se ha descrito en humanos y animales infectados con diferentes especies fúngicas (Dubey *et al*, 2005).

Otro punto interesante es que la infección de levadura suele estar localizada en focos, lo que podría explicar por qué el daño del sistema nervioso central en la esclerosis múltiple está restringido a áreas discretas (Geirsson *et al*, 1989; Lucchinetti *et al*, 2005). Una respuesta autoinmune frente a un antígeno perteneciente al sistema nervioso central resultaría en un daño indiscriminado de todos los tejidos que contuviesen dicho antígeno. Por otro lado, la inflamación vascular descrita en algunos pacientes con esclerosis múltiple podría ser el resultado de la colonización por levaduras, puesto que éstas tienen tropismo por los vasos sanguíneos (Anstead *et al*, 2006; Takeda *et al*, 1998). También se ha relacionado la calcificación y la esclerosis de tejidos con el crecimiento e infección por *Candida* (Ennever and Summers, 1975), por tanto, existe la posibilidad de que la formación de placas en esclerosis múltiple pueda ser debida a una infección fúngica.

El estudio de la respuesta inmune en pacientes de esclerosis múltiple muestra un incremento en la cantidad de ciertas interleuquinas en el momento de los brotes, entre ellas TNF- α , INF- γ e IL-1 que se corresponden con una respuesta Th1 (Barnett and Sutton, 2006; Frohman *et al*, 2006; Hollifield *et al*, 2003; Lucchinetti *et al*, 2005). Estos pacientes sin embargo, muestran un nivel muy bajo de las mismas en los periodos de remisión (Hollifield *et al*, 2003) Un dato de interés lo constituye que las infecciones fúngicas pueden desencadenar la respuesta Th1 con la producción de IFN, TNF, IL-1, IL-6 e IL-12 que confiere resistencia al huésped frente a la infección; o pueden inducir la producción de IL-4 e IL-10, típicas de la respuesta Th2 que está asociada con progresión de la infección y por

tanto patología. La inducción de una de las dos respuestas depende de ciertas circunstancias, como por ejemplo, el estado inmune del paciente o la especie fúngica entre otras (Mencacci, 1999). Por otro lado, la regulación de la respuesta inmune Th1/Th2 parece ser fundamental para obtener la protección inmunológica frente a un organismo comensal habitual de los tractos humanos gastrointestinal y vaginal, en ausencia de patología, como ocurre en el caso del género *Candida*. El conseguir un equilibrio entre las citoquinas que desencadenan las respuestas Th1 y Th2, puede ser importante para una protección antifúngica óptima. Modelos in vivo indican que las células T reguladoras atenúan la respuesta antifúngica Th1 induciendo tolerancia a los hongos (Shoham and Levitz, 2005). Por tanto, en el momento en que este equilibrio se desestabilice hacia la respuesta Th2, las levaduras pueden pasar a la sangre y producir una infección en el huésped. Los desequilibrios en la relación Th1/Th2 podrían corresponderse con los brotes y remisiones que se suceden en la esclerosis múltiple.

Se ha establecido una predisposición genética en la propensión a adquirir la esclerosis múltiple (Compston and Coles, 2002). Este hecho también se corresponde con la idea de que la esclerosis múltiple tenga un origen fúngico, puesto que el background genético de una persona puede predisponer a una mayor susceptibilidad a ser colonizado por un hongo (Mencacci, 1999).

En resumen, a nuestro parecer ninguno de los síntomas clínicos y las observaciones descritas en los pacientes de esclerosis múltiple descarta la posibilidad de que esta enfermedad pueda estar causada por una infección fúngica. Sin embargo, para poder establecer si la infección fúngica es la causa o la consecuencia de la esclerosis múltiple será necesario realizar un estudio con un mayor número de pacientes y un seguimiento más exhaustivo de los mismos, además de llevar a cabo una serie de ensayos clínicos administrando compuestos antifúngicos a dichos pacientes. No obstante, se deben tener en cuenta dos aspectos a la hora de elegir el compuesto antifúngico más adecuado. El primero es la necesidad de establecer la especie fúngica causante de la infección, debido a que algunas especies de levadura son resistentes a ciertos compuestos antifúngicos. El segundo aspecto lo constituye la biodisponibilidad y la accesibilidad al sistema nervioso del antifúngico empleado. La evaluación de estos ensayos clínicos podría determinar si la etiología de la esclerosis múltiple es de origen fúngico.

5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico realizado, en los que se han empleado como variables la “presencia de anticuerpo frente a diferentes levaduras” y la “presencia de ADN fúngico en sangre”, permiten concluir que el grupo de pacientes con coroidopatía serpigínea, y especialmente, el grupo de pacientes con esclerosis múltiple muestran un elevado porcentaje de individuos con ADN fúngico en sangre (PCR positiva). Además estos dos grupos, junto con el de AZOOR, presentan también un elevado porcentaje de individuos con niveles altos de anticuerpos en suero frente a *C. albicans* y *C. glabrata*. La presencia de anticuerpos frente a *C. tropicalis* no se tuvo en cuenta puesto que también se han encontrado en un porcentaje muy elevado de la población sana estudiada.

A la luz de los resultados obtenidos en el trabajo de laboratorio llevado a cabo, así como en el tratamiento estadístico del mismo, parece que podría existir una relación entre las enfermedades estudiadas en este trabajo y ciertos hongos, al detectarse la presencia de componentes fúngicos en muestras biológicas de los individuos que las padecen. Sin embargo, esta afirmación debe tomarse aún con suma precaución puesto que ha de tenerse en cuenta que el número de pacientes considerados no es muy elevado. Para poder confirmar este extremo serán necesarios estudios complementarios, partiendo de una muestra poblacional mucho mayor y heterogénea, que permita realizar un análisis estadístico aún más preciso y concluyente, junto con un seguimiento más exhaustivo de cada uno de los pacientes. Por otra parte, como ya se ha mencionado anteriormente, también se hace necesario la realización de ensayos clínicos, en los que se administre compuestos antifúngicos a los diferentes pacientes, que permitan establecer si la presencia fúngica en el torrente circulatorio de los afectados es la causa de la enfermedad que padecen o si por el contrario es un efecto de la misma.

Todos estos estudios constituyen un buen punto de partida para futuros trabajos, apuntando a una nueva línea de investigación sobre la temática en la que se investigue la causa de estas y otras enfermedades de origen desconocido o poco claro.

CONCLUSIONES

1. Las técnicas de PCR anidada y PCR-Q puestas a punto en esta tesis doctoral permiten la detección de ADN fúngico con una elevada sensibilidad (1genoma/reacción de PCR). Por ello pueden ser aplicadas al diagnóstico de infecciones fúngicas en muestras clínicas.
2. La técnica de dot-blot es apropiada para poner de manifiesto la presencia de antígenos fúngicos en muestras clínicas, siendo capaz de detectar cantidades de proteína que se encuentran en el rango femtomolar.
3. Para determinar la presencia de hongos en muestras clínicas de manera fiable es necesario utilizar varias técnicas complementarias, como la detección de anticuerpos contra hongos y la detección de antígenos, (1,3)- β -D-glucanos y ADN fúngicos.
4. Tanto el estudio clínico como el análisis estadístico realizado con los pacientes diagnosticados con diferentes enfermedades oculares: AZOOR, coroidopatía serpiginosa, coroiditis multifocal, así como con esclerosis múltiple, indica que puede existir una relación entre estas enfermedades y ciertos hongos.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Hedaithy SS (2003). The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. *Mycoses* **46**: 293-8.

Alexander BD (2002). Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis* **4 Suppl 3**: 32-7.

Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela JL, Pahissa A (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: Case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **44**: 1681-5.

Altamura M, Casale D, Pepe M, Tafaro A (2001). Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **1**: 189-97.

Alvarez Cermeno JC (2002). [Initial axonal lesion in multiple sclerosis. Reasons for early treatment]. *Rev Neurol* **35**: 221-7.

Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Gronning M, et al. (1994). Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**: 897-902.

Anstead GM, Martinez M, Graybill JR (2006). Control of a *Candida glabrata* prosthetic endovascular infection with posaconazole. *Med Mycol* **44 Suppl 3**:273-277.

- Araujo AA, Wells AP, Dick AD, Forrester JV (2000). Early treatment with cyclosporin in serpiginous choroidopathy maintains remission and good visual outcome. *Br J Ophthalmol* **84**: 979-82.
- Barnett MH, Sutton I (2006). The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol* **19**: 242-7.
- Blumenkranz MS, Gass JD, Clarkson JG (1982). Atypical serpiginous choroiditis. *Arch Ophthalmol* **100**: 1773-5.
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M (1999). Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* **37**: 925-30.
- Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li RK, Morrison CJ, Warnock DW, Hajjeh RA (2000). *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg Infect Dis* **6**: 46-9.
- Brandt ME, Padhye AA, Mayer LW, Holloway BP (1998). Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **36**: 2057-62.
- Bretagne S, Costa JM (2005). Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**: 361-8.
- Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C (1998). Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **26**: 1407-12.
- Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J (1995). Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 1164-8.
- Calderone RA, Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327-35.
- Canteros GE, Davel GO, Vivot W (1994). [Causal agents of onychomycosis]. *Rev Argent Microbiol* **26**: 65-71.
- Carline MJ, Watkinson, S.C., Gooday, G.W (2001). *The fungi*. 2^a Ed Academic Press.
- Carrasco L, Ramos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M, Gonzalez ME (2005). Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *J Clin Microbiol* **43**: 635-40.
- Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* **19**: 130-9.

- Castro CaM, E (2001). DIAGNÓSTICO DE LA INFECCION FÚNGICA POR LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida*: *Candida dubliniensis*. http://www.seimc.org/control/revi_Mico/pdf/Cdublinienpdf: 1-10.
- Cerikcioglu N, Hasdemir UO, San T, Salik E, Soyletir G (2004). Simple and reliable detection of slime production of *Candida* spp. directly from blood culture bottles: comparison of visual tube method and transmission electron microscopy. *Mycopathologia* **158**: 279-84.
- Clark TA, Hajjeh RA (2002). Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* **15**: 569-74.
- Clemons KV, Calich VL, Burger E, Filler SG, Graziutti M, Murphy J, Roilides E, Campa A, Dias MR, Edwards JE, Jr., Fu Y, Fernandes-Bordignon G, Ibrahim A, Katsifa H, Lamagnere CG, Meloni-Bruneri LH, Rex J, Savary CA, Xidieh C (2000). Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med Mycol* **38 Suppl 1**: 99-111.
- Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ (1998). Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol* **36 Suppl 1**: 156-65.
- Colom MF, Jover, A., Ferrer, C. (2006). Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. *Rev Iberoam Micol* **23**: 26-28.
- Colombo B, Annovazzi P, Comi G (2006). Understanding fatigue in multiple sclerosis: new insights in causes and assessment. *Neurol Sci* **27 Suppl 4**: s304-6.
- Compston A, Coles A (2002). Multiple sclerosis. *Lancet* **359**: 1221-31.
- Coo H, Aronson KJ (2004). A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* **23**: 1-12.
- Crampin AC, Matthews RC (1993). Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J Med Microbiol* **39**: 233-8.
- Chen SC, Halliday CL, Meyer W (2002). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* **40**: 333-57.
- Christmas NJ, Oh KT, Oh DM, Folk JC (2002). Long-term follow-up of patients with serpiginous choroiditis. *Retina* **22**: 550-6.
- De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A (2001). Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* **39**: 303-13.
- de Llanos Frutos R, Fernandez-Espinar MT, Querol A (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 175-85.

- Dixon SC, Horti J, Guo Y, Reed E, Figg WD (1998). Methods for extracting and amplifying genomic DNA isolated from frozen serum. *Nat Biotechnol* **16**: 91-4.
- Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC (1999). Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology* **145 (Pt 8)**: 1871-82.
- Dreyer RF, Gass DJ (1984). Multifocal choroiditis and panuveitis. A syndrome that mimics ocular histoplasmosis. *Arch Ophthalmol* **102**: 1776-84.
- Dubey A, Patwardhan RV, Sampth S, Santosh V, Kolluri S, Nanda A (2005). Intracranial fungal granuloma: analysis of 40 patients and review of the literature. *Surg Neurol* **63**: 254-60; discussion 260.
- Dulbecco R, Freeman G (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**: 396-7.
- Ebers GC (2005). A twin consensus in MS. *Mult Scler* **11**: 497-9.
- Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* **377**: 150-1.
- Edelsten C, Stanford MR, Graham EM (1994). Serpiginous choroiditis: an unusual presentation of ocular sarcoidosis. *Br J Ophthalmol* **78**: 70-1.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U (1997). Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* **35**: 1353-60.
- Ellepola AN, Morrison CJ (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* **43 Spec No**: 65-84.
- Ennever J, Summers FE (1975). Calcification by *Candida albicans*. *J Bacteriol* **122**: 1391-3.
- Erkkila H, Laatikainen L, Jokinen E (1982). Immunological studies on serpiginous choroiditis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **219**: 131-4.
- Fanci R, Guidi S, Bonolis M, Bosi A (2005). *Candida krusei* fungemia in an unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient successfully treated with Caspofungin. *Bone Marrow Transplant* **35**: 1215-6.
- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio 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* **39**: 2873-9.
- Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M (1998). Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* **36**: 395-401.
- Fowler CJ, Kalsi V (2006). Bladder dysfunction in multiple sclerosis. *Neurol Sci* **27 Suppl 4**: s323-7.

- Friberg TR (1988). Serpiginous choroiditis with branch vein occlusion and bilateral periphlebitis. Case report. *Arch Ophthalmol* **106**: 585-6.
- Frohman EM, Frohman TC, Zee DS, McColl R, Galetta S (2005). The neuro-ophthalmology of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **4**: 111-21.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006). Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* **354**: 942-55.
- Fujita SJ, Lasker, B. A., Lott, T. J., et al. (1995). Microtitre plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* **33**: 962-967.
- Games, transatlantic multiple sclerosis genetics cooperative (2003). A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **143**: 39-46.
- Gass JD (1993). Acute zonal occult outer retinopathy. Donders Lecture: The Netherlands Ophthalmological Society, Maastricht, Holland, June 19, 1992. *J Clin Neuroophthalmol* **13**: 79-97.
- Gass JD (2003). Are acute zonal occult outer retinopathy and the white spot syndromes (AZOOR complex) specific autoimmune diseases? *Am J Ophthalmol* **135**: 380-1.
- Gass JD, Agarwal A, Scott IU (2002). Acute zonal occult outer retinopathy: a long-term follow-up study. *Am J Ophthalmol* **134**: 329-39.
- Geeraedts F, Wilczak N, van Binnendijk R, De Keyser J (2004). Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. *Neuroreport* **15**: 27-32.
- Geirsson AJ, Akesson A, Gustafson T, Elnor A, Wollheim FA (1989). Cineradiography identifies esophageal candidiasis in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* **7**: 43-6.
- Gil M (1997). Conceptos básicos sobre la interacción del sistema inmune y los hongos causales de micosis sistémicas. *LATRELA* **10**: 171-176.
- Gilden DH (2005). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **4**: 195-202.
- Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Munz C, Sriram S, Steiner I, Hammerschlag MR, Gaydos CA (2006). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **5**: 887-94.
- Guiver M, Levi K, Oppenheim BA (2001). Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol* **54**: 362-6.
- Gupta V, Agarwal A, Gupta A, Bambery P, Narang S (2002). Clinical characteristics of serpiginous choroidopathy in North India. *Am J Ophthalmol* **134**: 47-56.
- Guzmán AM (2004). Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev Chil Infect* **21**: 39-47.

- Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD (2003). Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* **41**: 5099-102.
- Hamilton AM, Bird AC (1974). Geographical choroidopathy. *Br J Ophthalmol* **58**: 784-97.
- Hardy RA, Schatz H (1987). Macular geographic helicoid choroidopathy. *Arch Ophthalmol* **105**: 1237-42.
- Harlow E, and Lane, D. (1988). Antibodies. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Heindl D, Huber, A., Marz, H. (2001). Labelling hybridisation probes for LightCycler applications. *Biochemica* **1**: 8-10.
- Helbig H, Sutter F, Tholen A (2001). [Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR)]. *Ophthalmologie* **98**: 574-8.
- Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kahkola P, Anttila VJ, Malmberg H, Richardson M, Ylikoski J (2000). Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* **38**: 4186-92.
- Hintzen RQ, van den Born LI (2006). Acute zonal occult outer retinopathy and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**: 1373-5.
- Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF (1994). Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* **32**: 228-31.
- Holz FG, Kim RY, Schwartz SD, Harper CA, Wroblewski J, Arden GB, Bird AC (1994). Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR) associated with multifocal choroidopathy. *Eye* **8 (Pt 1)**: 77-83.
- Hollifield RD, Harbige LS, Pham-Dinh D, Sharief MK (2003). Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity* **36**: 133-41.
- Hooper PL, Kaplan HJ (1991). Triple agent immunosuppression in serpiginous choroiditis. *Ophthalmology* **98**: 944-51; discussion 951-2.
- Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, Highsmith WE (1993). Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* **31**: 65-75.
- Imhof A, Schaer C, Schoedon G, Schaer DJ, Walter RB, Schaffner A, Schneemann M (2003). Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**: 558-60.

- Ishibashi K, Yoshida M, Nakabayashi I, Shinohara H, Miura NN, Adachi Y, Ohno N (2005). Role of anti-beta-glucan antibody in host defense against fungi. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**: 99-109.
- Jacobson DM (1996). Acute zonal occult outer retinopathy and central nervous system inflammation. *J Neuroophthalmol* **16**: 172-7.
- Jacobson SG, Morales DS, Sun XK, Feuer WJ, Cideciyan AV, Gass JD, Milam AH (1995). Pattern of retinal dysfunction in acute zonal occult outer retinopathy. *Ophthalmology* **102**: 1187-98.
- Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, Adamson P, Okhravi N, Lightman S (2000). Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* **38**: 2902-8.
- Jakoby WB, Pastan, I. H (1979). Cell culture. 1^a Ed Academic Press.
- Jampol LM, Orth D, Daily MJ, Rabb MF (1979). Subretinal neovascularization with geographic (serpiginous) choroiditis. *Am J Ophthalmol* **88**: 683-9.
- Jampol LM, Wiredu A (1995). MEWDS, MFC, PIC, AMN, AIBSE, and AZOOR: one disease or many? *Retina* **15**: 373-8.
- Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, Oppenheim BA, Balagopal P, Morgenstern GR, Scarffe JH (1998). PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillus infection in neutropenic patients. *J Clin Pathol* **51**: 652-6.
- Jordan JA (1994). PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* **32**: 2962-7.
- Kam AP, Xu J (2002). Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 19-28.
- Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T (2005). Epidemiological study of *Candida* species in cutaneous candidiasis based on PCR using a primer mix specific for the DNA topoisomerase II gene. *J Dermatol Sci* **37**: 21-8.
- Kan VL (1993). Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* **168**: 779-83.
- Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A (2002). Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiol Immunol* **46**: 841-8.
- Kantarci O, Wingerchuk D (2006). Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* **19**: 248-54.
- Kantarci OH, Weinshenker BG (2005). Natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **23**: 17-38, v.

- Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, Baughman WS, Reingold AL, Rothrock GA, Pfaller MA, Pinner RW, Hajjeh RA (1999). The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* **29**: 1164-70.
- Kappe R, Fauser C, Okeke CN, Maiwald M (1996). Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rDNA. *Mycoses* **39**: 25-30.
- Kappe R, Okeke CN, Fauser C, Maiwald M, Sonntag HG (1998). Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. *J Med Microbiol* **47**: 811-20.
- Khan ZU, Misra VC, Randhawa HS, Damodaran VN (1980). Pathogenicity of some ordinarily harmless yeasts for cortisone-treated mice. *Sabourandia* **18**: 319-27.
- Khan ZU, Mustafa AS (2001). Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res* **156**: 95-102.
- King DG, Grizzard WS, Sever RJ, Espinoza L (1990). Serpiginous choroidopathy associated with elevated factor VIII-von Willebrand factor antigen. *Retina* **10**: 97-101.
- Kitamura K, Kaneko, T., Yamamoto, Y. (1974). Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. II Purification and properties of an enzyme, zimolase, which lyses viable yeast cells. *J Gen Appl Microbiol* **20**.
- Korabecna M, Liska V, Fajfrlik K (2003). Primers ITS1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi. *Folia Microbiol (Praha)* **48**: 233-8.
- Kremèry V, and Barnes, A. J. (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* **50**: 243-260.
- Kurtzman CP, 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.
- Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ, Coleman DC, Frosch M, Muhlschlegel FA (1999). Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. *J Clin Microbiol* **37**: 1587-90.
- Laatikainen L, Erkkila H (1974). Serpiginous choroiditis. *Br J Ophthalmol* **58**: 777-83.
- Lardenoye CW, Van der Lelij A, de Loos WS, Treffers WF, Rothova A (1997). Peripheral multifocal chorioretinitis: a distinct clinical entity? *Ophthalmology* **104**: 1820-6.
- Lass-Florl C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, Einsele H, Löffler J, Dierich MP, Würzner R (2001). Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol* **113**: 180-4.

- Lee AG, Prager TC (1996). Acute zonal occult outer retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand* **74**: 93-5.
- Lehmann PF, Lin D, Lasker BA (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* **30**: 3249-54.
- Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC (2003). Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**: 693-6.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**: 357-62.
- Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H (1997). Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* **35**: 3311-2.
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H (2000). Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol* **38**: 586-90.
- Loeffler RL, Hebart, H., Sepe, S., et al (1998). Detection of PCR amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med Mycol* **36**: 275-279.
- López C, Giro, L, Ramos, L, Ramadán, S, Bulacio, L (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología* **37**: 16-21.
- Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W (2005). The pathology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **23**: 77-105, vi.
- Ludwin SK (2006). The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**: 305-18.
- Lleó Perez A, Hernández Perez, D., Hernández Martínez, F. J., et al. (2000). Manifestaciones clínicas y angiográficas en tres pacientes con coroidopatía serpiginosa. *Arch Soc Esp oftalmol* **75**: 555-558.
- Maaroufi Y, Ahariz, N, Husson, M and Crokaert, F, (2004). Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitaion by using a real-time PCR-based assay. *Journal of clinical microbiology* **42**: 3159-3163.
- Maiwald M, Kappe R, Sonntag HG (1994). Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* **32**: 115-22.
- Makni F, Cheikrouhou F, Ayadi A (2000). [Parasitoses and immunodepression]. *Arch Inst Pasteur Tunis* **77**: 51-4.

- Malani PN, Bradley SF, Little RS, Kauffman CA (2001). Trends in species causing fungaemia in a tertiary care medical centre over 12 years. *Mycoses* **44**: 446-9.
- Mansour AM, Jampol LM, Packo KH, Hrisomalos NF (1988). Macular serpiginous choroiditis. *Retina* **8**: 125-31.
- Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* **34**: 909-17.
- Marrie RA (2004). Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* **3**: 709-18.
- Masi RJ, O'Connor GR, Kimura SJ (1978). Anterior uveitis in geographic or serpiginous choroiditis. *Am J Ophthalmol* **86**: 228-32.
- Matthews R, Burnie J (1998). The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: application in prevention and treatment. *Bull Inst Pasteur* **96**: 249-256.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**: 491-9.
- Meis JF, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siegert W, Verweij PE (1999). *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis* **5**: 150-3.
- Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, Fè d'Ostiani C, Montagnoli C, Bacci A, Bistoni F, and Romani L (1999). Innate and adaptive immunity to *Candida albicans*: A new view of an old paradigm. *Rev Iberoam Micol* **16**: 4-7.
- Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC (2001). PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**: 185-93.
- Michot B, Hassouna N, Bachellerie JP (1984). Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **12**: 4259-79.
- Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Takeya H, Otsubo T, Kawamura S, Hossain MA, Noda T, Hirakata Y, Kohno S (1996). Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* **34**: 1918-21.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* **62**: 60-5.
- Mussi-Pinhata MM, Ferez MC, Covas DT, Duarte G, Isaac ML, Marana HR, Biscaro TA, Kashima S (1994). [Use of polymerase chain reaction for neonatal diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) perinatal infection]. *J Pediatr (Rio J)* **70**: 338-43.
- Nishikawa A, Sugita T, Shinoda T (1997). Differentiation between *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* complex and *Candida guilliermondii* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**: 125-9.

- Nishikawa A, Sugita, T., Shinoda, T. (1999). Rapid identification of *Debaryomyces hansenii* / *Candida famata* by polymerase chain reaction. *Medical Mycology* **37**: 101-104.
- Nozik RA, Dorsch W (1973). A new chorioretinopathy associated with anterior uveitis. *Am J Ophthalmol* **76**: 758-62.
- Okhravi N, Adamson P, Mant R, Matheson MM, Midgley G, Towler HM, Lightman S (1998). Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism mediated detection and speciation of *Candida* spp causing intraocular infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 859-66.
- Oksenberg JR, Barcellos LF (2000). The complex genetic aetiology of multiple sclerosis. *J Neurovirol* **6 Suppl 2**: S10-4.
- Pacheco M (2006). Interacción de *Candida famata* con células en cultivo y animales de experimentación. Cantoblanco (Madrid): Universidad Autónoma de Madrid.
- Pappalardo A, Castiglione A, Restivo DA, Calabrese A, Cimino V, Patti F (2006). Pharmacologic management of spasticity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* **27 Suppl 4**: s310-5.
- Park S, Wong M, Marras SA, Cross EW, Kiehn TE, Chaturvedi V, Tyagi S, Perlín DS (2000). Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J Clin Microbiol* **38**: 2829-36.
- Pemán J, Martín-Mazuelos, E., Rubio Calvo, M.C. (2001). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Peres-Bota D, Rodriguez-Villalobos H, Dimopoulos G, Melot C, Vincent JL (2004). Potential risk factors for infection with *Candida* spp. in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* **10**: 550-5.
- Pericak-Vance MA, Akesson E, Hillert J, Datta P, Oturai A, Ryder LP, Harbo HF, Spurkland A, Myhr KM, Laaksonen M, Booth D, Heard R, Stewart G, Lincoln R, Barcellos LF, Hauser SL, Oksenberg JR, Kenealy SJ, Haines JL (2005). A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* **77**: 454-67.
- Pfaller MA (1996). Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22 Suppl 2**: S89-94.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN (2003). In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* **41**: 78-83.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ (1999). International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). *Diagn Microbiol Infect Dis* **35**: 19-25.

- Pontón J (2006). El diagnóstico microbiológico independiente de cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol* **23**: 20-25.
- Prinsloo B, Weldhagen GF, Blaine RW (2003). *Candida famata* central nervous system infection. *S Afr Med J* **93**: 601-2.
- Priya K, Madhavan HN, Reiser BJ, Biswas J, Saptagirish R, Narayana KM, Rao NA (2002). Association of herpesviruses in the aqueous humor of patients with serpiginous choroiditis: a polymerase chain reaction-based study. *Ocul Immunol Inflamm* **10**: 253-61.
- Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH (2003). Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**: 487-96.
- Quillen DA, Davis JB, Gottlieb JL, Blodi BA, Callanan DG, Chang TS, Equi RA (2004). The white dot syndromes. *Am J Ophthalmol* **137**: 538-50.
- Quindos G, Moragues MD, Ponton J (2004). Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol* **21**: 10-4.
- Rand KH, Houck H, Wolff M (1994). Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **8**: 215-21.
- Rath PM, Ansorg R (2000). Identification of medically important *Aspergillus* species by single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR-amplified intergenic spacer region. *Mycoses* **43**: 381-6.
- Reboli AC (1993). Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for *Candida* antigen detection. *J Clin Microbiol* **31**: 518-23.
- Reich D, Patterson N, De Jager PL, McDonald GJ, Waliszewska A, Tandon A, Lincoln RR, DeLoa C, Fruhan SA, Cabre P, Bera O, Semana G, Kelly MA, Francis DA, Ardlie K, Khan O, Cree BA, Hauser SL, Oksenberg JR, Hafler DA (2005). A whole-genome admixture scan finds a candidate locus for multiple sclerosis susceptibility. *Nat Genet* **37**: 1113-8.
- Reis J, Dietemann JL, Warter JM, Poser CM (2001). A case of multiple sclerosis triggered by organic solvents. *Neurol Sci* **22**: 155-8.
- Reiss E, Morrison CJ (1993). Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* **6**: 311-23.
- Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancopé-Oliveira RM (2000). Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol* **38 Suppl 1**: 147-59.
- Riise T, Moen BE, Kyvik KR (2002). Organic solvents and the risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* **13**: 718-20.
- Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A (2003). Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* **61**: 1122-4.

- Rajo IM (2001). Ingeniería genética y transferencia génica. 2ª ED. *Pirámide*.
- Rudich R, Santilli J, Rockwell WJ (2003). Indoor mold spore exposure: a possible factor in the etiology of multifocal choroiditis. *Am J Ophthalmol* **135**: 402-4.
- Ruhnke M (2006). Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* **7**: 495-504.
- Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, Daly MJ, De Jager PL, Walsh E, Lander ES, Rioux JD, Hafler DA, Ivinson A, Rimmler J, Gregory SG, Schmidt S, Sawcer S, Compston A (2003). The genetic analysis of multiple sclerosis in Europeans: concepts and design. *J Neuroimmunol* **143**: 13-6.
- Schatz H, Maumenea, A. T., Patz, A. (1974). Geographic helicoid peripapillary croidopathy clinical presentation and fluorescein angiographic findings. *Tr Am Acad Ophth and otol* **78**: 747-761.
- Scheider A (1993). Multifocal inner choroiditis. *Ger J Ophthalmol* **2**: 1-9.
- Schiffner RB, McDermott MP, Copley C (2001). A multiple sclerosis cluster associated with a small, north-central Illinois community. *Arch Environ Health* **56**: 389-95.
- Secchi AG, Tognon MS, Maselli C (1990). Cyclosporine-A in the treatment of serpiginous choroiditis. *Int Ophthalmol* **14**: 395-9.
- Shoham S, Levitz SM (2005). The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* **129**: 569-82.
- Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Hehlmann R (1999). Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* **37**: 3865-71.
- Smetana S, Feman SS, Kleber C (2003). The retinal features of acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR). *Arch Ophthalmol* **121**: 914-5.
- Soderstrom M (2001). Optic neuritis and multiple sclerosis. *Acta Ophthalmol Scand* **79**: 223-7.
- Soilu-Hanninen M, Airas L, Mononen I, Heikkila A, Viljanen M, Hanninen A (2005). 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* **11**: 266-71.
- Spaide RF, Sugin S, Yannuzzi LA, DeRosa JT (1991). Epstein-Barr virus antibodies in multifocal choroiditis and panuveitis. *Am J Ophthalmol* **112**: 410-3.
- Sullivan D, Coleman D (1998). *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* **36**: 329-34.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141 (Pt 7)**: 1507-21.

- Takeda S, Wakabayashi K, Yamazaki K, Miyakawa T, Arai H (1998). Intracranial fungal aneurysm caused by *Candida* endocarditis. *Clinical neuropathology*, **17 Suppl 4**:199-203
- Tiedeman JS (1987). Epstein-Barr viral antibodies in multifocal choroiditis and panuveitis. *Am J Ophthalmol* **103**: 659-63.
- Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R (2006). *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 359-66.
- Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Gobel UB, Adam T (2004). Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Methods* **56**: 201-11.
- Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM (1999). Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* **37**: 1846-51.
- Tyagi S, Kramer FR (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* **14**: 303-8.
- Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA (1998). Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* **36**: 1169-75.
- van Deventer AJ, Goessens WH, van Belkum A, van Vliet HJ, van Etten EW, Verbrugh HA (1995). Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* **33**: 625-8.
- Vandenbelt S, Shaikh S, Capone A, Jr., Williams GA (2003). Multifocal choroiditis associated with West Nile virus encephalitis. *Retina* **23**: 97-9.
- Varma A, Kwon-Chung KJ (1991). Rapid method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* **29**: 810-2.
- Veldman BA, Verweij PE, Blijlevens NM (2006). Successful treatment of liposomal amphotericin B refractory *Candida glabrata* fungaemia in a patient undergoing a stem cell transplantation. *Neth J Med* **64**: 127-9.
- Velegaki A, Kambouris M, Kostourou A, Chalevelakis G, Legakis NJ (1999). Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Med Mycol* **37**: 69-73.
- Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A (2005). Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun* **73**: 4588-95.
- Wagner D, Sander A, Bertz H, Finke J, Kern WV (2005). Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected aspergillosis. *Infection* **33**: 397-400.
- Wagner HJ, Munger KL, Ascherio A (2004). Plasma viral load of Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* **11**: 833-4.

- Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P (2000). Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* **38**: 3016-21.
- Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA (1997). Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* **175**: 1459-66.
- Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock SJ (1995). PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol* **33**: 3216-20.
- Walsh TJ, Hathorn JW, Sobel JD, Merz WG, Sanchez V, Maret SM, Buckley HR, Pfaller MA, Schaufele R, Sliva C, et al. (1991). Detection of circulating candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med* **324**: 1026-31.
- Weinshenker BG (1996). Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **14**: 291-308.
- Weiss H, Annesley WH, Jr., Shields JA, Tomer T, Christopherson K (1979). The clinical course of serpiginous choroidopathy. *Am J Ophthalmol* **87**: 133-42.
- Westall FC (2006). Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis. *J Clin Microbiol* **44**: 2099-104.
- Wiley Jas (2005). *Fungy: Biology and Applications*.
- Wojno T, Meredith TA (1982). Unusual findings in serpiginous choroiditis. *Am J Ophthalmol* **94**: 650-5.
- Wright R, Basson M, D'Ari L, Rine J (1988). Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**: 101-14.
- Yamamoto Y, Osanai S, Fujiuchi S, Yamazaki K, Nakano H, Ohsaki Y, Kikuchi K (2002). Extrinsic allergic alveolitis induced by the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Eur Respir J* **20**: 1351-3.
- Yang CW, Barkham TM, Chan FY, Wang Y (2003). Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. *J Clin Microbiol* **41**: 472-4.
- Yeo SF, Wong B (2002). Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* **15**: 465-84.
- Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D (2001). Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* **39**: 2261-6.

Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| <i>A. fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> . |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico. |
| ADNc | ADN copia. |
| ADNr | ADN ribosómico. |
| Ag | Antígeno. |
| ALS | Secuencia alfa-aglutinina. |
| ARN | Ácido ribonucleico. |
| AZOOOR | Retinopatía aguda zonal periférica oculta. |
| BSA | Albúmina de suero bovino. |
| C- expuesto | Control negativo expuesto. |
| C- no expuesto | Control negativo no expuesto. |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i> . |
| <i>C. dubliniensis</i> | <i>Candida dubliniensis</i> . |
| <i>C. glabrata</i> | <i>Candida glabrata</i> . |
| <i>C. lusitaniae</i> | <i>Candida lusitaniae</i> . |
| <i>C. parapsilosis</i> | <i>Candida parapsilosis</i> . |
| <i>C. pneumoniae</i> | <i>Criptococcus pneumoniae</i> . |
| <i>C. psittaci</i> | <i>Chlamydia psittaci</i> . |
| <i>C. tropicalis</i> | <i>Candida tropicalis</i> . |
| <i>C. famata</i> A | <i>Candida famata</i> aislado. |
| <i>C. famata</i> T | <i>Candida famata</i> tipo. |
| <i>C. famata</i> | <i>Candida famata</i> . |
| <i>C. kefyr</i> | <i>Candida kefyr</i> . |
| <i>C. krusei</i> | <i>Candida krusei</i> . |
| CI | Candidiasis invasora. |
| CMV | Citomegalovirus. |
| CTAB | Bromuro de cetiltrimetilamonio. |
| <i>D. hansenii</i> | <i>Debaryomyces hansenii</i> . |
| D.O | Densidad óptica. |
| DMEM | Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco. |
| DMSO | Dimetil sulfóxido. |
| dNTP | Desoxirribonucleótido trifosfato. |
| dsDNA | ADN de doble cadena. |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> . |
| E.O | Enfermedad ocular. |

| | |
|--------------------------------|---|
| EBV | Virus Epstein-Barr. |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético. |
| ELISA | Inmunoanálisis ligado a enzimas. |
| EM | Esclerosis múltiple. |
| FRET | Transferencia energética de fluorescencia por resonancia. |
| <i>H. capsulatum</i> | <i>Histoplasma capsulatum</i> . |
| HBV | Virus de la hepatitis B. |
| HCV | Virus de la hepatitis C. |
| HH6 | Herpes humano 6. |
| HIV | Virus de la inmunodeficiencia humana. |
| HLA | Antígeno leucocitario humano. |
| HSP 90 | Proteína de respuesta a estrés calórico 90. |
| HTLV | Virus de la leucemia humana de células T. |
| IgA | Inmunoglobulina A. |
| IgE | Inmunoglobulina E. |
| IgG | Inmunoglobulina G. |
| IgM | Inmunoglobulina M. |
| IL | Interleuquina. |
| INF-γ | Interferón gamma. |
| ITS | Secuencia intermedia. |
| kDa | Kilodalton. |
| LCR | Líquido ceforraquídeo. |
| <i>M. restricta</i> | <i>Malassezia restricta</i> . |
| MCP | Coroiditis multifocal con panuveítis. |
| Monocitos THP-1 | Monocitos de leucemia aguda humana. |
| pb | Pares de bases. |
| PBS | Tampón fosfato salino. |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PCR-Q | PCR cuantitativa. |
| PHA | Fitohemaglutinina. |
| PMC | Coroiditis multifocal periférica. |
| POHS | Histoplasmosis ocular. |
| <i>R. mucilaginosa</i> | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . |
| r.p.m | Revoluciones por minuto. |
| RAPD | Amplificación de polimorfismos al azar. |
| RFLP | Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción. |
| <i>S. caroticolor</i> | <i>Stephanospora caroticolor</i> |

| | |
|----------------------|--|
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . |
| SDS | Dodecil sulfato sódico. |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. |
| SNC | Sistema nervioso central. |
| SSCP | Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN. |
| TBS | Tampón salino. |
| TCA | Ácido tricloroacético. |
| T_m | Temperatura de melting. |
| TNF | Factor de necrosis tumoral. |
| TPBS | Tween-20 en tampón fosfato salino. |
| TTBS | Tween-20 en tampón salino. |
| ufc | Unidades formadoras de colonia. |
| VZV | Virus varicella-zoster. |
| YEPD | Extracto de levadura, peptona y dextrosa. |

ANEXO

Isolation of *Candida famata* from a Patient with Acute Zonal Occult Outer Retinopathy

Luis Carrasco,* Marta Ramos, Rebeca Galisteo, Diana Pisa, Manuel Fresno, and María Eugenia González†

Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid, Spain

Received 17 September 2004/Accepted 18 September 2004

The etiology of a number of retinopathies, such as acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR), remains undetermined. *Candida famata* was isolated from conjunctival exudates of a patient diagnosed with AZOOR. This yeast was very abundant, particularly in the more affected eye, while no other pathogens or fungal species were in evidence. Immunological tests revealed the presence of antigen-specific T lymphocytes by using *C. famata* as a challenge. Moreover, enzyme-linked immunosorbent assay analysis showed the presence of specific antibodies against this yeast in the patient's blood. Delayed hypersensitivity by use of a skin test was also positive. Finally, antifungal treatments led to improvements in several clinical symptoms, including funduscopic analysis. However, despite prolonged treatment with fluconazole and itraconazole, *C. famata* still appeared in the conjunctival exudates. The new antifungal voriconazole may represent a better choice for treatment.

Yeasts can cause a number of diseases ranging from localized mild infections to deep-seated candidiasis (8, 34). In fact, candidiasis is the most common fungal infection in humans. About 12 to 14 *Candida* species have been implicated in human infections, with *Candida albicans* being the most prevalent among the yeast isolates (26, 36). Predisposing factors for candidiasis include prolonged antibiotic treatment, the presence of an indwelling intravenous catheter, intravenous drug use, and severe immunosuppression (2, 7). Different *Candida* species are part of the natural microbiota and, thus, are commensal organisms in humans (23). This is the case for *Candida famata* (also known as *Debaryomyces hansenii* and *Torulopsis candida*), which is usually found in some foods, including dairy products (3, 11). It was thought that *C. famata* was nonpathogenic for humans. However, a number of clinical cases in which this yeast was isolated have been reported (25, 46), including ocular endophthalmitis (40) and central nervous system (CNS) infection (39). In addition, different surveys of fungemia in humans have revealed that *C. famata* is responsible for about 0.2 to 2% of the total cases (1, 24, 35).

Systemic mycoses represent a health threat for at least two main reasons. The first is the relatively limited number of antifungal agents available for systemic use (4). Intravenous amphotericin B does not reach the nervous system well, while some yeast species are resistant to antifungals, such as itraconazole and fluconazole (33, 45, 52). Other oral compounds, such as nystatin and miconazole, are poorly absorbed by the intestinal tract. New antifungals, such as voriconazole and posaconazole, which exhibit greater efficacy against *Candida* spp., would be more effective than fluconazole or itraconazole

against systemic candidiasis (15, 31, 35, 41, 42). The second threat results from the failure to promptly detect a number of fungal species different from the classical fungal species *C. albicans*, *Aspergillus*, etc. An example of this is given in the present report, which describes an immunocompetent, otherwise healthy male afflicted by a retinopathy of an as yet unknown etiology. The present findings indicate that this patient was infected with *C. famata*.

A number of retinopathies present as white dots or whitish material of still undefined composition in the retina (5, 27). The typical retinopathy that belongs to this group is the multiple evanescent white dot syndrome (MEWDS) (22, 30, 48, 50). Closely related to MEWDS is acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR) (12, 16, 20, 28, 44). This disease is characterized by a rapid loss of the visual field in the presence of an almost normal funduscopic analysis (14). Both diseases have also been related to other retina dysfunctions, such as multifocal choroiditis, punctate inner choroidopathy, acute macular retinopathy, and acute idiopathic blind spot enlargement (5, 6, 21, 49, 51). Some of these diseases have been associated with *Histoplasma* infection (9). The etiologies of all these retinopathies remain undetermined thus far.

CASE REPORT

A Caucasian male (age, 47 years) was diagnosed with AZOOR in 1996. Briefly, the patient started to have vision problems in 1994, characterized by a rapid loss of peripheral vision in the left eye that progressed to both eyes in the next few years. In 1996 funduscopic analysis was almost normal, while the electroretinogram presented clear pathological signs. Extraocular and intraocular motilities and anterior chamber and intraocular pressures were in the normal ranges. As the disease progressed, in 1998 the fluorescein angiogram became more hyperfluoresceinemic, which is also a characteristic of AZOOR in some patients. Besides, the indocyanine angiogram

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-1-4978450. Fax: 34-1-4974799. E-mail: lcarrasco@cbm.uam.es.

† Present address: Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

showed a mild captation of the dye around the peripapillary region, particularly in the later stages of this angiography.

Apart from these findings, the patient was healthy and the analytical blood test results, as well as the roentgenograms and nuclear magnetic resonance images, were normal. Although during the early years of the description of AZOOR it was thought to be an immune dysfunction, the different immunological parameters for the patient were within normal limits in 1996. The values obtained for C-reactive protein, rheumatoid factor, antibodies against nuclear antigens or against native DNA, soluble interleukin-2 receptor, antibodies against cardiolipin, the hemolytic activity of complement (C3 and C4), and angiotensin-converting enzyme were normal. The proportions of the different lymphocytic populations in peripheral blood were as follows: CD3, 76%; CD4, 30%; CD8, 44%; and CD9, 9%. Although there was a slight decrease in the CD4/CD8 ratio, the values for total CD4 lymphocytes were normal. Moreover, specific autoantibodies against the retina were absent, as tested by immunofluorescence analyses.

MATERIALS AND METHODS

Yeast growth. The yeast was grown in YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) by incubation at 30°C. The same medium containing agar was used to isolate individual yeast colonies. The identification of the yeast species was carried out by standard biochemical and morphological techniques (54). In addition, yeast identification was performed by PCR, followed by sequencing of the amplified products.

To determine the MICs, the different antifungal compounds tested were initially dissolved in dimethyl sulfoxide and further dilutions were made in RPMI medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Different concentrations of each antifungal were added to a 96-well plate in 200 μ l of RPMI medium buffered to pH 7.0 with morpholinepropanesulfonic acid (Sigma). The *C. famata* inoculum was adjusted to a concentration of 0.5×10^3 to 2×10^3 CFU/ml. After incubation at 30°C, the turbidity was estimated by visual reading at 24 and 48 h of incubation. The MIC was defined as the lowest concentration of drug that produced a prominent decrease in turbidity compared with that of the drug-free control.

Immunofluorescence and electron microscopy. Yeast cells were placed onto glass coverslips. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized with methanol (-20°C) for 2 min. The cells were washed twice in PBS and treated with rabbit anti-*C. famata* polyclonal antiserum at room temperature for 1 h. Then, goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to fluorescein antibody was added. The samples were incubated at room temperature for another hour. The cells were then washed, and coverslips were mounted onto the slide with a drop of Mowiol solution. Finally, the cells were observed under a fluorescence microscope. For the ultrastructural analysis of the yeast, we followed the electron microscopy protocol described elsewhere (53), with a few modifications: the cells were fixed for 2 h at room temperature in 2% glutaraldehyde–1% tannic acid in 0.1 M cacodylate buffer (pH 6.8) and were finally embedded in LR white resin (London Resin Co., Ltd.). After postfixation, thin sections were obtained and stained with uranyl acetate and lead citrate. The samples were analyzed with a JEOL 1010 electron microscope.

PCR analysis. DNA was extracted from the conjunctival exudates by standard procedures (43). The DNA preparations were incubated with oligonucleotides that hybridize to the rRNA genes (29, 32). The oligonucleotides used were 5'-CGTAATGATTAATAG-3' and 5'-CGTGCGGCCAAGAAC-3'. The amplified product was analyzed by agarose gel electrophoresis.

T-cell proliferation. Human mononuclear cells were obtained from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) centrifugation. The layer containing mononuclear cells was taken, and the cells were washed thoroughly by centrifugation in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and were finally resuspended in DMEM–2% fetal calf serum (FCS). The T cells were further purified by passing the nonadherent population through a nylon-fiber and wool column, as described previously (38). The purity of this population (detected by flow cytometry) was always greater than 95% CD3⁺ cells. Purified T cells (10^6 /ml in DMEM containing 10% FCS) were seeded in 96-well U-bottom microtiter plates (10^5 /100 μ l/well) and stimulated with 1 μ g of phytohemagglutinin per ml or with different concentrations of

lyophilized *C. famata* cells. The cultures were incubated for 72 h at 37°C, and cell proliferation was evaluated by measurement of the level of incorporation of [³H]thymidine (Perkin-Elmer Life Science Products, Boston, Mass.) into DNA during the last 16 h of culture.

ELISA analyses. A *C. famata* cell suspension was diluted in PBS and seeded in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microtiter plates (Maxisorp; Nunc) in a final volume of 100 μ l. The plates were incubated overnight at 4°C. Blocking was carried out in PBS containing 3% low-fat dry milk and 0.2% Tween 20 for 1 h at room temperature. Serum from the AZOOR patient and serum from an anonymous donor, used as a T-cell control, were added at different dilutions in PBS–1% low-fat dry milk–0.05% Tween 20 for 10 min and subsequently incubated with goat anti-human immunoglobulin G (heavy and light chains) horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Pierce) for 1 h at room temperature and washed five times. Color development was accomplished by incubation with *o*-phenylenediamine (Sigma) for 30 min and was measured at 450 nm in a microplate reader (EL340; BIO-TEK Instruments).

RESULTS

Isolation and identification of *C. famata*. From 1994 to 1999 a number of attempts were made to identify an infectious agent both by blood tests for antibodies and by direct isolation from the conjunctival exudate. The patient's serum was negative for antibodies to the following agents: varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, parvovirus, coxsackievirus, human immunodeficiency virus, human T-cell leukemia virus types 1 and 2, hepatitis B virus, hepatitis C virus, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *Rickettsia conorii*, *Borrelia burgdorferi*, and *Treponema* spp. Some increase in the levels of antibodies against cytomegalovirus was found. No viruses or bacteria apart from the normal flora were detected. Notably, however, in September 1999 *C. famata* readily grew from the conjunctival exudates when the exudates were placed in yeast growth medium. The results of immunofluorescence analysis for comparison of the isolate with a *C. famata* isolate obtained from a type culture collection is shown in Fig. 1A and B. Direct examination of the exudates by transmission electron microscopy showed the presence of significant amounts of yeast cells (Fig. 1C). Moreover, PCR analyses of the exudates collected from 1999 revealed the amplification of a distinct fragment that once again gave evidence of the presence of a yeast (Fig. 2A). This finding prompted us to test different serum samples stored at -20°C for the presence of yeast DNA. PCR analysis of these sera obtained at different dates revealed that *C. famata* DNA was present in the patient's blood in 1997 (Fig. 2B). Amplification followed by sequencing showed no yeast species other than *C. famata*.

Immunological tests. In October 1999, white cells were obtained from fresh blood by use of Ficoll gradients. The level of phytohemagglutinin stimulation of the patient's lymphocytes was lower than that of control lymphocytes from the anonymous donor (Fig. 3A). The stimulation of lymphocytes by sonicated *C. famata* cells above control values indicated the presence of antigen-specific T lymphocytes (Fig. 3B). The presence of specific antibodies against *C. famata* was revealed by an ELISA (Fig. 3C). These antibodies did not cross-react with a number of yeast species analyzed (Fig. 3D). Sera from different volunteers did not react with *C. famata* (data not shown).

Finally, in October 1999, a delayed hypersensitivity assay was carried out on the patient's skin. After 24 h, a clear positive reaction appeared when the preparation of *C. famata* was applied (Fig. 4A). Apart from this yeast species, positive reac-

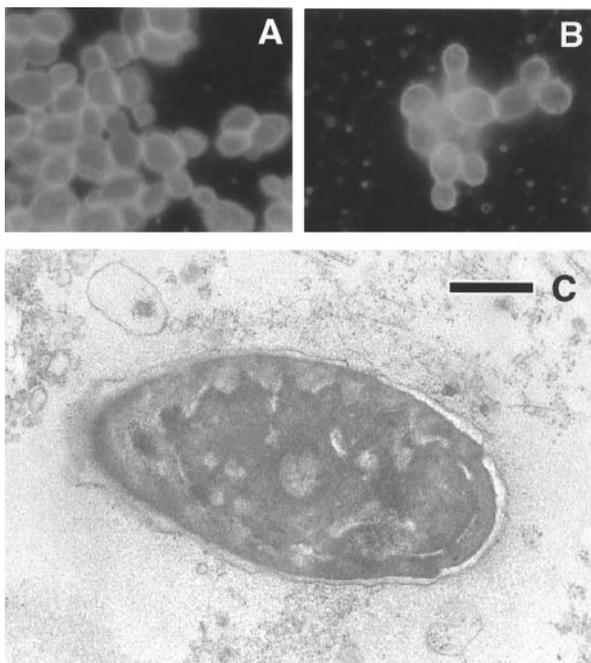


FIG. 1. Morphological analyses of yeast cells. Comparison of *C. famata* from the conjunctival exudate (A) with the type culture isolate (B) by immunofluorescence analysis. Immunofluorescence was carried out as described in Materials and Methods. (C) Electron microscopy of yeast cells present in the conjunctival exudates in September 1999. The exudate was placed in PBS and centrifuged. The pellet was processed for electron microscopy. Bar, 200 nm.

tions to several other fungi were detected, as indicated in Fig. 4B. The patient's skin was the most reactive to *C. albicans*, while no reaction to *Saccharomyces cerevisiae* was detected. Together, these data reflect a generalized immune response of the patient to the yeast *C. famata*.

Antifungal treatments. Since *C. famata* was isolated and the immunological results pointed to infection with this organism, antifungal treatment was started in November 1999. Initially, fluconazole (200 mg daily for 1 month) and then itraconazole (100 mg daily for 3 months) were administered orally. These treatments improved some of the clinical symptoms, including photophobia and the retarded pupillary reflex, and the findings on fundoscopic analysis were better. Since the patient's vision itself did not improve after the treatment and *C. famata* was still abundant in the conjunctival exudates, the two antifungals mentioned above were administered for different periods over the next 2 years. Our analysis showed that the MICs of fluconazole and itraconazole for the initial isolate were 60 and 30 $\mu\text{g/ml}$, respectively. These values indicate that the sensitivity of the yeast isolate to these two compounds was poor (24, 36, 37). Perhaps this was reflected by the poor response to treatment with these two antifungal compounds, since PCR analyses demonstrated the continuous presence of *C. famata* in the exudates. However, the infection probably diminished to some extent, considering the improvement in the patient's symptoms. Voriconazole was then approved for clinical use and represented a better choice for the treatment of this infection, as this compound is much more effective against *C. famata* (MIC, 0.5 $\mu\text{g/ml}$) (31, 35, 42). Therefore, this treatment was

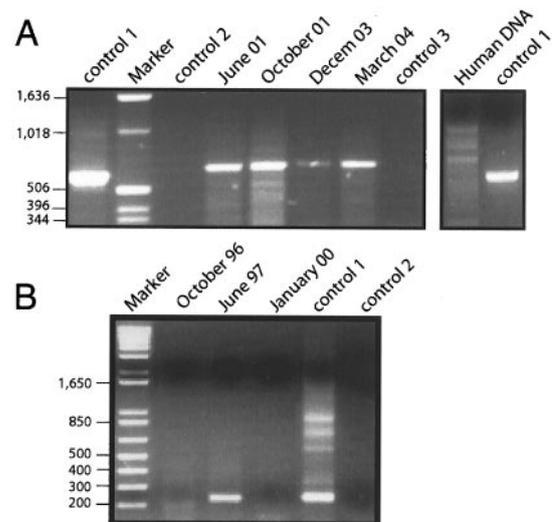


FIG. 2. PCR assays. (A) PCR of different conjunctival exudate samples. DNA extracted from the exudates was analyzed by PCR, as indicated in Materials and Methods. (B) PCR analysis of different blood serum samples. A total of 200 μl of blood serum obtained from the patient on the dates indicated above the lanes was used for the extraction of total DNA. PCR assays were carried out with oligonucleotides that amplify a region of the rRNA internal transcribed spacer genes. Control 1, positive control consisting of DNA extracted from *C. famata*; control 2, negative PCR control without DNA; control 3, negative control of DNA extraction consisting of phosphate buffer. The numbers to the left of each gel are in base units.

implemented in May 2003. The oral administration of voriconazole (150 mg every 12 h) led to a huge increase in photopsias within 1 h after intake. This suggests that whatever was present in the retina responded to voriconazole within minutes. However, this treatment was discontinued after 3 months due to hepatotoxicity problems. In summary, the antifungal compounds improved the patient's clinical symptoms, although it must be kept in mind that some fungal ocular infections are difficult to treat (18). Clinical trials are urged to establish both the most efficacious compound and the dosage for the treatment of these infections.

DISCUSSION

Despite efforts during the last few years to elucidate the cause of AZOOR, this has not been achieved. The suggestion that AZOOR is an autoimmune disorder has not been substantiated by experimental evidence. In fact, patients have been negative for the presence of autoantibodies, including the patient described in this report, when they have been analyzed for these antibodies. Epstein-Barr virus has been implicated in multifocal choroiditis (47). The possibility that an undefined virus infection provokes AZOOR has also been suggested (13). However, no report of the isolation of a virus related to this disease has ever been published. The infectious character of this retinopathy was suspected soon after its description (14). In this report we describe a single case of AZOOR in a patient infected with *C. famata*. Additional patients should be investigated to establish a cause-effect relationship between fungal infection and AZOOR. Nevertheless, the present findings

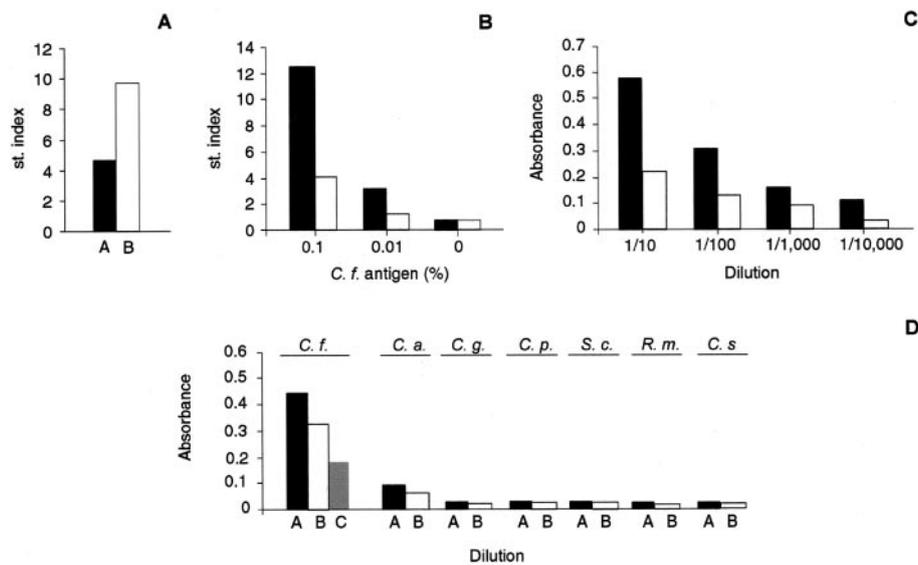


FIG. 3. T-cell proliferation and *C. famata* antibodies. (A) T cells from the patient described in this report (bar A) and from an anonymous donor (bar B) were obtained in October 1999, as indicated in Materials and Methods. The T cells obtained were incubated with (black bars) or without (empty bars) phytohemagglutinin. (B) T cells from the patient (black bars) or from the donor (empty bars) were incubated with different dilutions of a preparation of *C. famata*, as indicated. Data are presented as stimulation (st.) indices, defined as follows: counts per minute of [^3H]thymidine obtained in the presence of mitogen or antigen divided by the basal counts per minute in their absence. (C) ELISA analysis of the antiserum obtained in October 1999 from the patient (black bars) and an anonymous donor (empty bars). The assay was carried out as described in Materials and Methods. (D) Results of the ELISA of the patient serum used at different dilutions (bars A, 1:100; bars B, 1:200; bars C, 1:400) in the anterior panel for activity against different yeast species. *C.f.*, *C. famata*; *C.a.*, *C. albicans*; *C.g.*, *Candida glabrata*; *C.p.*, *Candida parapsilosis*; *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *R.m.*, *Rhodotorula mucilaginosa*; *C.s.*, *Cryptococcus saitoi*.

open the possibility that a fungal infection may be the cause of this affliction. This idea is consistent with the available evidence that we have about the characteristics of AZOOR. Indeed, some clinical similarities with histoplasmosis syndrome,

another fungal infection, were noted in the retina (9, 17). The evolution of AZOOR over the course of years with several recurrences, depending on the patient (14), is consistent with the progress of some fungal infections, since fungi usually grow slowly compared to the rates of growth of some bacteria and viruses, and the infections are recurrent. Chronicity and the recurrence of MEWDS have also been pointed out (48). Some fungal infections are insidious and difficult to diagnose. Ocular infections caused by *C. albicans* are easily identified by ophthalmologic examination, but this may not be the case with other less inflammatory yeast infections. A number of differences exist, depending on the yeast species. For instance, *C. albicans* is pathogenic and generates clear inflammatory signs, while *C. famata* possesses anti-inflammatory properties (10). This may explain, at least in part, the elusive nature of this infection.

Other characteristics of AZOOR also fit well with the idea that it has a fungal etiology. For instance, in addition to the pale, white aspect of the eye fundus, the retention of fluorescein may also reflect the presence of fungal cells or mucous material at the retina and choroidal vessels. Another point of interest is that *C. famata* may provoke infection of the CNS (39). This may explain why the CNS was also implicated in one case of AZOOR (19).

The isolation of *C. famata* from the conjunctival exudates and the blood serum of the patient may be directly related to AZOOR or may represent a secondary infection due to an as yet unidentified immunological disorder. Several results are consistent with a direct connection between AZOOR and *C. famata* infection in the patient described in this report. One of

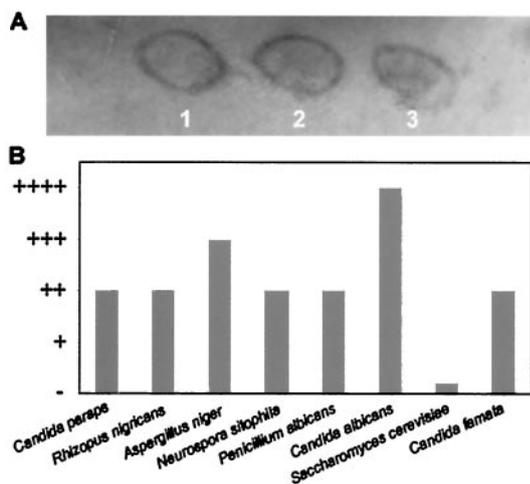


FIG. 4. Delayed hypersensitivity test. (A) *C. famata* was autoclaved and lyophilized before it was mixed with petrolatum under sterile conditions. Petrolatum alone (lane 1) or petrolatum mixed with 0.2 g of *C. famata* per ml (lane 2) or 0.5 g of *C. famata* per ml (lane 3) was applied to the patient's skin in October 1999. The photograph was taken 24 h later. (B) Different fungal cells were obtained and mixed with petrolatum at 0.5 g/ml. The different preparations were applied to the patient's skin, and hypersensitivity was observed 24 h after application. *Candida paraps*, *Candida parapsilosis*.

them is that the yeast was more abundant in the exudate from the left eye, which was more affected. Another piece of evidence was the response to antifungal treatments, as discussed below. The recalcitrant nature of fungal infections when they are treated by chemotherapy may explain why the yeast was still present at the conjunctiva even after prolonged treatment.

Little is known about the immune response provoked by non-*C. albicans* species. The present findings indicate that there was an immune response against *C. famata* in this AZOOR patient. This was shown both by the increased antibody titer and by the presence of antigen-specific T lymphocytes. Certainly, the immune system of the patient responded to *C. famata*.

No clear positive effects of corticosteroid treatment were found in some patients (17), particularly those on a long-term treatment regimen. This agrees well with the notion of the infective nature of this disease. The antifungal treatment of the patient described here certainly brought about improvements in several clinical symptoms. Thus far, however, the fungus has not been eradicated from the retina and perhaps other places, including the conjunctival mucosa. We believe that the infection described here has diminished through the implementation of antifungal therapy, but longer and more effective treatments will be necessary. In this sense, contrary to *C. albicans*, *C. famata* is less sensitive to fluconazole and itraconazole, thus accounting for their only moderate effectiveness. Voriconazole and, more particularly, posaconazole have greater inhibitory effects on *C. famata*, at least under laboratory conditions (35). The fact that voriconazole enhanced the photopsias at the retina within minutes after its intake in this patient may reflect the response of the yeast present there. Notably, this enhancement of photopsias was much more pronounced in the left eye, which was more affected than the right eye. In conclusion, the unsuspected possibility that *C. famata* may be responsible for AZOOR has obvious repercussions in investigations of the etiology of other related retinopathies (21).

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to the Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE) for help and financial support. The institutional grant to Centro de Biología Molecular from Fundación Ramón Areces is acknowledged.

We thank M. Lombardero (Alergia e Inmunología, ALK-Abelló, S.A. Madrid, Spain) for help with the hypersensitivity assays.

REFERENCES

- Al-Hedaithy, S. S. 2003. The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. *Mycoses* **46**:293–298.
- Altamura, M., D. Casale, M. Pepe, and A. Tafaro. 2001. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* **1**:189–197.
- Andrighetto, C., E. Psomas, N. Tzanetakis, G. Suzzi, and A. Lombardi. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:5–9.
- Andriole, V. T. 1998. Current and future therapy of invasive fungal infections. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* **18**:19–36.
- Brown, J., Jr., and J. C. Folk. 1998. Current controversies in the white dot syndromes. Multifocal choroiditis, punctate inner choroidopathy, and the diffuse subretinal fibrosis syndrome. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **6**:125–127.
- Bryan, R. G., K. B. Freund, L. A. Yannuzzi, R. F. Spaide, S. J. Huang, and D. L. Costa. 2002. Multiple evanescent white dot syndrome in patients with multifocal choroiditis. *Retina* **22**:317–322.
- Clemons, K. V., V. L. Calich, E. Burger, S. G. Filler, M. Graziutti, J. Murphy, E. Rolidés, A. Campa, M. R. Dias, J. E. Edwards, Jr., Y. Fu, G. Fernandes-Bordignon, A. Ibrahim, H. Katsifa, C. G. Lamaignere, L. H. Meloni-Bruneri, J. Rex, C. A. Savary, and C. Xidieh. 2000. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Med. Mycol.* **38**:99–111.
- Coleman, D. C., M. G. Rinaldi, K. A. Haynes, J. H. Rex, R. C. Summerbell, E. J. Anaissie, A. Li, and D. J. Sullivan. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med. Mycol.* **36**:156–165.
- Dreyer, R. F., and D. J. Gass. 1984. Multifocal choroiditis and panuveitis. A syndrome that mimics ocular histoplasmosis. *Arch. Ophthalmol.* **102**:1776–1784.
- Garcia-Gonzalez, A., and J. L. Ochoa. 1999. Anti-inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD. *Arch. Med. Res.* **30**:69–73.
- Gardini, F., G. Suzzi, A. Lombardi, F. Galgano, M. A. Crudele, C. Andrighetto, M. Schirone, and R. Tofalo. 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res.* **1**:161–167.
- Gass, J. D. 1993. Acute zonal occult outer retinopathy. Donders Lecture: The Netherlands Ophthalmological Society, Maastricht, Holland, June 19, 1992. *J. Clin. Neuroophthalmol.* **13**:79–97.
- Gass, J. D. 2003. Are acute zonal occult outer retinopathy and the white spot syndromes (AZOOR complex) specific autoimmune diseases? *Am. J. Ophthalmol.* **135**:380–381.
- Gass, J. D., A. Agarwal, and I. U. Scott. 2002. Acute zonal occult outer retinopathy: a long-term follow-up study. *Am. J. Ophthalmol.* **134**:329–339.
- Hariprasad, S. M., W. F. Mieler, E. R. Holz, H. Gao, J. E. Kim, J. Chi, and R. A. Prince. 2004. Determination of vitreous, aqueous, and plasma concentration of orally administered voriconazole in humans. *Arch. Ophthalmol.* **122**:42–47.
- Helbig, H., F. Sutter, and A. Tholen. 2001. Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR). *Ophthalmologie* **98**:574–578.
- Holz, F. G., R. Y. Kim, S. D. Schwartz, C. A. Harper, J. Wroblewski, G. B. Arden, and A. C. Bird. 1994. Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR) associated with multifocal choroidopathy. *Eye* **8**:77–83.
- Ishibashi, Y. 1998. Refractory mycosis in ophthalmology. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **39**:211–212.
- Jacobson, D. M. 1996. Acute zonal occult outer retinopathy and central nervous system inflammation. *J. Neuroophthalmol.* **16**:172–177.
- Jacobson, S. G., D. S. Morales, X. K. Sun, W. J. Feuer, A. V. Cideciyan, J. D. Gass, and A. H. Milam. 1995. Pattern of retinal dysfunction in acute zonal occult outer retinopathy. *Ophthalmology* **102**:1187–1198.
- Jampol, L. M., and A. Wiredu. 1995. MEWDS, MFC, PIC, AMN, AIBSE, and AZOOR: one disease or many? *Retina* **15**:373–378.
- Jampol, L. M., P. A. Sieving, D. Pugh, et al. 1984. Multiple evanescent white dot syndrome. I. Clinical findings. *Arch. Ophthalmol.* **102**:671–674.
- Kam, A. P., and J. Xu. 2002. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **43**:19–28.
- Kawakami, S., Y. Ono, Y. Miyazawa, and H. Yamaguchi. 1998. Survey of fungemia cases during the past seventeen years at Teikyo University Hospital. *Kansenshogaku Zasshi* **72**:105–113.
- Krcmery, V., and A. Kunová. 2000. *Candida famata* fungemia in a cancer patient: case report. *J. Chemother.* **12**:189–190.
- Krcmery, V., and A. J. Barnes. 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.* **50**:243–260.
- Lardenoye, C. W., A. Van der Lelij, W. S. de Loos, W. F. Treffers, and A. Rothova. 1997. Peripheral multifocal chorioretinitis: a distinct clinical entity? *Ophthalmology* **104**:1820–1826.
- Lee, A. G., and T. C. Prager. 1996. Acute zonal occult outer retinopathy. *Acta Ophthalmol. Scand.* **74**:93–95.
- Li, Y. L., S. N. Leaw, J. H. Chen, H. C. Chang, and T. C. Chang. 2003. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:693–696.
- Mamalis, N., and M. J. Daily. 1987. Multiple evanescent white-dot syndrome. A report of eight cases. *Ophthalmology* **94**:1209–1212.
- Maxwell, M. J., S. A. Messer, R. J. Hollis, L. Boyken, S. Tendolkar, D. J. Diekema, and M. A. Pfaller. 2003. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1087–1090.
- Nishikawa, A., T. Sugita, and T. Shinoda. 1999. Rapid identification of *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* by polymerase chain reaction. *Med. Mycol.* **37**:101–104.
- Penk, A., and L. Pittrow. 1998. Status of fluconazole in the therapy of endogenous *Candida* endophthalmitis. *Mycoses* **41**:41–44.
- Pfaller, M. A. 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.* **22**:S89–S94.
- Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, R. J. Hollis, and R. N. Jones. 2003. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* **41**:78–83.
- Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, A. C. Fluit, J. Verhoef, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman, and R. J. Hollis. 1999. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European Sentry Program: species distribution and antifungal susceptibility in-

- cluding the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **35**:19–25.
37. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, R. J. Hollis, C. Rice, S. Tendolkar, and D. J. Diekema.** 2004. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**:201–205.
 38. **Pimentel-Muñoz, F. X., M. A. Muñoz-Fernández, and M. Fresno.** 1994. Control of T lymphocyte activation and IL-2 receptor expression by endogenously secreted lymphokines. *J. Immunol.* **152**:5714–5722.
 39. **Prinsloo, B., G. F. Weldhagen, and R. W. Blaine.** 2003. *Candida famata* central nervous system infection. *S. Afr. Med. J.* **93**:601–612.
 40. **Rao, N. A., A. V. Nerenberg, and D. J. Forster.** 1991. *Torulopsis candida* (*Candida famata*) endophthalmitis simulating *Propionibacterium acnes* syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **109**:1718–1721.
 41. **Reis, A., R. Sundmacher, K. Tintelnot, H. Agostini, H. E. Jensen, and C. Althaus.** 2000. Successful treatment of ocular invasive mould infection (fusariosis) with the new antifungal agent voriconazole. *Br. J. Ophthalmol.* **84**:932–933.
 42. **Rubio Calvo, M. C., J. Gil, I. Ramirez de Ocariz, R. Benito, and A. Rezusta.** 2003. In vitro activity of fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida* spp. *Rev. Esp. Quimioter.* **16**:227–232.
 43. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 44. **Smetana, S., S. S. Feman, and C. Kleber.** 2003. The retinal features of acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR). *Arch. Ophthalmol.* **121**:914–915.
 45. **Smiddy, W. E.** 1998. Treatment outcomes of endogenous fungal endophthalmitis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **9**:66–70.
 46. **St-Germain, G., and M. Laverdiere.** 1986. *Torulopsis candida*, a new opportunistic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **24**:884–885.
 47. **Tiedeman, J. S.** 1987. Epstein-Barr viral antibodies in multifocal choroiditis and panuveitis. *Am. J. Ophthalmol.* **103**:659–663.
 48. **Tsai, L., L. M. Jampol, S. Pollock, and J. Olk.** 1994. Chronic recurrent multiple evanescent white dot syndrome. *Retina* **14**:160–163.
 49. **Turbeville, S. D., L. D. Cowan, and J. D. Gass.** 2003. Acute macular neuroretinopathy: a review of the literature. *Surv. Ophthalmol.* **48**:1–11.
 50. **Verougstraete, C.** 2001. White spots syndromes. *Bull. Soc. Belge Ophthalmol.* **279**:67–78.
 51. **Volpe, N. J., J. R. Rizzo III, and S. Lessell.** 2001. Acute idiopathic blind spot enlargement syndrome: a review of 27 new cases. *Arch. Ophthalmol.* **119**:59–63.
 52. **White, T. H., K. A. Marr, and R. A. Bowde.** 1998. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382–402.
 53. **Wright, R., M. Basson, L. D'Ari, and J. Rine.** 1988. Increased amounts of HMG-CoA reductase induce “karmellae”: a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J. Cell Biol.* **107**:101–114.
 54. **Yarrow, D.** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, p. 77–100. *In* C. P. Kurtzman and J. W. Fell (ed.), *The yeasts. A taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

Asunto: JMM Paper 47042

De: Fritz Mühlshlegel <F.A.Muhlshlegel@kent.ac.uk>

Fecha: Jue, 25 de Enero de 2007, 6:50 pm

Para: lcarrasco@cbm.uam.es

Cc: mikros@sgm.ac.uk

Prioridad: Normal

Opciones: [Ver encabezado completo](#) | [Vista preliminar](#) | [Ver detalles](#)

"EVOLUTION OF ANTIBODY RESPONSE AND FUNGAL
ANTIGENS IN THE SERUM OF A PATIENT INFECTED WITH CANDIDA FAMATA"

Dear Dr Carrasco,

I apologize for the delay in getting back to you.

I had a difficult time in chasing up one of the
original referees of your manuscript.

I am very pleased to inform you that your work has
been positively reviewed and that 3 independent
referees now suggest your work to be accepted for publication.

Please refer any further correspondence on the
status of your manuscript to the JMM editorial office.

Congratulations again and I sincerely apologize for the delay.

Yours,

Fritz Mühlshlegel

1

2

3 EVOLUTION OF ANTIBODY RESPONSE AND FUNGAL ANTIGENS IN THE
4 SERUM OF A PATIENT INFECTED WITH *CANDIDA FAMATA*

5

6

7

8 Diana Pisa, Marta Ramos, Susana Molina, Patricia García and Luis Carrasco*

9

10

11

12

13 * Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular

14 (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma,

15 Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-1-4978450. Fax: 34-1-4974799.

16 E-mail: lcarrasco@cbm.uam.es.

17

18

19

20 Running title: Antibodies against *C. famata*

21

22 Key words: Human antibodies; *Candida famata*; yeast antigens

1 **SUMMARY**

2 The presence of both fungal antibodies and antigens in the serum of a patient with
3 acute zonal occult outer retinopathy caused by *Candida famata* infection has been
4 examined. Antibodies against *C. famata* increased until 1999-2000 when antifungal
5 treatment was initiated. The antibodies were detected by ELISA and immunofluorescence
6 analysis using *C. famata*. These antibodies were not immunoreactive against several candida
7 species tested. Positive immunofluorescence was obtained with IgM, but not IgA, IgG or
8 IgE. Moreover, the IgM response disappeared several months after treatment with antifungal
9 compounds, despite the fact that *C. famata* antigens were present in blood. Finally, a
10 sensitive test was developed to assay for the presence of *C. famata* antigens in serum. This
11 method is based on the immunodetection of fungal antigens transferred to a nitrocellulose
12 membrane that is incubated with rabbit antibodies rose against *C. famata*. According to this
13 method, the infection remitted with antifungal treatment.

14

1 INTRODUCTION

2 The immunologic response to fungal infections in humans is complex and still
3 subject to much debate (Coleman *et al.*, 1998; d'Ostiani *et al.*, 2000; Gil, 1997; Lopez-Ribot
4 *et al.*, 2004; Mencacci, 1999; Pfaller, 1996; Shoham & Levitz, 2005). Cellular response,
5 particularly macrophage function may be crucial to combat systemic infections produced by
6 different fungi (Badauy *et al.*, 2005; d'Ostiani *et al.*, 2000; Simitsopoulou & Roilides, 2005;
7 Villar *et al.*, 2005). However, the importance of a robust antibody response to candida
8 infections has also been documented (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004; Mencacci, 1999;
9 Witkin *et al.*, 1983). The fact that systemic candidiasis is much more common in
10 immunocompromised patients evidences the key role of the immune system in preventing
11 this infection (Altamura *et al.*, 2001; Clemons *et al.*, 2000; Ruhnke, 2006; Sims *et al.*,
12 2005). Cellular immune response, together with the humoral response and innate immunity
13 are most likely necessary for an efficient control of this type of systemic infection
14 (Altamura *et al.*, 2001; Lopez-Ribot *et al.*, 2004). Although many studies have described the
15 immune response in human candidiasis (Lopez-Ribot *et al.*, 2004; Mencacci, 1999; Rozell
16 *et al.*, 2006), hardly any have attempted to characterize the antibodies of patients infected
17 with *C. famata*.

18 *Candida* spp. accounts for a large percentage of human fungal infections. Apart from
19 *Candida albicans*, which represents about 50% of blood isolates (Canteros *et al.*, 1994;
20 Peres-Bota *et al.*, 2004), other species such as *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*,
21 and *C. krusei*, have been found in the blood of infected patients (Al-Hedaithy, 2003;
22 Almirante *et al.*, 2006; Brandt *et al.*, 2000; Fanci *et al.*, 2005; Veldman *et al.*, 2006; Wagner
23 *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2003). Viable *C. famata* has been found in about 1-2% of patients

1 suffering systemic candidiasis (Al-Hedaithy, 2003; Canteros *et al.*, 1994; Krcmery &
2 Barnes, 2002; Peres-Bota *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2003; Prinsloo *et al.*, 2003; Ruhnke,
3 2006; Tortorano *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2002), but analysis of the presence of
4 genomes by PCR yields a different percentage (Deventer, 1995; Khan & Mustafa, 2001;
5 Pryce *et al.*, 2003). Although *C. famata* is considered non-pathogenic (Andrighetto *et al.*,
6 2000; Gardini *et al.*, 2001), it has been found in tissues as diverse as bone, blood or the
7 CNS, and is associated with vision problems (Krcmery & Kunova, 2000; Prinsloo *et al.*,
8 2003; Rao *et al.*, 1991; St-Germain & Laverdiere, 1986). Recent evidence suggests that *C.*
9 *famata* was the etiological agent responsible for acute zonal occult outer retinopathy
10 (AZOOR). We now report in detail the antibody response in an AZOOR patient previously
11 described (Carrasco *et al.*, 2005). We also monitored the course of infection using different
12 methods. Correct diagnosis of disseminated candidiasis is still elusive in some patients;
13 thus, different approaches are needed to demonstrate disseminated fungal infection (Ellepola
14 & Morrison, 2005; Pontón, 2006; Yeo & Wong, 2002). In most hospitals, hemocultures are
15 the main routine assay for detecting disseminated candidiasis (Ellepola & Morrison, 2005).
16 However, unlike systemic candidiasis, viable candida cells are very seldom present in
17 disseminated infections. PCR can overcome this problem but at least one fungal genome per
18 assay must be present to determine the presence of yeast cells in blood (Bretagne & Costa,
19 2005). Other methods are based on detecting fungal metabolites or other components, like
20 proteins or polysaccharides in blood serum (Ishibashi *et al.*, 2005; Mitsutake *et al.*, 1996;
21 Pontón, 2006). Some of these methods detect specific proteins, such as glycolytic enzymes,
22 heat-shock proteins or secreted proteases. The use of immunological assays to evidence the
23 presence of these proteins in human blood serum constitutes a more sensitive test to

1 diagnose disseminated candidiasis. Diverse commercial kits have been developed to assay
2 the presence of polysaccharides such as manans or glucans in serum. We compared all these
3 techniques in serum samples taken at different times from a patient infected with *C. famata*.
4 Our results suggest that analysis of fungal proteins in serum constitutes the most sensitive
5 test to monitor the course of this infection.

6

1 **METHODS**

2 **Yeast growth.** The yeast was grown in YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2%
3 glucose) by incubation at 30°C. The same medium, containing agar, was used to isolate
4 individual yeast colonies.

5 **Antibodies.** Rabbit antisera against different yeast species were obtained by inoculation of
6 0.5 ml of phosphate buffered sorbitol (PBS) containing 1 or 2 mg of yeast after autoclaving
7 and lyophilization. Each inoculum had been previously mixed with the same volume of
8 Freund's adjuvant. Rabbits were inoculated up to four times, and the antibody titer and
9 specificity of the sera were tested by immunofluorescence and Western blotting.

10 **Immunofluorescence and immune-electron microscopy.** For *C. famata*, 1 ml of culture
11 was placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes. Cells were washed with PBS, incubated with 50
12 mM ammonium chloride for 10 min, and washed three times with PBS-Tween 20. Cells
13 were then treated with the different sera diluted 1:500 in PBS-Tween 20, at 37°C for 2 h,
14 washed again with PBS-Tween 20 and incubated with the secondary antibody. Goat anti-
15 human immunoglobulins IgA, IgM and IgG (Sigma), or rabbit anti IgG+IgA+IgM (Abcam),
16 conjugated to fluorescein antibodies, were added at 1:500 dilution; in some cases anti-IgG₄
17 and IgE antibodies were used (a generous gift from M. Lombardero, ALK, Abelló, Madrid).
18 In these cases, samples were then incubated with an anti-Ig fluorescein-conjugated antibody.
19 The samples were incubated at 37°C for another hour. The cells were then washed,
20 resuspended in PBS and mounted on slides with a drop of Depex (Serva). Finally, the cells
21 were observed under a fluorescence microscope. For the remaining candida species, the
22 commercial kit Euroimmun (Medizinische Labordiagnostika AG) was used in accordance

1 with the manufacturer's instructions and using the same serum dilutions as for *C. famata*.
2 For immune electron microscopy, we followed the protocol described elsewhere (Wright *et*
3 *al.*, 1988), with a few modifications: the cells were fixed for 2 h at room temperature in 2%
4 glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and washed after postfixation with
5 0.15% tannic acid in 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2). Cells were finally embedded in
6 Epon (TAAB laboratories, Berkshire, United Kingdom). The sections were rehydrated in
7 PBS and immersed in 0.5 M NH₂Cl for 15 minutes. Samples were then blocked with 1%
8 BSA in PBS, incubated for 1 hour with the primary antibody diluted in 1% low-fat dry milk
9 in PBS at room temperature, and subsequently washed with 0.1% BSA in PBS. After
10 washing, secondary antibody conjugated to colloidal gold particles was added at 1:10000
11 dilution in PBS. Finally, samples were washed again with PBS and once again with triply-
12 distilled water. The samples were analyzed with a JEOL 1010 electron microscope.

13 **ELISA.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out as previously
14 described (Carrasco *et al.*, 2005). Briefly, a *C. famata* cell suspension diluted in PBS was
15 seeded in ELISA microtiter plates (Maxisorp; Nunc). Blockade was carried out in PBS
16 containing 3% low-fat dry milk and 0.2% Tween 20. Sera from the AZOOR patient were
17 added at 1:200 dilution and plates were subsequently incubated with goat anti-human (heavy
18 and light chain) immunoglobulin G horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Pierce)
19 and washed five times. Color development was accomplished by incubation with *o*-
20 phenylenediamine (Sigma) and measured at 490 nm in a microplate reader (EL340; BIO-
21 TEK Instruments).

1 **Western blot assays.** Yeast proteins were precipitated with trichloroacetic acid (10%) and
2 fractionated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
3 with 15% polyacrylamide, transferred to nitrocellulose membranes by wet immunotransfer,
4 and processed for Western blotting. Blocking, incubation with antibodies and washing were
5 performed as described for ELISA. Goat anti-human IgM horseradish peroxidase-
6 conjugated antibodies (Amersham Biosciences) and the ECL kit (Amersham) were used to
7 detect bound antibodies. Chemiluminescence was detected by exposure to Agfa X-ray film.

8 **PCR analyses.** The DNA was extracted from serum or whole blood. To this end, 200 μ l of
9 serum were boiled for 10 minutes and then incubated for 2 h at 37°C with Zimolase (ICN)
10 and for a further 2 hours at 58°C with proteinase K (Sigma). Then 200 μ l of a detergent
11 buffer were added and samples were boiled again for 10 minutes before adding 1 ml of
12 phenol:chloroform (1:1) (Amersham) and centrifuging at 20000 \times g for 20 min. The upper
13 aqueous phase was recovered and washed twice with ethyl ether. The DNA was precipitated
14 by addition of 3 volumes of absolute ethanol (Merck) (-20°C) to the aqueous phase. After
15 storing the samples overnight at -20°C , the DNA was then centrifuged at 20000 \times g for 20
16 min. Pellets were dried and resuspended in H_2O . The DNA preparations were incubated
17 with oligonucleotides that hybridize to the rRNA genes (Li *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*,
18 1999). In this manner, the first ITS region was amplified. The amplified product was
19 analyzed by agarose gel electrophoresis. The corresponding band was sequenced to
20 determine unequivocally the presence of *C. famata* genomes. Real time quantitative PCR
21 was carried out in an ABI PRISM 7000 thermocycler (*Applied biosystems*). The reaction
22 mix was prepared with 0.9 μM of each oligonucleotide and 0.25 μM of TaqMan probe in a

1 final volume of 20 μ l, to which 50 ng of DNA were added. The concentration of DNA
2 template was normalized by previous PCR reactions with specific oligonucleotides, in
3 which DNA was denatured at 95°C for 10 minutes and amplified in 40 cycles of 15 seconds
4 at 95°C and 1 minute at 60°C. Analysis of the data was done using the *SDS 7000 (1.1)*
5 software.

6 **Dot-Blot analyses.** 200 μ l of different serum dilutions in TBS were added to each well.
7 Samples were blotted onto a 45 mm nitrocellulose membrane (Bio-Rad) previously hydrated
8 in TBS for 10 minutes using the Bio-Dot SF apparatus (Bio-Rad). After blotting, the
9 membrane was processed and developed as described above for Western blotting. The
10 primary antibodies, rabbit polyclonal antibodies rose against *C. famata*, *C. albicans*, *C.*
11 *glabrata*, *C. parasilopsis*, *Rhodotorula mucilaginosa* or *Saccharomyces cerevisiae* were
12 used at 1:1000 dilution. We used a donkey anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-
13 conjugated antibody (Amersham Biosciences) at 1:5000 dilution as secondary antibody.

14 **Detection of fungal polysaccharides.** The presence of manoses and beta-1,3 glucan in
15 serum was detected using the Platelia Candida AG test (Bio-Rad), as described by the
16 manufacturer, or the Fungitell Serum Assay kit, performed by Fontlab laboratories
17 (Barcelona, Spain) (Pazos *et al.*, 2005).

1 **RESULTS AND DISCUSSION**

2 The characteristics of our patient have been previously described (Carrasco *et*
3 *al.*, 2005). Briefly, the patient was diagnosed with acute zonal occult outer retinopathy
4 (AZOOR) in 1996 (aged 47). In 1999, *C. famata* was isolated from conjunctival exudate and
5 blood. At the end of this year, intermittent antifungal treatment was administered as
6 described (Carrasco *et al.*, 2005). Initially, the presence of anti-*C. famata* antibodies from
7 serum obtained from different years was analyzed by ELISA (Figure 1A). The *C. famata*
8 antibody titer increased until 1999. After administration of antifungal compounds, a clear
9 decrease in the antibody titer was observed and it has remained low ever since. Analysis of
10 these antibodies by immunofluorescence using *C. famata* also corroborated this observation
11 (Figure 1B). Thus, positive immunofluorescence appeared with the sera obtained in June
12 1999, September 1999 and January 2000. Low reactivity was found with sera from June
13 1996 and August 2001, while no antibodies were detected from serum obtained in October
14 2005. The immunofluorescence observed with other yeast species was similar to the
15 negative control without primary antibody. Only a slight reaction with *C. tropicalis*
16 appeared suggesting that the antibodies were fairly specific against *C. famata* in the
17 immunofluorescence test. In our experience, some human sera do react with *C. tropicalis* in
18 the Euroimmune test. Therefore, we consider this reactivity as non-specific. Next, we
19 wanted to analyze the type of antibodies present in the positive serum from 1999. For this, a
20 second anti-human antibody specific for IgA, IgM, IgG, IgG4 or IgE was employed after
21 incubation of *C. famata* with this serum (Figure 2). Interestingly, this assay revealed the
22 presence of IgM but not IgG antibodies, even though the patient had been infected over
23 several years. On the other hand, these IgM antibodies were not cross-reactive with *C.*

1 *albicans* (Figure 2). This serum was also analyzed by Western blotting against *C. famata*
2 proteins. Figure 3A shows that there are two yeast proteins that immunoreact better with
3 serum from September 1999. These two proteins, of about 41 and 30 KDa, reacted more
4 weakly with sera from October 2005, January 2006 and the control healthy donor. In
5 addition, there are other proteins that immunoreact non-specifically with all the sera
6 employed, such as the 47 KDa protein. Western blotting using *C. albicans* proteins reveals a
7 low reactivity with the patient's serum, as compared to a serum from a control patient
8 infected with *C. albicans*. Moreover, no immunoreactivity was found against proteins from
9 *Cryptococcus magnus* (Figure 3A). Immuno-gold using electron microscopy analysis was
10 carried out (Figure 3B). This human antiserum clearly reacted with antigens at or in close
11 proximity to the plasma membrane of *C. famata*. For comparison, a rabbit antiserum rose
12 against this yeast was employed. It was noteworthy that both human and rabbit antisera
13 recognized a similar structure close to the plasma membrane.

14 Since the vision symptoms have not yet fully resolved, we tried to detect the
15 presence of *C. famata* infection using PCR. DNA was extracted from serum submitted to
16 PCR out using oligonucleotides that amplify the first intervening sequence between the
17 rRNA genes, as described. Real-time quantitative PCR using TaqMan probes was carried
18 out with different samples (Figure 4A). Evidence for the presence of *C. famata* genomes in
19 the blood sera of this patient was found in the samples from October 1996 and June 1997,
20 despite the fact that no viable yeast cells were recovered from these hemocultures. Further,
21 the presence of fungal genomes clearly diminished from June 1999 even though some
22 symptoms of infection remained in this patient, such as the appearance of *C. famata*
23 genomes in conjunctival exudates. The decrease of fungal genomes in blood since October

1 1996 probably corresponded to the discontinuation of immunosuppression therapy from the
2 end of that year. These findings indicate that the presence of *C. famata* can be evidenced by
3 PCR in samples that contain few antibodies and, conversely, no fungal genomes are found
4 at the peak of the antibody response. To confirm that the fungal genomes amplified in figure
5 4A were from *C. famata*, the amplified product obtained from another PCR reaction was
6 separated by agarose gel electrophoresis (Figure 4B). A single product of about 240 nt is
7 apparent in the serum from June 1997, which corresponds to the same band obtained from
8 *C. famata* DNA. This band was extracted and sequenced revealing that it indeed belonged to
9 *C. famata*. Although no fungal genomes were detected by PCR from January 2000,
10 abundant *C. famata* genomes were evidenced in a number of conjunctival exudates obtained
11 up until May 2006 (data now shown).

12 Since no *C. famata* genomes were detected in sera from recent years, we aimed to
13 develop a system to detect the presence of fungal antigens in the blood serum. Our attempts
14 to find fungal proteins by Western blotting using a rabbit antiserum rose against *C. famata*
15 were unsuccessful. A much more sensitive test is the detection of proteins using the dot-blot
16 assay. In this test, different serum dilutions are transferred to a nitrocellulose membrane that
17 is incubated with the rabbit anti-*C. famata* antibodies. Using this assay, the presence of *C.*
18 *famata* antigens is evident (Figure 5A) and decreased over the years (Figure 5B). This test
19 has the advantage that it can be quantitated by densitometry. Thus, with the 1/500 dilution,
20 there is no immunoreactivity with sera from healthy donors (Figure 5A). On the other hand,
21 the patient serum did not react with rabbit pre-immune serum. Notably, some serum samples
22 from the patient gave high test values, particularly before antifungal treatment was initiated.
23 Despite prolonged administration of antifungal compounds, there was still evidence of

1 fungal antigens using the dot-blot assay. Voriconazole treatment was initiated at the
2 beginning of March 2006 but, curiously, there was an increase in the yeast antigens found in
3 the blood, perhaps reflecting the action of this antifungal compound in tissues where
4 infection persisted. For comparison, the same serum samples were tested for the presence of
5 fungal polysaccharides (Ishibashi *et al.*, 2005). The Bio-Rad test Platelia Candida AG gave
6 negative results in our samples (data not shown), whereas positive values were found when
7 the Fungitell kit was employed. This last test, which measures β -1,3 glucans, indicated the
8 presence of this polysaccharide in the patient's blood over several years, but with large
9 variations in the different samples assayed. The patient had become negative for this test
10 from January 2006 but tested positive with the dot-blot assay. By comparison, the dot-blot
11 assay is much more sensitive than the Fungitell test (Matthews, 1998; Mitsutake *et al.*,
12 1996; Reboli, 1993), although both assays could be run to confirm the existence of fungal
13 infection. Both assays could be useful for a first diagnosis, but the follow-up of the patient
14 should be carried out with the dot-blot test. Serum from a patient may even test negative for
15 both assays even though some residual infection remains in some tissues of the body.

16 Finally, the specificity of the dot-blot assay was analyzed employing several rabbit
17 polyclonal antibodies rose against different yeast species (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C.*
18 *glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Saccharomyces cerevisiae*). The potency and
19 specificity of these antibodies were estimated using immunofluorescence and Western blot
20 assays against the corresponding yeasts. Specific reactivity of the serum was exhibited
21 against *C. famata* antibodies, whereas partial cross-reactivity was found with rabbit
22 antibodies rose against other yeasts but not with the anti-*S. cerevisiae* antibodies (Figure 6).
23 In conclusion, these findings indicate that patient serum contains antigens that are

1 preferentially recognized by *C. famata* antibodies and that partially cross-react with
2 antibodies against other related yeast species.

3 In this work, we have examined in detail one patient infected with *C. famata*, in
4 order to generalize the findings reported, more patients should be studied. Little is known
5 about the human immune response to disseminated infection by *C. famata*. In principle, this
6 yeast has been classified as non-pathogenic and so does not produce an overt inflammatory
7 reaction. *C. famata* may use different strategies to evade immune response, one of them
8 being the production of superoxide dismutase that interferes with macrophage function
9 (Garcia-Gonzalez & Ochoa, 1999). Other strategies common to other yeasts may be the
10 production of a mucous environment, as well as precipitation of calcium carbonate at the
11 sites of infection as a result of the drop in pH associated with fungal metabolic activity. In
12 the patient studied here, the immune response as regards to antibody production was rather
13 weak. The IgM response quickly disappeared after several months of antifungal treatment,
14 even though the infection still remains in the periocular mucosa and probably in the retina
15 and optic nerve. The cellular immune response of this patient measured by the presence of
16 specific T-lymphocytes was also low, despite the fact that he was not immunocompromised
17 and was healthy apart from the vision problems. The rather low stimulation of the immune
18 system observed in this patient may thus be one of the reasons for the prolonged infection
19 described. The stimulation of the immune system certainly may help to combat and
20 eventually to eradicate this infection (Lopez-Ribot *et al.*, 2004).

21 From the point of view of diagnosis, we have developed and compared different
22 approaches to detect *C. famata* infection. Although the presence of the antibody response
23 should be assayed, like other candida infections, this test is of limited diagnostic value

1 (Quindos *et al.*, 2004). It must be stressed that the presence of viable candida in blood was
2 very rarely detected in our patient. Once again, although hemoculture should be done, the
3 absence of yeast growth does not rule out the possibility of a systemic or disseminated
4 infection (Einsele *et al.*, 1997). The use of PCR is of greater value. Although this technique
5 is very sensitive and we can detect a single genome copy present in the test tube in our
6 assays, fungal genomes may not be circulating in the blood, i.e. the yeast may be located at
7 focuses in different tissues without any cells, whether dead or alive, entering the
8 bloodstream (Khan & Mustafa, 2001). Under these conditions, it is possible that the
9 synthesis of polysaccharides may occur or export proteins could reach the blood and these
10 could be detected in the serum (Mitsutake *et al.*, 1996; Pontón, 2006). In this regard, it is of
11 special interest the system developed to analyze *C. famata* antigens by dot blot using a
12 rabbit antiserum. This assay is very sensitive, since the presence of these antigens can be
13 detected at 1/500 or even 1/1000 dilutions. With this test, we can monitor the efficacy of the
14 different antifungal treatments. The amount of protein detected by this method is in the
15 femtomolar range, which is below the limit of detection of Western blotting.

1

2 **ACKNOWLEDGEMENTS**

3

4 The financial support from ONCE (Organización Nacional de Ciegos Españoles) is
5 greatly acknowledged. The Centro de Biología Molecular is financed by an institutional
6 grant from the Fundación Ramón Areces.

7

8

9 **REFERENCES**

- 10 1 **Al-Hedaithy, S. S. (2003)** The yeast species causing fungemia at a university hospital in
11 riyadh, saudi arabia, during a 10-year period *Mycoses* **46** 293-298
- 12 2 **Almirante, B., Rodriguez, D., Cuenca-Estrella, M., Almela, M., Sanchez, F., Ayats,**
13 **J., Alonso-Tarres, C., Rodriguez-Tudela, J. L. and Pahissa, A. (2006)** Epidemiology,
14 risk factors, and prognosis of candida parapsilosis bloodstream infections: Case-control
15 population-based surveillance study of patients in barcelona, spain, from 2002 to 2003 *J*
16 *Clin Microbiol* **44** 1681-1685
- 17 3 **Altamura, M., Casale, D., Pepe, M. and Tafaro, A. (2001)** Immune responses to fungal
18 infections and therapeutic implications *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*
19 **1** 189-197
- 20 4 **Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. and Lombardi, A. (2000)**
21 Randomly amplified polymorphic DNA (rapd) pcr for the identification of yeasts isolated
22 from dairy products *Lett Appl Microbiol* **30** 5-9

1 5 Badauy, C. M., Barbachan, J. J., Rados, P. V., Sant'ana Filho, M. and Chies, J. A.
2 (2005) Relationship between candida infection and immune cellular response in
3 inflammatory hyperplasia Oral Microbiol Immunol **20** 89-92

4 6 Brandt, M. E., Harrison, L. H., Pass, M., Sofair, A. N., Huie, S., Li, R. K., Morrison,
5 C. J., Warnock, D. W. and Hajjeh, R. A. (2000) Candida dubliniensis fungemia: The first
6 four cases in north america Emerg Infect Dis **6** 46-49

7 7 Bretagne, S. and Costa, J. M. (2005) Towards a molecular diagnosis of invasive
8 aspergillosis and disseminated candidosis FEMS Immunol Med Microbiol **45** 361-368

9 8 Canteros, G. E., Davel, G. O. and Vivot, W. (1994) [causal agents of onychomycosis]
10 Rev Argent Microbiol **26** 65-71

11 9 Carrasco, L., Ramos, M., Galisteo, R., Pisa, D., Fresno, M. and Gonzalez, M. E.
12 (2005) Isolation of candida famata from a patient with acute zonal occult outer retinopathy J
13 Clin Microbiol **43** 635-640

14 10 Clemons, K. V., Calich, V. L., Burger, E., Filler, S. G., Graziutti, M., Murphy, J.,
15 Roilides, E., Campa, A., Dias, M. R., Edwards, J. E., Jr., Fu, Y., Fernandes-Bordignon,
16 G., Ibrahim, A., Katsifa, H., Lamaignere, C. G., Meloni-Bruneri, L. H., Rex, J.,
17 Savary, C. A. and Xidieh, C. (2000) Pathogenesis i: Interactions of host cells and fungi
18 Med Mycol **38 Suppl 1** 99-111

19 11 Coleman, D. C., Rinaldi, M. G., Haynes, K. A., Rex, J. H., Summerbell, R. C.,
20 Anaissie, E. J., Li, A. and Sullivan, D. J. (1998) Importance of candida species other than
21 candida albicans as opportunistic pathogens Med Mycol **36 Suppl 1** 156-165

22 12 d'Ostiani, C. F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A.,
23 Ricciardi-Castagnoli, P. and Romani, L. (2000) Dendritic cells discriminate between

1 yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell
2 immunity in vitro and in vivo *J Exp Med* **191** 1661-1674

3 13 **Deventer, A., Goessens, WHF, Belkum, A, Vliet, HJA, and Verbrugh, EWM (1995)**
4 Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic
5 candidiasis *J Clin Microbiol* **33** 625-628

6 14 **Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhofer, I., Müller, C. A.,**
7 **Bowden, R. A., van Burik, J., Engelhard, D., Kanz, L. and Schumacher, U. (1997)**
8 Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes *J Clin*
9 *Microbiol* **35** 1353-1360

10 15 **Ellepola, A. N. and Morrison, C. J. (2005)** Laboratory diagnosis of invasive candidiasis
11 *J Microbiol* **43 Spec No** 65-84

12 16 **Fanci, R., Guidi, S., Bonolis, M. and Bosi, A. (2005)** *Candida krusei* fungemia in an
13 unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient successfully treated with
14 caspofungin *Bone Marrow Transplant* **35** 1215-1216

15 17 **Fernandez-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Diez-Orejas, R. and Gil, C. (2004)**
16 Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in
17 protection against systemic candidiasis *Proteomics* **4** 1204-1215

18 18 **Garcia-Gonzalez, A. and Ochoa, J. L. (1999)** Anti-inflammatory activity of
19 *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD *Arch Med Res* **30** 69-73

20 19 **Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M. A., Andrighetto, C.,**
21 **Schirone, M. and Tofalo, R. (2001)** A survey of yeasts in traditional sausages of southern
22 Italy *FEMS Yeast Res* **1** 161-167

1 20 **Gil, M. (1997)** Conceptos básicos sobre la interacción del sistema inmune y los hongos
2 causales de micosis sistémicas IATREIA **10** 171-176

3 21 **Ishibashi, K., Yoshida, M., Nakabayashi, I., Shinohara, H., Miura, N. N., Adachi, Y.**
4 **and Ohno, N. (2005)** Role of anti-beta-glucan antibody in host defense against fungi FEMS
5 Immunol Med Microbiol **44** 99-109

6 22 **Khan, Z. U. and Mustafa, A. S. (2001)** Detection of candida species by polymerase
7 chain reaction (pcr) in blood samples of experimentally infected mice and patients with
8 suspected candidemia Microbiol Res **156** 95-102

9 23 **Krcmery, V. and Barnes, A. J. (2002)** Non-albicans candida spp. Causing fungaemia:
10 Pathogenicity and antifungal resistance J Hosp Infect **50** 243-260

11 24 **Krcmery, V. and Kunova, A. (2000)** Candida famata fungemia in a cancer patient:
12 Case report J Chemother **12** 189-190

13 25 **Li, Y. L., Leaw, S. N., Chen, J. H., Chang, H. C. and Chang, T. C. (2003)** Rapid
14 identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the
15 internal transcribed spacer regions 1 and 2 Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22** 693-696

16 26 **Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Murgui, A. and Martinez, J. P. (2004)** Antibody
17 response to candida albicans cell wall antigens FEMS Immunol Med Microbiol **41** 187-196

18 27 **Matthews, R., Burnie, J (1998)** The epidemiology and pathogenesis of candidiasis:
19 Application in prevention and treatment Bull. Inst. Pasteur **96** 249-256

20 28 **Mencacci, A., Cenci, E., Del Sero, G., Fè d'Ostiani, C., Montagnoli, C., Bacci, A.,**
21 **Bistoni, F. and Romani, L. (1999)** Innate and adaptive immunity to *candida albicans*: A
22 new view of an old paradigm Rev Iberoam Micol **16** 4-7

1 29 **Mitsutake, K., Miyazaki, T., Tashiro, T., Yamamoto, Y., Kakeya, H., Otsubo, T.,**
2 **Kawamura, S., Hossain, M. A., Noda, T., Hirakata, Y. and Kohno, S. (1996)** Enolase
3 antigen, mannan antigen, cand-tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia J
4 Clin Microbiol **34** 1918-1921

5 30 **Nishikawa, A., Sugita, T. and Shinoda, T. (1999)** Rapid identification of
6 *debaryomyces hansenii/candida famata* by polymerase chain reaction Med Mycol **37** 101-
7 104

8 31 **Pazos, C., Ponton, J. and Del Palacio, A. (2005)** Contribution of (1->3)-beta-d-glucan
9 chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in
10 neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating
11 galactomannan J Clin Microbiol **43** 299-305

12 32 **Peres-Bota, D., Rodriguez-Villalobos, H., Dimopoulos, G., Melot, C. and Vincent, J.**
13 **L. (2004)** Potential risk factors for infection with *candida* spp. In critically ill patients Clin
14 Microbiol Infect **10** 550-555

15 33 **Pfaller, M. A. (1996)** Nosocomial candidiasis: Emerging species, reservoirs, and modes
16 of transmission Clin Infect Dis **22 Suppl 2** S89-94

17 34 **Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J. and Jones, R.**
18 **N. (2003)** In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic
19 antifungal agents against *candida* species infrequently isolated from blood J Clin Microbiol
20 **41** 78-83

21 35 **Pontón, J. (2006)** El diagnóstico microbiológico independiente de cultivo en la
22 candidiasis invasora. Importanciae los marcadores fúngicos Rev Iberoam Micol **23** 20-25

1 36 **Prinsloo, B., Weldhagen, G. F. and Blaine, R. W. (2003)** *Candida famata* central
2 nervous system infection *S Afr Med J* **93** 601-602

3 37 **Pryce, T. M., Kay, I. D., Palladino, S. and Heath, C. H. (2003)** Real-time automated
4 polymerase chain reaction (pcr) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA
5 in whole blood from high-risk patients *Diagn Microbiol Infect Dis* **47** 487-496

6 38 **Quindos, G., Moragues, M. D. and Ponton, J. (2004)** Is there a role for antibody
7 testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol* **21** 10-14

8 39 **Rao, N. A., Nerenberg, A. V. and Forster, D. J. (1991)** *Torulopsis candida* (*Candida*
9 *famata*) endophthalmitis simulating propionibacterium acnes syndrome *Arch Ophthalmol*
10 **109** 1718-1721

11 40 **Reboli, A. C. (1993)** Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay
12 for *Candida* antigen detection *J Clin Microbiol* **31** 518-523

13 41 **Rozell, B., Ljungdahl, P. O. and Martinez, P. (2006)** Host-pathogen interactions and
14 the pathological consequences of acute systemic *Candida albicans* infections in mice *Curr*
15 *Drug Targets* **7** 483-494

16 42 **Ruhnke, M. (2006)** Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-
17 *Candida albicans* yeasts *Curr Drug Targets* **7** 495-504

18 43 **Shoham, S. and Levitz, S. M. (2005)** The immune response to fungal infections *Br J*
19 *Haematol* **129** 569-582

20 44 **Simitsopoulou, M. and Roilides, E. (2005)** Evaluation of immunotherapy in invasive
21 candidiasis: Antifungal activity and cytokine expression assays *Methods Mol Med* **118** 161-
22 179

1 45 **Sims, C. R., Ostrosky-Zeichner, L. and Rex, J. H. (2005)** Invasive candidiasis in
2 immunocompromised hospitalized patients Arch Med Res **36** 660-671

3 46 **St-Germain, G. and Laverdiere, M. (1986)** *Torulopsis candida*, a new opportunistic
4 pathogen J Clin Microbiol **24** 884-885

5 47 **Tortorano, A. M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L. and Grillot,**
6 **R. (2006)** Candidaemia in europe: Epidemiology and resistance Int J Antimicrob Agents **27**
7 359-366

8 48 **Veldman, B. A., Verweij, P. E. and Blijlevens, N. M. (2006)** Successful treatment of
9 liposomal amphotericin b refractory candida glabrata fungaemia in a patient undergoing a
10 stem cell transplantation Neth J Med **64** 127-129

11 49 **Villar, C. C., Kashleva, H., Mitchell, A. P. and Dongari-Bagtzoglou, A. (2005)**
12 Invasive phenotype of candida albicans affects the host proinflammatory response to
13 infection Infect Immun **73** 4588-4595

14 50 **Wagner, D., Sander, A., Bertz, H., Finke, J. and Kern, W. V. (2005)** Breakthrough
15 invasive infection due to debaryomyces hansenii (teleomorph candida famata) and
16 scopulariopsis brevicaulis in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin
17 b and caspofungin for suspected aspergillosis Infection **33** 397-400

18 51 **Witkin, S. S., Yu, I. R. and Ledger, W. J. (1983)** Inhibition of candida albicans--
19 induced lymphocyte proliferation by lymphocytes and sera from women with recurrent
20 vaginitis Am J Obstet Gynecol **147** 809-811

21 52 **Wright, R., Basson, M., D'Ari, L. and Rine, J. (1988)** Increased amounts of hmg-coa
22 reductase induce "Karmellae": A proliferation of stacked membrane pairs surrounding the
23 yeast nucleus J Cell Biol **107** 101-114

1 53 Yamamoto, Y., Osanai, S., Fujiuchi, S., Yamazaki, K., Nakano, H., Ohsaki, Y. and
2 Kikuchi, K. (2002) Extrinsic allergic alveolitis induced by the yeast *debaryomyces hansenii*
3 *Eur Respir J* **20** 1351-1353

4 54 Yang, C. W., Barkham, T. M., Chan, F. Y. and Wang, Y. (2003) Prevalence of
5 *candida* species, including *candida dubliniensis*, in singapore *J Clin Microbiol* **41** 472-474

6 55 Yeo, S. F. and Wong, B. (2002) Current status of nonculture methods for diagnosis of
7 invasive fungal infections *Clin Microbiol Rev* **15** 465-484

8

9 **FIGURE LEGENDS**

10

11 Figure 1: (A) ELISA to determine the presence of antibodies against *C. famata* in patient
12 sera from different years. The assay was carried out as described in Materials and Methods.

13 (B) Immunofluorescence analysis of different yeasts using different patient sera. In the case
14 of *C. famata*, the protocol described in Materials and Methods was followed. As positive
15 control, rabbit antiserum against *C. famata* was employed; for the negative control, PBS
16 instead of primary antibody was added. The commercial kit for immunofluorescence,
17 Euroimmun, was used for the remaining yeast species analyzed. The controls were those
18 provided by the commercial kit.

19

20 Figure 2: Antibody type examined by immunofluorescence with the serum from 1999. *C.*
21 *famata* cells were treated as described in Materials and Methods and incubated with patient
22 serum from June 1999. Then, a range of anti-human antibodies specific for different

1 immunoglobulins were employed as secondary antibody. As a negative control, PBS instead
2 primary antibody was added.

3
4 Figure 3: (A) Left panel: Western blot of *C. famata* proteins with different sera from the
5 patient or from a healthy donor (c -); Right panel: Western blot of *C. albicans* (*C. alb*) and
6 *Cryptococcus magnus* (*Cry*) proteins incubated with the serum obtained from the patient in
7 1996. Ctrl *C. alb*, positive control of *C. albicans* proteins incubated with serum from a
8 patient infected with this yeast. In all cases the secondary antibody recognized IgM
9 immunoglobulins. Serum dilutions were at 1/4000, whereas the secondary antibody was
10 employed at 1/10000. (B) Immuno electron microscopy of *C. famata* cells. Yeast cells were
11 incubated with patient serum or, as a control, with the rabbit serum obtained against *C.*
12 *famata*, then incubated with the secondary antibody conjugated with colloidal gold.

13
14 Figure 4: Detection of *C. famata* genomes by PCR. (A) Determination of the number of *C.*
15 *famata* genomes in 200 µl of serum by quantitative PCR, carried out as described in
16 Materials and Methods. (B) PCR analysis of different serum samples obtained from the
17 patient on the dates indicated above each lane. PCR assays were carried out with
18 oligonucleotides that amplify a region of the rRNA internal transcribed spacer genes.
19 Control 1: positive control of DNA extracted from *C. famata*; Control 2: negative PCR
20 control without DNA; Control 3: negative control of DNA extraction of phosphate buffer.
21 To the left of the gel the DNA markers in base units are indicated.

22

1 Figure 5: (A) Dot-blot detection of *C. famata* antigens in patient sera. Different dilutions of
2 sera were blotted to a nitrocellulose membrane, which was incubated with the rabbit
3 antiserum rose against *C. famata*. Rabbit pre-immune serum and sera from two healthy
4 donors (control 1 and 2) were used as controls. (B) Densitometric values of the 1/500
5 dilution from the dot blot of *C. famata* antigen in different serum samples obtained from the
6 patient between 1996 and 2006. (C) Detection of fungal polysaccharides in different serum
7 samples using the Fungitell commercial kit. The discontinuous line indicates the minimum
8 level of antigen necessary for the sample to be considered as positive. Control 1 and 2 are
9 sera from healthy donors.

10

11 Figure 6: Dot-blot analysis of the patient serum using rabbit antibodies rose against different
12 yeasts. Dilutions from 1:200 to 1:5000 of the serum obtained from the patient in June 1996
13 were blotted and the nitrocellulose membrane was incubated with different antisera rose
14 against the indicated species. The rabbit antisera were obtained as described in Materials
15 and Methods.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

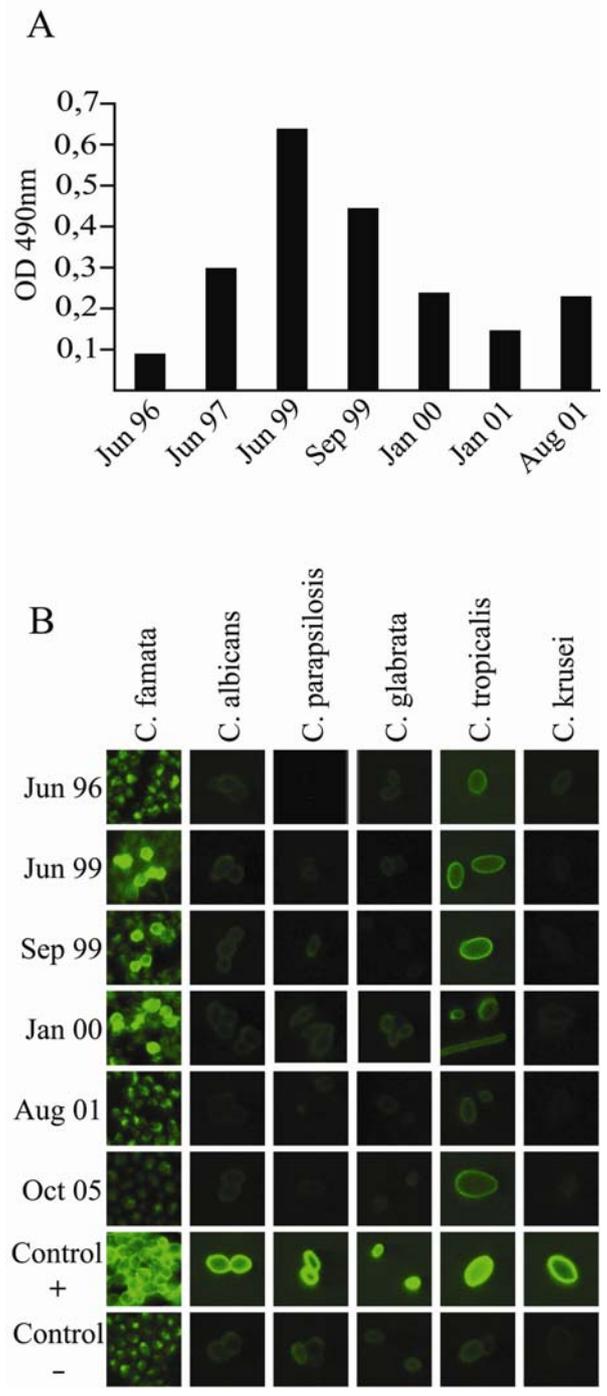


Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

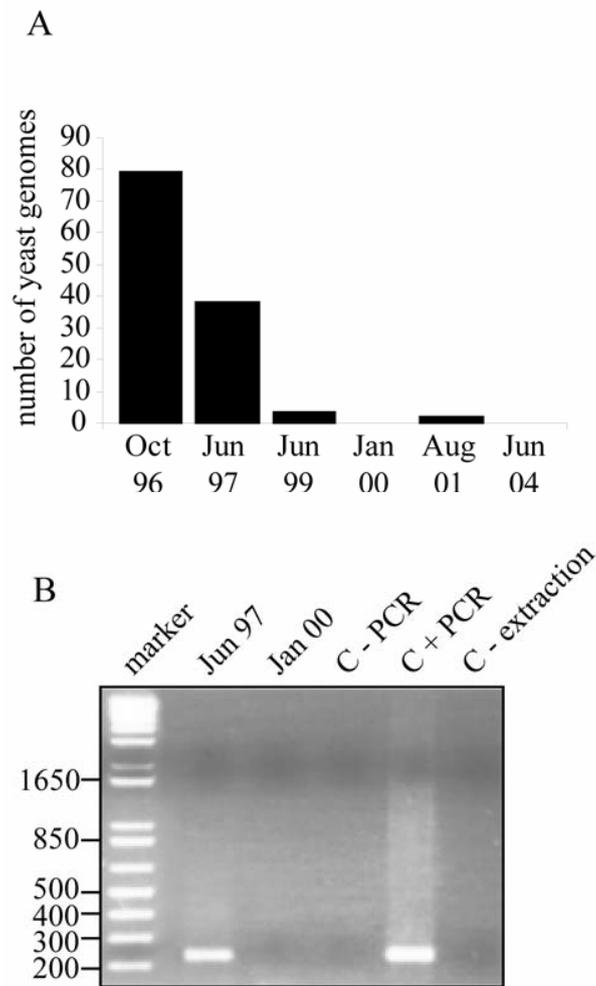


Figure 4

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

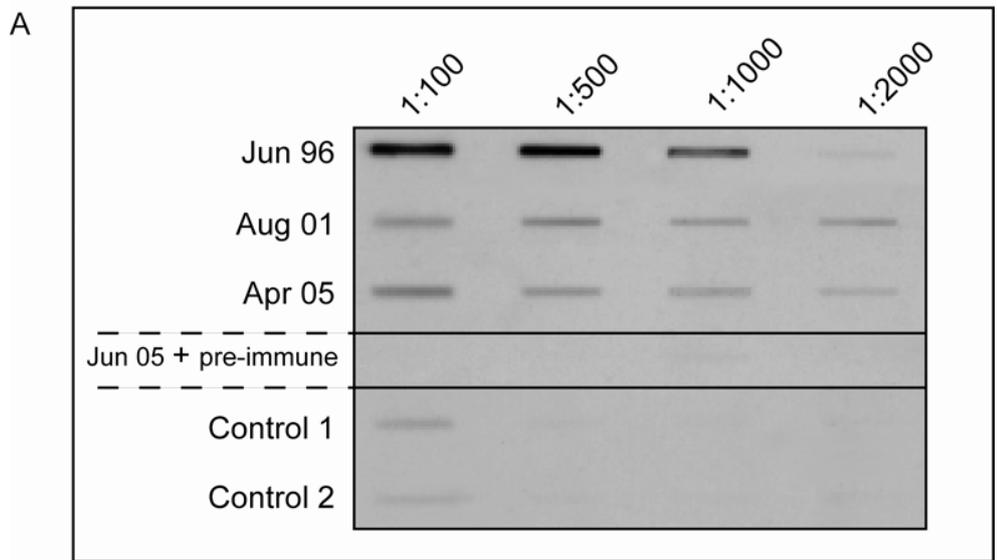


Figure 5

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

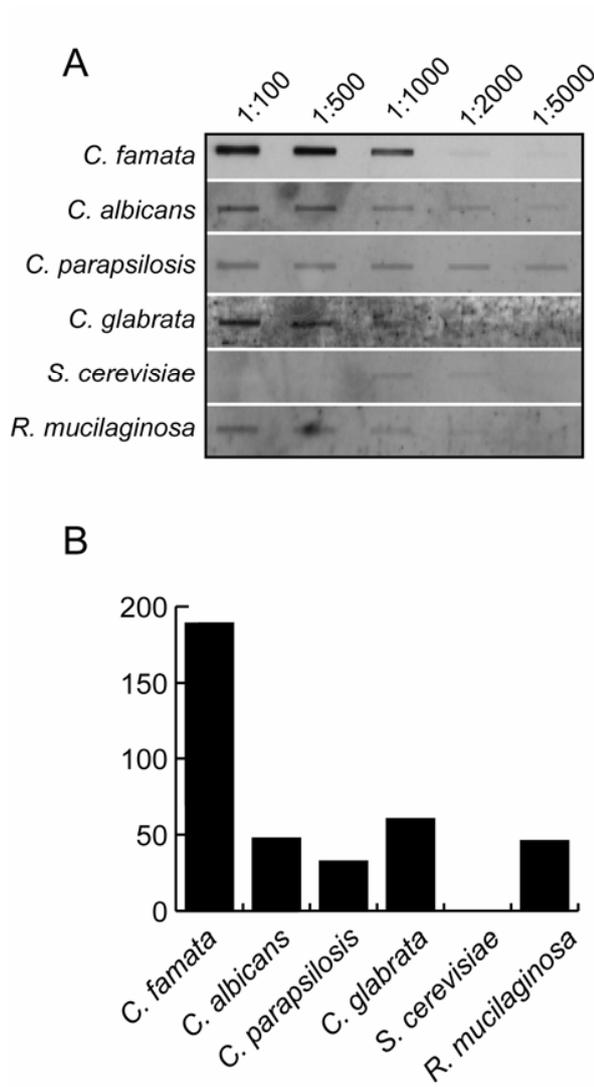


Figure 6

1

2

3

4 FUNGAL INFECTION IN PATIENTS WITH SERPIGINOUS CHOROIDITIS OR
5 ACUTE ZONAL OCCULT OUTER RETINOPATHY

6

7 Running title: Fungal infection and retinopathy

8

9 Diana Pisa, Marta Ramos, Patricia García, Remberto Escoto,* Rafael Barraquer,* Susana
10 Molina and Luis Carrasco

11

12 Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)

13 Facultad de Ciencias

14 Universidad Autónoma

15 Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain

16 *Centro de Oftalmología Barraquer

17 Laforja, 314, 08021 Barcelona, Spain

18

19

20 Key words: Serpiginous Choroiditis; AZOOR; *Candida famata*; candidiasis; retinopathy

21

1 **ABSTRACT**

2 The etiology of a number of retinopathies, including serpiginous choroiditis and AZOOR
3 remain uncertain. Recently, we provided evidence that AZOOR is caused by *Candida*
4 *famata* infection. The purpose of this article was to investigate the presence of fungal
5 infection in five patients affected with serpiginous choroiditis and five patients with
6 diagnosis of AZOOR. To assess the presence of fungal infection the presence of antibodies
7 in human sera against *C. famata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei* was
8 analyzed. In addition, quantitative PCR was carried out to detect fungal genomes in whole
9 blood. Finally, the presence of fungal antigens and β -(1,3) glucans in patients' sera was
10 investigated. Three AZOOR patients presented high antibody titer against *Candida* spp.,
11 while antibodies against *Candida* were observed in four patients with Serpiginous
12 choroiditis. Fungal genomes in peripheral blood were evidenced in one AZOOR and in four
13 Serpiginous choroiditis patients. Fungal antigens and β -(1,3) glucans were also apparent in
14 the serum of different patients. Our findings indicate that there was evidence of
15 disseminated fungal infection in almost all patients examined.

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **INTRODUCTION**

2 Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR) is an ocular disease characterized by a rapid
3 loss of visual function (13). Typical characteristics of this disease include: i) acute loss of
4 retinal peripheral vision in one or both eyes, ii) normal fundusoscopic examination in the early
5 stages of the disease, and iii) extensive abnormalities in the retinogram, whereas evoked
6 potentials are normal (14, 17, 23, 36). A mixed dysfunction of rods and cones is observed,
7 although cones are usually more affected. In the early stages of the disease, visual acuity and
8 angiographic tests are normal, despite marked deterioration of the visual field. Some patients
9 exhibit abnormal pupillary reflex, suggesting some type of neuropathy. In fact, inflammation
10 of the central nervous system has been found in a patient with AZOOR (16). In some cases,
11 photophobia occurs, and the appearance of photopsias, referred to as "wavy lights", is
12 common. A typical AZOOR patient is a young myopic woman, who is otherwise healthy;
13 indeed, according to a recent study, about 80% of patients with this disease are women (13).
14 Ever since this disease was first described, it has been associated with the multiple
15 evanescent white dot syndrome (MEWDS) (12, 19, 34, 38). Moreover, similarities between
16 AZOOR, MEWDS, multifocal choroiditis (MFC), punctate inner choroidopathy (PIC), acute
17 macular retinopathy (AMNR), and acute idiopathic blind spot enlargement (AIBSE) have
18 been described (4, 5, 20, 37, 40). Some of these conditions have been associated with
19 histoplasmosis (8, 14). In line with these observations, we reported that AZOOR may be
20 caused by a fungal infection (6). AZOOR was previously considered an immune disorder
21 leading to autoimmunity or caused by an unidentified infectious agent (2, 12, 18).
22 Serpiginous choroiditis (SC) is a progressive and usually recurrent inflammatory disorder of
23 the choroid, retinal blood vessels and pigment epithelium. This disease is chronic and usually

1 affects both eyes, leading to vision loss (24, 38). The cause of SC remains unknown,
2 although the possibility that it is an autoimmune disorder has been proposed. In fact, patients
3 suffering from SC are treated with immunosuppressive agents (28, 35). In the present report
4 we provide further evidence that AZOOR and SC may have a fungal origin.

5

6 **MATERIALS AND METHODS**

7 **Yeast growth**

8 Yeasts were grown in YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) with
9 incubation at 30°C. The same medium, containing agar, was used to isolate individual yeast
10 colonies.

11

12 **Antibodies**

13 Rabbit antisera against *C. famata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *S. Cerevisiae* and
14 *R. mucilaginosa* were obtained by inoculation of 0.5 ml of phosphate buffered sorbitol (PBS)
15 containing 1 or 2 mg of yeast after autoclaving and lyophilization. Each inoculum had been
16 previously mixed with the same volume of Freund's adjuvant. Rabbits were inoculated up to
17 four times, and the antibody titer and specificity of the sera were tested by
18 immunofluorescence and Western blotting.

19

20 **Immunofluorescence**

21 For *C. famata*, 1 ml of culture was placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes. Cells were washed
22 with PBS, incubated with 50 mM ammonium chloride for 10 min, and washed three times
23 with PBS-Tween 20. Cells were then treated with the different sera diluted 1:500 in PBS-

1 Tween 20 at 37°C for 2 hours, washed again with PBS-Tween 20 and incubated with the
2 secondary antibody. Rabbit anti-human IgA+IgM+IgG immunoglobulins fluorescein-
3 conjugated antibody (Sigma) was added at dilution 1:500. The cells were then washed,
4 resuspended in PBS and mounted on slides with a drop of Depex (Serva). Finally, the cells
5 were observed under a fluorescence microscope. For the remaining *Candida* species, the
6 commercial kit Euroimmun (Medizinische Labordiagnostika AG) was used in accordance
7 with the manufacturer's instructions and using the same serum dilutions as for *C. famata*.

8

9 **PCR analyses**

10 The DNA was extracted from blood as follows. One ml of blood was centrifuged at 20000 ×
11 g for 20 minutes. Pellets were resuspended in 1 ml of tri-distilled filtered water and incubated
12 at room temperature for 20 min. Samples were centrifuged for 3 min at 20000 × g and
13 washed twice more with tri-distilled filtered water. Pellets recovered from the last
14 centrifugation were resuspended in 300 µl of PBS. Samples were boiled for 10 minutes and
15 then incubated for 2 hours at 37°C with Zimolase (ICN) and for a further 2 hours at 58°C
16 with proteinase K (Sigma). Then, 200 µl of a detergent buffer were added and samples were
17 boiled again for 10 minutes before adding 1 ml of phenol:chloroform (1:1) (Amersham) and
18 centrifuged at 20000 × g for 20 min. The upper aqueous phase was recovered and washed
19 twice with ethyl ether. The DNA was precipitated by addition of 3 volumes of absolute
20 ethanol (Merck) (-20°C) to the aqueous phase. After storing the samples overnight at -20°C,
21 the DNA was then centrifuged at 20000 × g for 20 min. Pellets were dried and resuspended in
22 H₂O. Real-time quantitative PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 thermocycler
23 (Applied biosystems). The reaction mix was prepared with 0.9 µM of each oligonucleotide

1 and 0.25 μ M of TaqMan probe in a final volume of 20 μ l, to which 50 ng of DNA were
2 added. The concentration of the DNA template was normalized with reference to previous
3 PCR reactions with specific oligonucleotides, in which DNA was denatured at 95°C for 10
4 minutes and amplified for 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. Data were
5 analyzed with the SDS 7000 (1.1) software.

6

7 **Dot-Blot analyses**

8 200 μ l of different serum dilutions in TBS were added to each well. Samples were blotted
9 onto a 45 mm nitrocellulose membrane (Bio-Rad), previously hydrated in TBS for 10
10 minutes using the Bio-Dot SF apparatus (Bio-Rad). After blotting, the membrane was
11 processed and developed as described for Western blotting. The primary antibodies, rabbit
12 polyclonal antibodies raised against *C. famata*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*,
13 *Rhodotorula mucilaginosa* or *Saccharomyces cerevisiae* were used at 1:1000 dilution. We
14 used a donkey anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (Amersham
15 Biosciences) at dilution 1:5000 as secondary antibody.

16

17 **Detection of fungal polysaccharides**

18 The presence of β -(1,3) glucans in serum was detected using the Fungitell kit, supplied by the
19 Fontlab laboratories (Barcelona, Spain) (30).

20

21 **RESULTS**

22 **Description of patients**

1 Table I lists the patients involved in this study. Five individuals with diagnosis of AZOOR
2 and five with diagnosis of SC were examined. This diagnosis was made from the funduscopy
3 examination, fluorescein angiograms, and campimetric tests. The severity of visual defects is
4 summarized in Table I. AZOOR may represent an early stage in the evolution of the disease
5 ultimately leading to retinal necrosis.

6

7 **Assays to analyze fungal infection**

8 There is no a universal test to determine whether disseminated fungal infection is present. In
9 order to investigate this potential infection in patients diagnosed with AZOOR or SC, we
10 carried out the following analyses in serum or whole peripheral blood: 1) fungal growth in
11 appropriate media; 2) antibodies against different *Candida* species assayed by
12 immunofluorescence; 3) fungal genomes using quantitative PCR; 4) antigens from *C. famata*
13 and other yeasts estimated by dot-blot assays; and 5) fungal polysaccharides (β -(1,3)-
14 glucans) measured by the commercial test Fungitell.

15 Fungal growth was negative when 200 μ l of serum or whole blood were seeded in liquid or
16 agar YEPD media.

17

18 **Analysis of *Candida* antibodies**

19 The presence of antibodies against *C. famata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and
20 *C. krusei* was assayed by immunofluorescence. Figure 1 illustrates the type of
21 immunoreaction obtained with one AZOOR patient, one SC patient and a healthy volunteer.
22 There is a clear immunoreactivity to some *Candida* species in these two patients, whereas
23 immunoreaction is not observed with the healthy volunteer. This immunoreactivity varies

1 according to the patient analyzed, but four out of the five patients with AZOOR and four out
2 of five patients with SC were positive in this test (Table II). Not only did the presence or
3 absence of antibodies vary from patient to patient but also the *Candida* species recognized by
4 the different sera. This variability may be dependent on the severity of the infection and the
5 organs affected by the disseminated candidiasis. It is also possible that the actual yeast
6 species infecting each patient is different.

7

8 **Fungal genomes in whole blood analyzed by quantitative PCR**

9 Circulating fungal genomes in blood of patients with disseminated candidiasis have
10 occasionally been observed (3, 9, 21, 22, 31, 33). Whether such an observation is made
11 probably depends on the activity of fungal foci present in the different organs or tissues. Even
12 though viable cells were not detected in blood, it might have been possible to detect fungal
13 genomes (21, 22, 27, 31). Thus, in one AZOOR patient, yeast genomes were evidenced by
14 quantitative PCR (Figure 2A). Interestingly, four SC patients were also PCR positive. In one
15 of them, there were 12500 copies of rRNA genes per ml of blood (Figure 2A). On the other
16 hand, the lack of genome amplification by PCR in some patients may be because their
17 potential fungal infection is not reflected in blood at the time when the sample was obtained.

18

19 **Fungal polysaccharides: measurement of β -(1,3) glucan**

20 In the Fungitell assay for presence of fungal polysaccharides, two AZOOR patients were
21 slightly positive whereas the rest were negative (Figure 2B). Notably, three SC patients
22 contained high levels of β -(1,3) glucans in their serum, suggesting they had a fungal
23 infection.

1

2 **Analysis of fungal antigens in blood serum**

3 We developed a very sensitive method based in the dot-blot technique to analyze *C. famata*
4 antigens in human sera. Figure 3A shows the type of reaction obtained with one AZOOR
5 and one SC patient, whereas serum from a healthy donor was negative. The analysis of all
6 patients' sera with this method detected the presence of these antigens at moderate levels in
7 four of the AZOOR patients but the remaining patient was negative (Figure 3B). The tests
8 showed high amounts of *C. famata* antigen in two SC patients but low amounts in the other
9 three. In such cases, it may be that antigens are not secreted into the bloodstream or that these
10 antigens, if present, belong to fungal species not recognized by the antibody used.

11 To further investigate this possibility, rabbit antibodies were raised against other yeast
12 species, mainly *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and
13 *Rhodotorula mucilaginosa*. These antibodies were used to assay for the presence of fungal
14 antigens in the different serum samples. As shown in Table III, no circulating antigens
15 immunoreacted with *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae* or *R. mucilaginosa* antibodies in AZOOR
16 patients. Only patient 3 presented moderate antigen levels that immunoreacted in the dot-blot
17 assay using *R. mucilaginosa* and *S. cerevisiae* antibodies. Notably, this patient (AZOOR 3)
18 had a high titer of the *C. glabrata* antigen. The fact that some patients possess antigens that
19 immunoreact with different antibodies may be due to cross-reactivity, but we cannot discard
20 the possibility of mixed yeast infections. In the case of SC patients, no antigens that
21 immunoreact with *S. cerevisiae* and *R. mucilaginosa* antibodies were found. Notably, SC
22 patient 1 was positive for *C. albicans* antigens, whereas the levels of *C. parapsilosis* antigen
23 in patient 4 and *C. glabrata* antigen in patient 2 were low. In summary, apart from the

1 presence of *C. famata* antigens in four AZOOR patients, the presence of high levels of *C.*
2 *albicans* antigen in patient 1 and *C. glabrata* antigen in patient 3 should also be noted. SC
3 patient 1 was positive for both *C. famata* and *C. albicans* antigens, whereas patient 5 only
4 had *C. famata* antigens. Patient 2 had low levels of *C. glabrata* antigens only. No antigens
5 immunoreacting with the different antibodies used were evidenced in SC patient 3, although
6 high levels of β -(1,3) glucans were found. In principle, it may be possible that this patient
7 was infected by fungal species other than the ones tested in our assay.

8

9 **DISCUSSION**

10 Assessment of disseminated fungal infection cannot be easily incorporated in
11 routine hospital analysis. In most cases, only fungal growth from different tissue samples is
12 tested, but more elaborate techniques must be implemented to detect this type of infection
13 (1, 3, 10, 26, 31). However, these techniques are only carried out in case of clinical
14 suspicion of a fungal disease. Non-pathogenic yeasts such as *C. famata* do not provoke pain
15 or fever, making the clinical diagnosis of such infection difficult. In addition, the viability of
16 *C. famata* cells declines after incubation with human blood (our unpublished results).
17 Therefore, simple analysis of yeast growth from blood samples may be misleading. In fact,
18 in the case we reported recently of an AZOOR patient, *C. famata* growth was positive only
19 twice over a ten-year period (6). On the other hand, the determination of antibodies against
20 *Candida* species is not a reliable assay for detection of disseminated candidiasis (10, 32).
21 Certainly, the presence of these antibodies suggests a yeast infection, but the contrary is not
22 true. Patients infected with *C. famata* or other yeasts may be antibody negative for a number
23 of reasons such as the severity of the infection and, most probably, the actual location of the

1 different fungal foci (7, 11, 32). One possibility to consider is that the presence of antibodies
2 reflects past contact with *C. famata* and that antibody response persists after elimination of
3 the yeast. This, however, is not supported by the finding that the antibody response to this
4 yeast decreased when an AZOOR patient was treated with antifungal agents, even though
5 signs of infection were still apparent (unpublished results). In our opinion, the presence of
6 antibodies must be analyzed and the results should be contrasted with other tests. The most
7 conclusive evidence for disseminated candidiasis comes from the detection of fungal
8 components in blood or other tissues, which should be free of other microorganisms. The
9 detection of Fungal genomes in blood samples by PCR is the most conclusive evidence (1,
10 3, 10, 29, 42). However, these fungal genomes may only present in blood stream for short
11 periods of time. PCR analysis taking vitreous liquid or choroids samples would be more
12 conclusive, but these invasive techniques are more aggressive and riskier than a simple
13 blood test and may cause discomfort to the patient. Indeed, a non-aggressive blood test
14 analysis is preferable and assaying for presence of fungal antigens constitutes to our
15 knowledge the most sensitive test currently available. This assay reveals the presence in
16 serum of exported fungal proteins and those derived from yeast lysis. Patients who are PCR
17 negative could be positive in the dot-blot assay. Antigen analyses suffer from the drawback
18 of low specificity, since the antibodies used would only recognize proteins from *C. famata*
19 or cross-reactive species. This problem can be overcome, in part, by using a wide range of
20 antibodies raised against different yeast species. This approach can also shed more light on
21 the species of fungi that infect a given patient, as illustrated by AZOOR patient 3, who
22 showed high levels of *C. glabrata* antigens and moderate levels of antigens to other yeast
23 species. Use of the commercial Fungitell kit to measure β -(1,3) glucans may serve to

1 complement the above tests. The presence of fungal polysaccharides in peripheral blood in
2 patients who are not undergoing dialysis or who are not following certain therapeutic
3 treatments may be indicative of fungal infection (1, 15, 29, 30). Once again, blood samples
4 may be Fungitell negative but positive in the dot-blot analyses. The contrary may be also
5 true, as occurred with AZOOR patient 5 or SC patient 3. In conclusion, the clinician should
6 consider the results from different tests on a case-by-case basis to determine the existence of
7 infection.

8 Taking into account the above considerations in the patients described in this study,
9 there is evidence of yeast infection in four out of five AZOOR patients and in all SC
10 patients. The possibility that these two diseases are caused by a yeast infection is reinforced
11 by the known clinical data. Thus, these diseases are slow, progressive and recurrent
12 diseases. Prolonged yeast growth may provoke tissue necrosis, leading to the appearance of
13 scars and atrophy of the retina and choroid vessels. Notably, the eye fundus is pale and
14 whitish, while in some cases, clear white dots appear. Strong fluorescence in fluorescein
15 angiograms, typical of these patients, may reveal transient uptake of this dye by the fungus.
16 In addition, similarities in the funduscopic examinations between AZOOR and
17 histoplasmosis, a disease caused by the fungus *Histoplasma capsulatum*, have been
18 described (14, 17). Unambiguous confirmation that yeast infection causes AZOOR or SC
19 will come from clinical trials that aim to investigate the beneficial effects of antifungal
20 treatments. These trials face the problem of reaching high enough concentrations of the
21 antifungal compound in the eye to inhibit *C. famata* or other fungi present. It is crucial to
22 clarify the fungal etiology of both AZOOR and SC since present treatments are sometimes
23 based on the use of corticosteroids and other antiinflammatory compounds (6, 13, 24, 28,

1 39). It is well established that corticosteroids increase susceptibility to fungal infections,
2 indeed fungal infections are more severe in mice treated with these compounds (25, 41).
3 The presence of fungal infection in AZOOR or SC patients, even if not causative of disease,
4 will be aggravated by corticosteroid therapy. Patients suffering AZOOR or other related
5 ocular diseases related will not only benefit from a prompt diagnosis of a fungal infection
6 but, more importantly, from receiving the adequate therapeutic treatment.

7

8 **ACKNOWLEDGEMENTS**

9 We wish to express our gratitude to the Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE)
10 for their help and financial support. The institutional grant to Centro de Biología Molecular
11 from Fundación Ramón Areces is acknowledged.

12

13 **REFERENCES**

- 14 1. **Alexander, B. D.** 2002. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the
15 mycology laboratory. *Transpl Infect Dis* **4 Suppl 3**:32-7.
- 16 2. **Boyd, S. R., S. Young, and S. Lightman.** 2001. Immunopathology of the
17 noninfectious posterior and intermediate uveitides. *Surv Ophthalmol* **46**:209-33.
- 18 3. **Bretagne, S., and J. M. Costa.** 2005. Towards a molecular diagnosis of invasive
19 aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**:361-
20 8.
- 21 4. **Brown, J., Jr., and J. C. Folk.** 1998. Current controversies in the white dot
22 syndromes. Multifocal choroiditis, punctate inner choroidopathy, and the diffuse
23 subretinal fibrosis syndrome. *Ocul Immunol Inflamm* **6**:125-7.

- 1 5. **Bryan, R. G., K. B. Freund, L. A. Yannuzzi, R. F. Spaide, S. J. Huang, and D.**
2 **L. Costa.** 2002. Multiple evanescent white dot syndrome in patients with multifocal
3 choroiditis. *Retina* **22**:317-22.
- 4 6. **Carrasco, L., M. Ramos, R. Galisteo, D. Pisa, M. Fresno, and M. E. Gonzalez.**
5 2005. Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer
6 retinopathy. *J Clin Microbiol* **43**:635-40.
- 7 7. **Costantino, P. J., N. F. Gare, and J. R. Warmington.** 1995. Humoral immune
8 responses to systemic *Candida albicans* infection in inbred mouse strains. *Immunol*
9 *Cell Biol* **73**:125-33.
- 10 8. **Dreyer, R. F., and D. J. Gass.** 1984. Multifocal choroiditis and panuveitis. A
11 syndrome that mimics ocular histoplasmosis. *Arch Ophthalmol* **102**:1776-84.
- 12 9. **Einsele, H., H. Hebart, G. Roller, J. Loffler, I. Rothenhofer, C. A. Muller, R. A.**
13 **Bowden, J. van Burik, D. Engelhard, L. Kanz, and U. Schumacher.** 1997.
14 Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes.
15 *J Clin Microbiol* **35**:1353-60.
- 16 10. **Ellepola, A. N., and C. J. Morrison.** 2005. Laboratory diagnosis of invasive
17 candidiasis. *J Microbiol* **43 Spec No**:65-84.
- 18 11. **Fernandez-Arenas, E., G. Molero, C. Nombela, R. Diez-Orejas, and C. Gil.**
19 2004. Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida*
20 *albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics* **4**:1204-15.
- 21 12. **Gass, J. D.** 2003. Are acute zonal occult outer retinopathy and the white spot
22 syndromes (AZOOR complex) specific autoimmune diseases? *Am J Ophthalmol*
23 **135**:380-1.

- 1 13. **Gass, J. D., A. Agarwal, and I. U. Scott.** 2002. Acute zonal occult outer
2 retinopathy: a long-term follow-up study. *Am J Ophthalmol* **134**:329-39.
- 3 14. **Holz, F. G., R. Y. Kim, S. D. Schwartz, C. A. Harper, J. Wroblewski, G. B.**
4 **Arden, and A. C. Bird.** 1994. Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR)
5 associated with multifocal choroidopathy. *Eye* **8 (Pt 1)**:77-83.
- 6 15. **Ishibashi, K., M. Yoshida, I. Nakabayashi, H. Shinohara, N. N. Miura, Y.**
7 **Adachi, and N. Ohno.** 2005. Role of anti-beta-glucan antibody in host defense
8 against fungi. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:99-109.
- 9 16. **Jacobson, D. M.** 1996. Acute zonal occult outer retinopathy and central nervous
10 system inflammation. *J Neuroophthalmol* **16**:172-7.
- 11 17. **Jacobson, S. G., D. S. Morales, X. K. Sun, W. J. Feuer, A. V. Cideciyan, J. D.**
12 **Gass, and A. H. Milam.** 1995. Pattern of retinal dysfunction in acute zonal occult
13 outer retinopathy. *Ophthalmology* **102**:1187-98.
- 14 18. **Jampol, L. M., and K. G. Becker.** 2003. White spot syndromes of the retina: a
15 hypothesis based on the common genetic hypothesis of autoimmune/inflammatory
16 disease. *Am J Ophthalmol* **135**:376-9.
- 17 19. **Jampol, L. M., P. A. Sieving, D. Pugh, G. A. Fishman, and H. Gilbert.** 1984.
18 Multiple evanescent white dot syndrome. I. Clinical findings. *Arch Ophthalmol*
19 **102**:671-4.
- 20 20. **Jampol, L. M., and A. Wiredu.** 1995. MEWDS, MFC, PIC, AMN, AIBSE, and
21 AZOOR: one disease or many? *Retina* **15**:373-8.

- 1 21. **Khan, Z. U., and A. S. Mustafa.** 2001. Detection of *Candida* species by polymerase
2 chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients
3 with suspected candidemia. *Microbiol Res* **156**:95-102.
- 4 22. **Klingspor, L., and S. Jalal.** 2006. Molecular detection and identification of
5 *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin*
6 *Microbiol Infect* **12**:745-53.
- 7 23. **Lee, A. G., and T. C. Prager.** 1996. Acute zonal occult outer retinopathy. *Acta*
8 *Ophthalmol Scand* **74**:93-5.
- 9 24. **Lim, W. K., R. R. Buggage, and R. B. Nussenblatt.** 2005. Serpiginous choroiditis.
10 *Surv Ophthalmol* **50**:231-44.
- 11 25. **Lionakis, M. S., and D. P. Kontoyiannis.** 2003. Glucocorticoids and invasive
12 fungal infections. *Lancet* **362**:1828-38.
- 13 26. **López, C., Giro, L, Ramos, L, Ramadán, S, Bulacio, L.** 2005. Comparación de
14 diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista*
15 *Argentina de Microbiología* **37**:16-21.
- 16 27. **Maaroufi, Y., Ahariz, N, Husson, M and Crokaert, F.,** 2004. Comparison of
17 different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species
18 and its quantitaion by using a real-time PCR-based assay. *Journal of clinical*
19 *microbiology* **42**:3159-3163.
- 20 28. **Marcuello Melendo, B., C. Torron Fernandez-Blanco, S. Perez Olivan, O. Ruiz**
21 **Moreno, E. Ferrer Novella, and F. M. Honrubia Lopez.** 2004. [Serpiginous
22 choroiditis: clinical course and treatment]. *Arch Soc Esp Oftalmol* **79**:237-42.

- 1 29. **Mitsutake, K., T. Miyazaki, T. Tashiro, Y. Yamamoto, H. Kakeya, T. Otsubo,**
2 **S. Kawamura, M. A. Hossain, T. Noda, Y. Hirakata, and S. Kohno.** 1996.
3 Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients
4 with candidemia. *J Clin Microbiol* **34**:1918-21.
- 5 30. **Pazos, C., J. Ponton, and A. Del Palacio.** 2005. Contribution of (1->3)-beta-D-
6 glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive
7 aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for
8 circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* **43**:299-305.
- 9 31. **Pontón, J.** 2006. El diagnóstico microbiológico independiente de cultivo en la
10 candidiasis invasora. Importanciae los marcadores fúngicos. *Rev Iberoam Micol*
11 **23**:20-25.
- 12 32. **Quindos, G., M. D. Moragues, and J. Ponton.** 2004. Is there a role for antibody
13 testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol* **21**:10-4.
- 14 33. **Reiss, E., and C. J. Morrison.** 1993. Nonculture methods for diagnosis of
15 disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* **6**:311-23.
- 16 34. **Schelfhout, V., B. Lafaut, C. Van den Neste, P. Kestelyn, and J. J. De Laey.**
17 1998. Multiple evanescent white dot syndrome. *Bull Soc Belge Ophtalmol* **270**:19-
18 23.
- 19 35. **Secchi, A. G., M. S. Tognon, and C. Maselli.** 1990. Cyclosporine-A in the
20 treatment of serpiginous choroiditis. *Int Ophthalmol* **14**:395-9.
- 21 36. **Smetana, S., S. S. Feman, and C. Kleber.** 2003. The retinal features of acute zonal
22 occult outer retinopathy (AZOOR). *Arch Ophthalmol* **121**:914-5.

- 1 37. **Turbeville, S. D., L. D. Cowan, and J. D. Gass.** 2003. Acute macular
2 neuroretinopathy: a review of the literature. *Surv Ophthalmol* **48**:1-11.
- 3 38. **Verougstraete, C.** 2001. White spots syndromes. *Bull Soc Belge Ophtalmol*:67-78.
- 4 39. **Vianna, R. N., P. C. Ozdal, J. Deschenes, and M. N. Burnier, Jr.** 2006.
5 Combination of azathioprine and corticosteroids in the treatment of serpiginous
6 choroiditis. *Can J Ophthalmol* **41**:183-9.
- 7 40. **Volpe, N. J., J. F. Rizzo, 3rd, and S. Lessell.** 2001. Acute idiopathic blind spot
8 enlargement syndrome: a review of 27 new cases. *Arch Ophthalmol* **119**:59-63.
- 9 41. **Walsh, T. J., and G. Mendelsohn.** 1981. Invasive aspergillosis complicating
10 Cushing's syndrome. *Arch Intern Med* **141**:1227-8.
- 11 42. **Yeo, S. F., and B. Wong.** 2002. Current status of nonculture methods for diagnosis
12 of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* **15**:465-84.

13
14
15

16 **TABLES**

17

TABLE I. SUMMARY OF PATIENTS ANALYZED IN THIS WORK.

AZOR

| PATIENT | BIRTHDATE | GENDER | VISUAL ACUITY | | PRESENT SYMPTOMS |
|------------|------------|--------|---------------|------|---------------------------------|
| | | | RIGHT | LEFT | |
| AZ1 | 05/29/1951 | FEMALE | 0,4 | 0,65 | PARACENTRAL SCOTOMA; PHOTOPSIAS |
| AZ2 | 05/23/1970 | FEMALE | 0,95 | 0,4 | BLURRED VISION; PHOTOPSIAS |
| AZ3 | 08/17/1994 | FEMALE | 0,1 | 0,35 | UNESPECIFIC ALTERED VISION |
| AZ4 | 05/16/1949 | MALE | 0,95 | 0,9 | CENTRAL SCOTOMA |
| AZ5 | 04/07/1943 | FEMALE | 0,035 | 0,15 | BLURRED VISION |

SERPIGINOUS CHOROIDITIS

| PATIENT | BIRTHDATE | GENDER | VISUAL ACUITY | | PRESENT SYMPTOMS |
|------------|------------|--------|---------------|-------|---------------------|
| | | | RIGHT | LEFT | |
| SC1 | 10/11/1946 | MALE | 0,09 | 0,6 | PARACENTRAL SCOTOMA |
| SC2 | 07/17/1935 | MALE | 0,01 | 0,008 | CENTRAL SCOTOMA |
| SC3 | 09/30/1935 | MALE | 0 | 0 | CENTRAL SCOTOMA |
| SC4 | 03/18/1944 | MALE | 0,7 | 0,05 | CENTRAL SCOTOMA |
| SC5 | 09/04/1941 | MALE | 0,2 | 0,9 | CENTRAL SCOTOMA |

1

2

3

**TABLE II. PRESENCE OF ANTIBODIES AGAINST
DIFFERENT CANDIDA SPP. IN PATIENTS' SERA.**

| PATIENT | CF | CA | CP | CG | CK |
|------------|------|-------|------|-------|-----|
| AZ1 | +++ | - | - | - | - |
| AZ2 | - | ++ | - | + | - |
| AZ3 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | + |
| AZ4 | ++++ | ++++ | + | ++++ | + |
| AZ5 | - | - | - | - | - |
| SC1 | + | +++++ | + | ++++ | +++ |
| SC2 | ++++ | ++ | ++ | +++ | - |
| SC3 | - | - | + | - | - |
| SC4 | + | ++++ | - | +++++ | + |
| SC5 | - | ++ | ++ | + | - |

CF: C. famata, CA: C. albicans, CP: C. parapsilosis,

CG: C. glabrata, CK: C. krusei.

Same fluorescence as positive control was marked with +++++,

and same as negative control with -.

4

5

TABLE III. SERUM ANTIGENS IMMUNOREACTING WITH ANTIBODIES AGAINST DIFFERENT YEAST SPECIES, ANALYZED BY DOT-BLOT.

| PATIENT | CA | CP | CG | SC | RM |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AZ1 | 19 | 4 | 17 | 3 | 0 |
| AZ2 | 28 | 2 | 23 | 6 | 0 |
| AZ3 | 11 | 3 | 117 | 10 | 15 |
| AZ4 | 8 | 3 | 13 | 0 | 3 |
| AZ5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| SC1 | 57 | 3 | 4 | 4 | 0 |
| SC2 | 4 | 5 | 11 | 2 | 0 |
| SC3 | 2 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| SC4 | 10 | 18 | 7 | 0 | 3 |
| SC5 | 1 | 5 | 0 | 0 | 1 |

CA: C. albicans, CP: C. parapsilosis, CG: C. glabrata, SC: S. cerevisiae, RM: R. mucilaginosa.

Different dilutions of sera were blotted to a nitrocellulose membrane, which was incubated with rabbit antisera against different yeast species as described in materials and methods. Numbers are the data of optical density obtained by densitometry of the bands.

1

TABLE IV. SUMMARY OF RESULTS OBTAINED

| PATIENT | ANTIBODIES | PCR | ANTIGENS | GLUCANS | INFECTION |
|----------------|-------------------|------------|-----------------|----------------|------------------|
| AZ1 | LOW | 2400 | LOW | NEG | POS |
| AZ2 | LOW | - | LOW | NEG | - |
| AZ3 | HIGH | - | HIGH | NEG | POS |
| AZ4 | HIGH | - | UNC | NEG | UNC |
| AZ5 | NEG | - | NEG | LOW | - |
| SC1 | HIGH | 12500 | HIGH | HIGH | POS |
| SC2 | HIGH | - | UNC | NEG | UNC |
| SC3 | NEG | 1500 | NEG | HIGH | POS |
| SC4 | HIGH | 2000 | LOW | HIGH | POS |
| SC5 | LOW | 1400 | HIGH | NEG | POS |

The consideration of high, low, uncertain or negative was determined as follows: Antibody levels were considered HIGH when the average of fluorescence was ++ or higher; LOW, when it was +; and NEGATIVE if it was less than +. Antigen levels were considered HIGH when the highest value of optical density was 80 or higher; LOW, when it was between 50 and 15; UNCERTAIN, between 15 and 10; and NEGATIVE if it was smaller than 10. Glucan levels were considered HIGH for values higher than 80 pg/ml; LOW, between 80 and 60 pg/ml; and NEGATIVE for values smaller than 60 pg/ml. Patients were considered infected if two or more of the tests were positive, being one of them the PCR or the antigen detection.

1

2 **FIGURE LEGENDS**

3 **Figure 1.** Analysis by immunofluorescence of the presence of antibodies against different
4 yeast species in patient's sera. In the case of *C. famata*, the protocol described in Materials
5 and Methods was followed. As positive control, rabbit antiserum against *C. famata* was
6 employed; as negative control, PBS, instead of primary antibody, was added. For the
7 remaining yeast species, the commercial kit Euroimmun was used and the controls were
8 those provided by the commercial kit.
9 Positive and negative control for each specie is placed in the corresponding column. AZ,
10 AZOOR patient; SC, Serpiginous choroiditis patient; NP, healthy donor.

11 **Figure 2.** Panel A. Quantitative PCR in whole blood. DNA was extracted from 200 µl of
12 blood. PCR was carried out as described in Materials and Methods. Graphic shows the data
13 obtained in number of fungal ribosomic RNA copies per millilitre of blood. Panel B.

1 Estimation of β -(1,3) glucans in different serum samples using the Fungitell commercial kit.
2 The dashed line indicates the minimum level of antigen necessary for the sample to be
3 considered as positive. NP1 and 2 are control sera from healthy donors. AZ, AZOOR
4 patients; SC, Serpiginous choroiditis patients.

5 **Figure 3.** Panel A. Presence of *C. famata* antigens in patient sera analyzed by dot-blot.
6 Different dilutions of sera were blotted to a nitrocellulose membrane, which was incubated
7 with the rabbit antiserum against *C. famata*. NP, control sample using serum from a healthy
8 donor. Control +: serum from a patient with chronic candidiasis. Control -: no human serum
9 added. Panel B. Densitometric values of the 1/500 dilution from the dot blot of the indicated
10 patients. The dot-blot was incubated with the rabbit antiserum raised against *C. famata*. NP1
11 and 2 are control sera from healthy donors. AZ, AZOOR patients; SC, Serpiginous
12 choroiditis patients.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

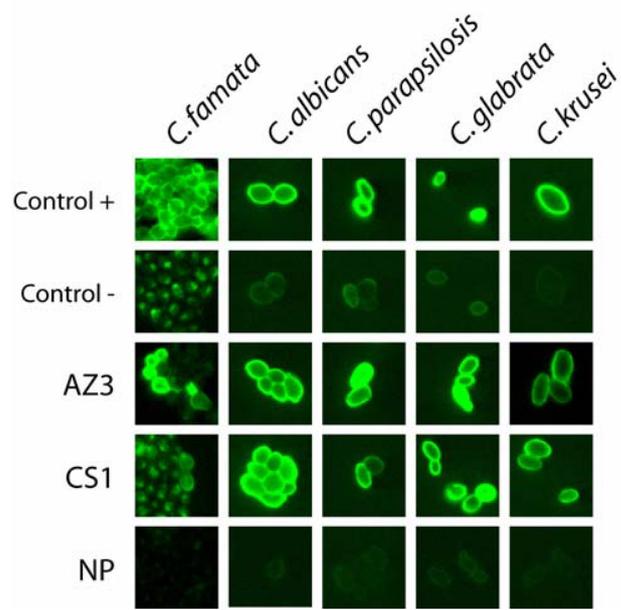


Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

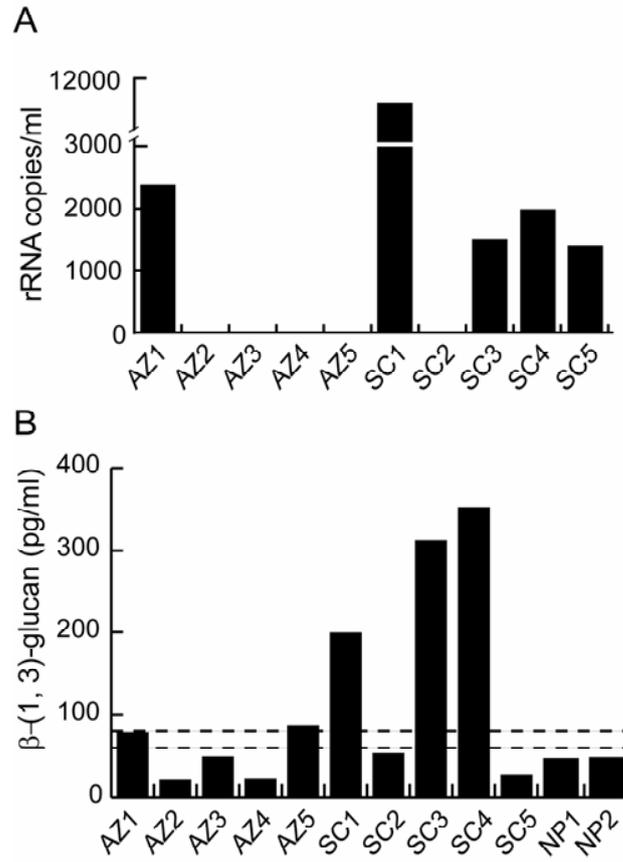


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

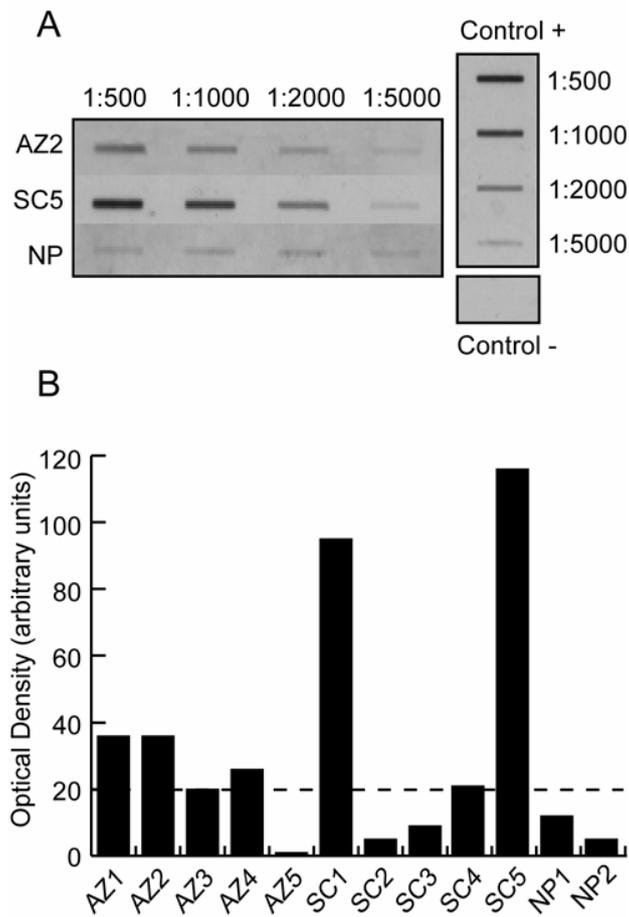


Figure 3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

FUNGAL INFECTION IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Marta Ramos, Diana Pisa, Susana Molina, Alberto Rábano¹, Ángeles Juarranz²
and Luis Carrasco*.

Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM)
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma. Cantoblanco, 28049 Madrid. Spain

¹ Fundación Hospital de Alcorcón
C/ Budapest, 1. 28922 Alcorcón. Madrid. Spain

² Departamento de Biología. Facultad de Ciencias.
Universidad Autónoma. Cantoblanco, 28049 Madrid. Spain

E-mail: Marta Ramos: martaramos@cbm.uam.es; Diana Pisa: dpisa@cbm.uam.es;
Susana Molina: smolina@cbm.uam.es; Alberto Rábano: arabano@fhalcorcon.es;
Ángeles Juarranz: angeles.juarranz@uam.es; Luis Carrasco: lcarrasco@cbm.uam.es.

* Corresponding author

1

2 **SUMMARY**

3 **Background:** Multiple sclerosis is a chronic demyelinating disease of the
4 nervous system that may provoke a variety of symptoms, including motor and sensory
5 dysfunction. It has been suggested that this devastating disease is caused by an infectious
6 process; **Methods:** We investigated the presence of fungal infection in patients
7 diagnosed with multiple sclerosis. Antibodies against different *Candida* species, the
8 presence of fungal antigens, genomes or β -1,3 glucans were analyzed; **Results:** In all
9 seven patients studied, we found some evidence of fungal infection. Some of these
10 patients exhibited high antibody titers against several *Candida* species. In addition,
11 quantitative PCR detected fungal genomes in blood samples from six out of seven
12 patients, four had significant amounts of β -1,3 glucan in serum, and the presence of
13 fungal antigens was evident in all but one of them, though to different extents. Both
14 yeast antibodies and antigens were detected in cerebrospinal fluid. Finally, when we
15 examined brain samples from a patient who died of multiple sclerosis,
16 immunofluorescence assays with *C. famata* antibodies provided evidence of fungal
17 infection in this tissue; **Conclusion:** Two possibilities can be put forward to explain
18 these findings, either fungal infection causes multiple sclerosis or fungal proliferation
19 occurs as a result of immune system dysfunction. The possibility that the etiology of
20 multiple sclerosis is of fungal origin is discussed.

21

22

23 **BACKGROUND**

24 Multiple sclerosis is a demyelinating disease of the central nervous system (CNS)
25 leading to the formation of sclerotic plaques in the brain and spinal cord [1-3]. This

1 complex disease is thought to be triggered by an interaction between genetic and
2 environmental factors [2, 4]. Genetic susceptibility to MS is determined by the HLA-
3 DRB1*1501 class II allele and its interactions with other HLA class II alleles, while
4 other genes play a minor role [4]. MS is prototypical of inflammatory CNS diseases and
5 provokes a variety of clinical symptoms. Motor impairment and sensory organs
6 dysfunction are two major problems associated with MS. Other symptoms include
7 spasticity, fatigue and bladder dysfunction [5-8]. Spasticity in patients with upper motor
8 neuron lesions is due to an abnormal integration of the nervous system motor responses
9 to sensory input, leading to the development of fixed muscle contractures [8]. Fatigue, a
10 common symptom in MS patients, may be caused by diffuse axonal damage and brain
11 atrophy [6]. Bladder dysfunction, another common symptom, may result from spinal
12 cord damage and has a negative impact on life quality [7]. Typically, this chronic disease
13 is recurrent, presenting relapsing-remitting episodes. MS is more prevalent in northern
14 Europe and affects twice as many women as men. It is estimated that about 5 million
15 people are affected worldwide. The exact cause of MS has been the object of intensive
16 research in many laboratories, although the etiology of MS remains enigmatic [9, 10].
17 Autoimmunity has been put forward as a plausible cause of this devastating disease [11,
18 12]. Research in animal models indicates that the presence of autoreactive T cells can
19 result in inflammatory demyelination of the CNS, although similar numbers of myelin-
20 reactive T cells are found in MS patients and healthy subjects [3, 9]. The observation
21 that myelin-reactive T cells from MS patients exhibit a memory or activated phenotype
22 may differentiate the two groups. In fact, relapsing MS patients showed an increased
23 PBMC production of TNF-alpha spontaneously, as compared with MS remission and
24 healthy controls [12]. Autoimmunity may result from the presence of viral proteins or
25 other pathogen antigens that mimic self-protein molecules in the CNS [11-13]. These

1 antigens can prime genetically susceptible individuals, leading to an immunologic
2 challenge and disease through bystander activation by cytokines. However, a disorder of
3 the immune system that attacks oligodendrocytes does not account for some clinical
4 observations [11]. For instance, the existence of distinct foci of degeneration cannot be
5 explained by indiscriminate aggression against glial cells [3, 14]. Moreover, blood vessel
6 inflammation is not easily explained by autoimmunity and destruction of nerve cells.
7 Intensive research to find an infectious agent that directly provokes or triggers MS has
8 been carried out in many laboratories [9, 10, 12, 15]. A number of viruses, mostly from
9 the herpesvirus group, have been proposed as a possible culprit [16-18]. Some
10 investigators have suggested that MS may be caused by bacteria such as *Chlamydia*
11 *pneumoniae* [13, 15].

12 Recently, we found that *Candida famata* is the etiologic agent of acute zonal
13 occult outer retinopathy (AZOOR) [19]. This ocular disease was thought to be an
14 autoimmune disorder that affects the optic nerve and the retina [20, 21]. Some AZOOR
15 patients may also present clinical symptoms in the CNS [21]. Our previous results,
16 prompted us to investigate the existence of fungal infection in MS patients. The present
17 findings provide evidence for the presence of an active fungal infection in these patients.

18

19 **METHODS**

20 **Participants**

21 Seven MS patients were selected to analyze the presence of fungal infection. All
22 these patients were informed about the use of their samples, and their written consent
23 was obtained.

24 Multiple sclerosis samples for immunofluorescence were obtained from the
25 Tissue Bank for Neurological Research (*Banco de Tejidos para Investigación*

1 *Neurológica*, Madrid). The patient, named BC 1083PV, was a female of 52 years. This
2 patient showed a prolonged clinical history of MS and *post mortem* lesions diagnostic of
3 MS.

4

5 **Yeast growth**

6 Yeasts were grown in YEPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2%
7 glucose) by incubation at 30°C. The same medium, containing agar, was used to isolate
8 individual yeast colonies.

9

10 **Antibodies**

11 Rabbit antisera against different yeast species were obtained by inoculation of
12 0.5 ml of phosphate buffered sorbitol (PBS) containing 1 or 2 mg of yeast after
13 autoclaving and lyophilization. Each inoculum had been previously mixed with the same
14 volume of Freund's adjuvant. Rabbits were inoculated up to four times, and the antibody
15 titer and specificity of the sera were tested by immunofluorescence and Western
16 blotting.

17

18 **Immunofluorescence**

19 For *C. famata*, 1 ml of culture was placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes. Cells
20 were washed with PBS, incubated with 50 mM ammonium chloride for 10 min, and
21 washed three times with PBS-Tween 20. Cells were then treated with the different sera
22 diluted 1:500 and 1:5, respectively, in PBS-Tween 20, at 37°C for 2 hours, washed again
23 with PBS-Tween 20 and incubated with the secondary antibody. Rabbit anti-human
24 immunoglobulins IgG+IgA+IgM (Sigma) fluorescein-conjugated antibody was added at
25 a 1:500 dilution. The cells were then washed, resuspended in PBS and mounted on slides

1 with a drop of Depex (Serva). Finally, the cells were observed under a fluorescence
2 microscope. For the remaining *Candida* species, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C.*
3 *parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. krusei*, the commercial kit Euroimmun (Medizinische
4 Labordiagnostika AG) was used in accordance with the manufacturer's instructions and
5 using the same serum dilutions as for *C. famata*. Brain slices for immunofluorescence
6 were obtained from the patient named BC 1083PV, embedded in paraffin. Samples were
7 deparaffinized by overnight incubation at 65°C and immersion in xylol for 1 hour and
8 then immersed in H₂O₂ and incubated in a temperature gradient from 100°C to 70°C.
9 Next, samples were stained with toluidine blue for 2 hours and washed three times with
10 PBS containing 0.1% Triton X-100 at room temperature. Blockade was carried out in
11 PBS containing 1% BSA and 0.1% Triton X-100. Antibody developed in rabbit against
12 *C. parapsilosis* was added at a 1:500 dilution and samples were subsequently washed
13 with PBS, incubated with Alexa 488 anti-rabbit fluorescein-conjugated antibodies
14 (Invitrogen) for 45 minutes, and washed again with PBS. Finally, samples were
15 immersed in H₂O₂, incubated in a temperature gradient as described above, and mounted
16 on slides with a drop of Depex (Serva).

17

18 **PCR analyses**

19 The DNA was extracted from blood according to the following method. One ml
20 of blood was centrifuged at 20000g for 20 minutes. Pellets were resuspended in 1 ml of
21 tri-distilled filtered water and incubated at room temperature for 20 minutes. Samples
22 were centrifuged for 3 minutes at 20000g and washed twice more with tri-distilled
23 filtered water. Pellets recovered from the last centrifugation were resuspended in 300 µl
24 of PBS. Samples were boiled for 10 minutes and then incubated for 2 hours at 37°C with
25 Zimolase (ICN) and for a further 2 hours at 58°C with proteinase K (Sigma). Then, 200

1 μl of a detergent buffer were added and samples were boiled again for 10 minutes before
2 adding 1 ml of phenol:chloroform (1:1) (Amersham) and centrifuged at 20000g for 20
3 minutes. The upper aqueous phase was recovered and washed twice with ethyl ether.
4 The DNA was precipitated by addition of 3 volumes of absolute ethanol (Merck)
5 (−20°C) to the aqueous phase. After storing the samples at −20°C overnight, the DNA
6 was centrifuged at 20000g for 20 min. Pellets were dried and resuspended in H₂O. Real
7 time quantitative PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 thermocycler (Applied
8 biosystems). The reaction mix was prepared with 0.9 μM of each oligonucleotide and
9 0.25 μM of TaqMan probe in a final volume of 20 μl, to which 50 ng of DNA were
10 added. The concentration of DNA template was normalized by prior PCR with specific
11 oligonucleotides, in which DNA was denatured at 95°C for 10 minutes and amplified in
12 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. Data were analyzed using the
13 SDS 7000 (1.1) software.

14

15 **Dot-Blot analyses**

16 200 μl of different serum or cerebrospinal fluid (CSF) dilutions in TBS were
17 added to each well. Samples were blotted onto a 45 mm nitrocellulose membrane (Bio-
18 Rad), previously hydrated in TBS for 10 minutes using the Bio-Dot SF apparatus (Bio-
19 Rad). After blotting, the membrane was processed and developed as described for
20 Western blotting. The primary antibodies, rabbit polyclonal antibodies raised against *C.*
21 *famata*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* or
22 *Saccharomyces cerevisiae* as described above, were used at a 1:1000 dilution. Secondary
23 antibody, a donkey anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody
24 (Amersham Biosciences), was used at a 1:5000 dilution.

25

1 **Detection of fungal polysaccharides**

2 The presence of β -1,3 glucan in serum was detected using the Fungitell kit in the
3 Fontlab laboratories (Barcelona, Spain) [22].

4

5 **RESULTS**

6 **Description of patients**

7 Seven MS patients were selected to analyze the presence of fungal infection. The
8 patient characteristics are presented in Table I.

9 Multiple sclerosis patient (brain bank) BC 1083PV, showed a prolonged clinical
10 history of MS and *post mortem* lesions diagnostic of MS.

11

12 **Analyses to detect fungal infection**

13 Given the lack of a single definitive test to assess fungal infection, different
14 assays were needed. In order to investigate fungal infection in patients diagnosed with
15 MS, we carried out the following analyses in serum or whole blood: 1. Fungal growth in
16 appropriate media. 2. Antibodies against different *Candida* species assayed by
17 immunofluorescence. 3. Fungal genomes using quantitative PCR. 4. Fungal
18 polysaccharides (β -1,3 glucans) measured by the commercial Fungitell kit. 5. Presence
19 of *Candida famata* and other yeast antigens estimated by dot-blot analyses.

20

21 **Fungal Culture**

22 Fungal growth was negative when 200 μ l of serum or whole blood were seeded
23 in liquid or agar YEPD media.

24

25 **Presence of antibodies against yeasts**

1 To analyze yeast antibodies in serum from MS patients, immunofluorescence
2 assays were carried out against the following *Candida* species: *C. famata*, *C. albicans*,
3 *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. Figure 1 shows the immunofluorescence
4 obtained with control serum from a healthy volunteer as compared to two samples from
5 MS patients. It is evident that the majority of MS patients have a very strong presence of
6 antibodies against yeast. The *Candida* species recognized by these antibodies vary from
7 patient to patient, thus, some patients possess high antibody titers that immunoreact with
8 several yeast species (see patient 4) whereas others have a rather small antibody
9 response (Table II). The presence of these antibodies certainly suggests a disseminated
10 yeast infection, although their absence cannot definitively rule out this type of infection.
11 The differences in the antibody response observed between patients may reflect the
12 presence of different yeast infections. Alternatively, these differences may arise from
13 variations in the immune response of each patient to fungal infection. We must stress
14 that the presence of these antibodies is indicative of an ongoing yeast infection but not
15 conclusive.

16

17 **Quantitative PCR assays of blood**

18 Detection of yeast genomes in peripheral blood provides compelling evidence of
19 disseminated fungal infection. Yeast cells can be phagocytosed and so lose viability, but
20 the presence of genomes can still be revealed by PCR. Therefore, DNA was extracted
21 from whole blood and quantitative PCR was performed using the appropriate
22 oligonucleotides. All patients, except one (patient 2) had fungal genomes in circulating
23 blood (Table III). These findings strongly suggest that disseminated fungal infection is
24 present.

25

1 **Analysis of β -1,3 glucans in serum**

2 Another assay that is increasingly being employed to diagnose a fungal infection
3 uses the Fungitell kit. This assay measures β -1,3 glucans, typical fungal polysaccharides
4 that are not synthesized by humans. The results, included in table III, show that four of
5 the patients' sera were positive in this assay, while one of them was inconclusive
6 (patient 3) and another was negative (patient 5). Once again this assay points to the
7 possibility of a disseminated fungal infection in five patients.

9 **Yeast antigens analyzed by dot-blot assay**

10 One of the most sensitive tests to assess the presence of yeast antigens in serum
11 is the use of the dot-blot assay. In this test, different serum concentrations are transferred
12 to a nitrocellulose membrane and immunoblotted using a polyclonal rabbit antiserum
13 raised against *C. famata* or other yeast species. Three patients (1, 5 and 7) were positive
14 when *C. famata* antibodies were employed (Table IV). This finding indicates that
15 antigens from this yeast specie were present in peripheral blood when the sample was
16 taken. To further analyze yeast antigens from other species, the dot-blot assay was
17 carried out employing different polyclonal rabbit antibodies. The results from these
18 different assays are summarized in Table IV. Notably, large amounts of antigens related
19 to *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *R. mucilaginosa* were detected in patient
20 4, whereas no *S. cerevisiae* antigens were found. In addition, patient 2 had *C.*
21 *parapsilosis*-related antigens, patient 3 was positive for *R. mucilaginosa* and patient 7
22 was positive for both *C. albicans* and *C. parapsilosis*. In conclusion, only patient 6 was
23 negative for the presence of antigen against all the antibodies tested.

24 Taken together, these results provide strong evidence that all seven patients
25 suffered disseminated fungal infection.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Presence of antibodies and fungal antigens in CSF

The presence of oligoclonal IgG bands in the CSF is typical of MS patients [14]. Many studies have suggested that these antibodies recognize myelin, although only recently it has become possible to characterize the antibody response on a molecular level. Such characterization strongly suggests that a B-cell response to a specific antigen is occurring in the central nervous system [23]. It was of interest to test for the presence of antibodies that recognize *Candida* species in CSF. We therefore compared the CSF of patient 4 with that of two controls without MS. The amount of IgG in the CSF of patient 4 was 0.107 mg/ml, ten times lower than that estimated in blood (1.17 mg/ml). Figure 2 shows that CSF of patient 4 has antibodies that immunoreact with *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and, to a lesser extent, with *C. famata*.

Yeast antigens in CSF were analyzed by a dot-blot assay following the protocol described in Methods. Notably, *C. famata* antigens were present in CSF of patient 4, while these antigens were not observed in the two CSF controls. In summary, there is evidence that the CSF of the MS patient assayed contains both antibodies and antigens related to *Candida* species.

Evidence of yeast infection in brain tissue

To analyze whether yeast infection may occur directly in the CNS, samples were obtained from the brain of a patient who died of MS. The brain slices were incubated with *C. famata* antibodies and submitted to an immunofluorescence assay. Notably, this assay revealed the presence of typical fungal structures in brain samples from the MS patient analyzed (Figure 4).

1 DISCUSSION

2 Two possibilities may explain the existence of fungal infection in MS patients.
3 One is that this infection is the actual cause of the disease. Alternatively, infection may
4 be a consequence of immune dysfunction in these patients [9, 10]. Whichever is the
5 case, if fungal infection exists it should be treated appropriately with antifungal
6 compounds. The presence of such an infection, even if it does not cause MS, may
7 negatively affect the clinical course of MS. Patients with MS are usually treated with
8 corticosteroids and other immunosuppressive agents, which may favour fungal
9 infections [24, 25]. In such cases, diagnosis of this type of infection must be taken into
10 consideration in the management of these patients. It is remarkable that all seven patients
11 analyzed in our study showed signs of disseminated fungal infection, detected with non-
12 invasive techniques such as peripheral blood tests.

13 A number of observations do not permit us to rule out the possibility that fungal
14 infection itself causes MS. Mycoses are usually persistent and recurrent if they remain
15 untreated. A variety of fungi, including species of the genus *Candida*, can infect the
16 CNS provoking demyelination [3, 26, 27]. Routine tests in hospital laboratories are
17 unable to detect infections by several yeast species that induce a lower inflammatory
18 response than *C. albicans*. Experimental animals infected with *C. famata* survive
19 infection, unlike *C. albicans* [28]. Typically, granulomas develop in some mouse tissues
20 after infection with *C. famata*, even though yeast cells are difficult to detect [28]. These
21 granulomas consist of infiltrates of different immune cells, such as monocytes and
22 neutrophils, which resemble those described in MS [29-31]. Furthermore, granuloma
23 formation has been described in humans and animals infected with different fungal
24 species [29, 31, 32]. Another point of interest is that yeast infections are localized in
25 discrete foci and patches, which could explain why the damage to the CNS in MS is

1 restricted to discrete areas [3, 30, 33]. An autoimmune response to a given CNS antigen
2 would result in indiscriminate damage to all tissues bearing this antigen, but this is not
3 observed in MS. In addition, the vascular inflammation described in some MS patients
4 may be the result of yeast colonization, since the tropic characteristics of yeast are
5 conducive to endovascular infection [34, 35]. On the other hand, calcification and tissue
6 sclerosis have been linked with *Candida* growth and infection [36-38]. Thus, it is
7 possible that the formation of plaques in MS may be due to fungal infection. During
8 relapse, the immune response observed in MS patients produces increases in certain
9 interleukins such as TNF, IFN- γ and IL-1, which are indicative of predominance of the
10 Th1 pathway [1, 11, 23, 30]. However, MS patients show a low level of these
11 interleukins during remission. Interestingly, fungal infections can elicit the Th1 pathway
12 with production of TNF, IFN- γ , IL-1, IL-6 and IL-12, leading to protective immunity, or
13 they can induce the production of IL-4 and IL-10 typical of Th2 response, which is
14 associated with disease exacerbation and pathology [11]. Which of these pathways is
15 induced depends on a variety of variables, such as the immune status, the fungal species
16 and the route of infection, among others [39]. The balance between Th1 and Th2
17 cytokines may be important for optimal antifungal protection [40]. If this equilibrium is
18 destabilized following a Th2 response, the yeast could move from the intestine to the
19 blood to produce an infection. The imbalance in Th1/Th2 could correspond to the
20 relapses and remissions in MS [11, 40].

21 Another point to consider is that when yeast infections become established at
22 particular locations, tissue sclerosis and low pH may arise due to fungal metabolism,
23 provoking the precipitation of calcium carbonate [37]. This reaction would account for
24 the formation of sclerotic plaques in MS. A genetic predisposition to MS has been
25 established [2]. This is not inconsistent with the possible fungal origin of MS, since the

1 genetic background of a given person may determine susceptibility of fungal
2 colonization [39]. In summary, to our knowledge, none of the clinical symptoms and
3 observations described for MS patients rule out the possibility that the disease may be
4 caused by a fungal infection. This reasoning, together with the findings reported in the
5 present study, add support to the notion that the etiology of MS may be of fungal origin.

6 Recently, we reported that the cause of AZOOR was a *C. famata* infection [19].
7 It was previously thought that AZOOR was also an immune disorder. We have analyzed
8 in detail the evolution of an AZOOR patient over a ten-year period (data not shown).
9 Despite the administration of different antifungal treatments, total eradication of this
10 disease has not been yet achieved, although a clear diminution of the disseminated
11 candidiasis has occurred. Curiously, a patient suffering from AZOOR and MS has
12 recently been reported [41]. Although some AZOOR patients may have a CNS infection
13 that does not produce the clinical symptoms of MS, it is possible that the genetic makeup
14 of this AZOOR patient predisposes him to the development of MS.

15 The lack of a universal assay to assess disseminated candidiasis has prompted us
16 to employ a number of techniques to test for this type of infection in MS patients. Thus,
17 high antibody titer against *Candida* species is indicative of an ongoing infection.
18 Treatment of a *C. famata*-infected patient with antifungal compounds led to the
19 disappearance of these antibodies within a few months. The presence of high antibody
20 titers in patients 1, 4, 6 and 7 is indicative of disseminated candidiasis. The contrary is
21 not true because antibodies against *Candida* may be absent even during infection
22 depending on the tissues infected, the immune status of the patient, and a series of other
23 factors [42]. In conclusion, to assess candidiasis, the antibody response should be
24 estimated, but in some instances it may not be indicative of infection. More conclusive is
25 the analysis of fungal components in peripheral blood. Notably, in six out of seven

1 patients, fungal sequences were detected in blood stream with quantitative PCR. On its
2 own, this is compelling evidence for disseminated fungal infection. Other assays can
3 also complement the data obtained by PCR. Thus, high levels of β -1,3 glucans were
4 found in three of the patients. Moreover, analysis of circulating yeast antigens suggests
5 that four such antigens related to different *Candida* species were present in four patients.
6 It must be remarked that no *S. cerevisiae* antigens were detected. We interpret this result
7 as an indication that some yeast proteins are secreted into blood stream, allowing
8 detection by a dot-blot assay. Secretion of such proteins may depend on many factors,
9 such as the site of infection, the diet, and the different treatments followed [43]. With all
10 our results taken together, we conclude that there is evidence for disseminated fungal
11 infection in all the seven MS patients analyzed in this work.

12 Of interest is the finding that the CSF of patient 7 exhibits antibodies that
13 immunoreact with different yeast species. Moreover, the presence of yeast antigens in
14 CSF suggests fungal infection in the CNS. Particular attention should be paid to the
15 immunofluorescence observations in the CNS of a patient who died of MS. The presence
16 of typical hyphae structures supports the idea that the CNS underwent a fungal infection.
17 To determine whether mycoses are the cause or a consequence of MS, clinical trials with
18 antifungal compounds must be carried out, although selection of the antifungal
19 compound must be done with care. Before choosing the antifungal compound, it is
20 necessary to determine the fungal species that actually causes infection, since some yeast
21 species are resistant to several antifungal compounds [44], and the bioavailability and
22 distribution of the antifungal employed in the CNS would need to be considered [45].
23 Ultimately, such clinical trials could help determine whether the etiology of MS is of
24 fungal origin, and if this is the case, MS patients may immediately benefit from the use
25 of available antifungal compounds.

1

2 **CONCLUSION**

3 Fungal infection was evidenced in peripheral blood from seven patients
4 diagnosed with multiple sclerosis. In addition, fungal antibodies and antigens were
5 present in the CSF of a patient analyzed. Fungal infection also appeared in the brain of a
6 person who died of MS.

7

8 **COMPETING INTERESTS**

9 The authors declare that they have no competing interests.

10

11 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

12 MR carried out the DNA extraction and the quantitative PCR; DP carried out the
13 immunoassays; SM participated in the immunological studies and carried out the β
14 glucan analyses; AR and AJ are responsible for the immunopathological analyses; LC is
15 the coordinator of the study and carried out the selection of the patients. All authors read
16 and approved the final manuscript.

17

18 **ACKNOWLEDGEMENTS**

19 We want to express our gratitude to the Organización Nacional de Ciegos
20 Españoles (ONCE) for their help and financial support. The institutional grant to Centro
21 de Biología Molecular from Fundación Ramón Areces is acknowledged.

22

23 **REFERENCES**

- 24 1. Barnett MH, Sutton I: **The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift.**
25 *Curr Opin Neurol* 2006, **19**(3):242-247.

- 1 2. Compston A, Coles A: **Multiple sclerosis**. *Lancet* 2002, **359**(9313):1221-1231.
- 2 3. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann
3 M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H: **Cortical demyelination and
4 diffuse white matter injury in multiple sclerosis**. *Brain* 2005, **128**(Pt 11):2705-
5 2712.
- 6 4. Kantarci O, Wingerchuk D: **Epidemiology and natural history of multiple
7 sclerosis: new insights**. *Curr Opin Neurol* 2006, **19**(3):248-254.
- 8 5. Cater RE, 2nd: **Chronic intestinal candidiasis as a possible etiological factor
9 in the chronic fatigue syndrome**. *Med Hypotheses* 1995, **44**(6):507-515.
- 10 6. Colombo B, Annovazzi P, Comi G: **Understanding fatigue in multiple
11 sclerosis: new insights in causes and assessment**. *Neurol Sci* 2006, **27 Suppl**
12 **4**:s304-306.
- 13 7. Fowler CJ, Kalsi V: **Bladder dysfunction in multiple sclerosis**. *Neurol Sci*
14 2006, **27 Suppl 4**:s323-327.
- 15 8. Pappalardo A, Castiglione A, Restivo DA, Calabrese A, Cimino V, Patti F:
16 **Pharmacologic management of spasticity in multiple sclerosis**. *Neurol Sci*
17 2006, **27 Suppl 4**:s310-315.
- 18 9. Gilden DH: **Infectious causes of multiple sclerosis**. *Lancet Neurol* 2005,
19 **4**(3):195-202.
- 20 10. Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Munz C, Sriram S, Steiner I,
21 Hammerschlag MR, Gaydos CA: **Infectious causes of multiple sclerosis**.
22 *Lancet Neurol* 2006, **5**(10):887-894.
- 23 11. Hollifield RD, Harbige LS, Pham-Dinh D, Sharief MK: **Evidence for cytokine
24 dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell**

- 1 **production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during**
2 **relapse and remission.** *Autoimmunity* 2003, **36**(3):133-141.
- 3 12. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS: **Multiple sclerosis and virus induced**
4 **immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and**
5 **augmented by bystander activation.** *Autoimmunity* 2006, **39**(1):9-19.
- 6 13. Westall FC: **Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis.**
7 *J Clin Microbiol* 2006, **44**(6):2099-2104.
- 8 14. Alvarez Cermeno JC: **[Initial axonal lesion in multiple sclerosis. Reasons for**
9 **early treatment]**. *Rev Neurol* 2002, **35**(3):221-227.
- 10 15. Stratton CW, Wheldon DB: **Multiple sclerosis: an infectious syndrome**
11 **involving Chlamydomonas pneumoniae.** *Trends Microbiol* 2006, **14**(11):474-
12 479.
- 13 16. Alonso A, Egues Olazabal N, Ayo Martin O: **[Infection by Epstein-Barr virus**
14 **and multiple sclerosis]**. *Neurologia* 2006, **21**(5):249-255.
- 15 17. Haahr S, Hollsberg P: **Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus**
16 **infection.** *Rev Med Virol* 2006, **16**(5):297-310.
- 17 18. Pietropaolo V, Fioriti D, Mischitelli M, Anzivino E, Santini M, Millefiorini E, Di
18 Rezze S, Degener AM: **Detection of human herpesviruses and**
19 **polyomaviruses DNA in a group of patients with relapsing-remitting**
20 **multiple sclerosis.** *New Microbiol* 2005, **28**(3):199-203.
- 21 19. Carrasco L, Ramos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M, Gonzalez ME: **Isolation of**
22 **Candida famata from a patient with acute zonal occult outer retinopathy.** *J*
23 *Clin Microbiol* 2005, **43**(2):635-640.

- 1 20. Gass JD: **Are acute zonal occult outer retinopathy and the white spot**
2 **syndromes (AZOOR complex) specific autoimmune diseases?** *Am J*
3 *Ophthalmol* 2003, **135**(3):380-381.
- 4 21. Jacobson DM: **Acute zonal occult outer retinopathy and central nervous**
5 **system inflammation.** *J Neuroophthalmol* 1996, **16**(3):172-177.
- 6 22. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A: **Contribution of (1->3)-beta-D-glucan**
7 **chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive**
8 **aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial**
9 **screening for circulating galactomannan.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(1):299-
10 305.
- 11 23. Frohman EM, Racke MK, Raine CS: **Multiple sclerosis--the plaque and its**
12 **pathogenesis.** *N Engl J Med* 2006, **354**(9):942-955.
- 13 24. Khan ZU, Misra VC, Randhawa HS, Damodaran VN: **Pathogenicity of some**
14 **ordinarily harmless yeasts for cortisone-treated mice.** *Sabouraudia* 1980,
15 **18**(4):319-327.
- 16 25. Procop GW, Roberts GD: **Emerging fungal diseases: the importance of the**
17 **host.** *Clin Lab Med* 2004, **24**(3):691-719, vi-vii.
- 18 26. del Brutto OH: **[Central nervous system mycotic infections].** *Rev Neurol* 2000,
19 **30**(5):447-459.
- 20 27. Lipton SA, Hickey WF, Morris JH, Loscalzo J: **Candidal infection in the**
21 **central nervous system.** *Am J Med* 1984, **76**(1):101-108.
- 22 28. Pacheco M: **Interacción de Candida famata con células en cultivo y animales**
23 **de experimentación.** Cantoblanco (Madrid): Universidad Autónoma de Madrid;
24 2006.

- 1 29. Dubey A, Patwardhan RV, Sampth S, Santosh V, Kolluri S, Nanda A:
2 **Intracranial fungal granuloma: analysis of 40 patients and review of the**
3 **literature.** *Surg Neurol* 2005, **63**(3):254-260; discussion 260.
- 4 30. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W: **The pathology of multiple sclerosis.** *Neurol*
5 *Clin* 2005, **23**(1):77-105, vi.
- 6 31. Weisberg LA: **Granulomatous diseases of the CNS as demonstrated by**
7 **computerized tomography.** *Comput Radiol* 1984, **8**(5):309-317.
- 8 32. Fan YM, Huang WM, Li SF, Wu GF, Lai K, Chen RY: **Granulomatous skin**
9 **infection caused by Malassezia pachydermatis in a dog owner.** *Arch*
10 *Dermatol* 2006, **142**(9):1181-1184.
- 11 33. Geirsson AJ, Akesson A, Gustafson T, Elnor A, Wollheim FA:
12 **Cineradiography identifies esophageal candidiasis in progressive systemic**
13 **sclerosis.** *Clin Exp Rheumatol* 1989, **7**(1):43-46.
- 14 34. Anstead GM, Martinez M, Graybill JR: **Control of a Candida glabrata**
15 **prosthetic endovascular infection with posaconazole.** *Med Mycol* 2006,
16 **44**(3):273-277.
- 17 35. Takeda S, Wakabayashi K, Yamazaki K, Miyakawa T, Arai H: **Intracranial**
18 **fungal aneurysm caused by Candida endocarditis.** *Clinical neuropathology*
19 1998, **17**(4):199-203.
- 20 36. Elias J, Jr., dos Santos AC, Carlotti CG, Jr., Colli BO, Canheu A, Matias C,
21 Furlanetti L, Martinez R, Takayanagui OM, Sakamoto AC *et al*: **Central**
22 **nervous system paracoccidioidomycosis: diagnosis and treatment.** *Surg*
23 *Neurol* 2005, **63 Suppl 1**:S13-21; discussion S21.
- 24 37. Ennever J, Summers FE: **Calcification by Candida albicans.** *J Bacteriol* 1975,
25 **122**(3):1391-1393.

- 1 38. Gil Hernandez MA, Abreu Reyes P, Martin V: **[Ischemic anterior syndrome**
2 **and intraocular calcification]**. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2003, **78**(6):319-322.
- 3 39. Mencacci A, Cenci, E., Del Sero,G., Fè d'Ostiani,C., Montagnoli, C., Bacci,
4 A., Bistoni,F. and Romani, L.: **Innate and adaptive immunity to *Candida***
5 ***albicans*: A new view of an old paradigm**. *Rev Iberoam Micol* 1999, **16**:4-7.
- 6 40. Shoham S, Levitz SM: **The immune response to fungal infections**. *Br J*
7 *Haematol* 2005, **129**(5):569-582.
- 8 41. Hintzen RQ, van den Born LI: **Acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR)**
9 **and multiple sclerosis**. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006.
- 10 42. Ellepola AN, Morrison CJ: **Laboratory diagnosis of invasive candidiasis**. *J*
11 *Microbiol* 2005, **43 Spec No**:65-84.
- 12 43. Santelmann H, Howard JM: **Yeast metabolic products, yeast antigens and**
13 **yeasts as possible triggers for irritable bowel syndrome**. *Eur J Gastroenterol*
14 *Hepatol* 2005, **17**(1):21-26.
- 15 44. Bretagne S, Costa JM: **Towards a molecular diagnosis of invasive**
16 **aspergillosis and disseminated candidosis**. *FEMS Immunol Med Microbiol*
17 2005, **45**(3):361-368.
- 18 45. Kauffman CA: **Fungal infections**. *Proc Am Thorac Soc* 2006, **3**(1):35-40.
- 19 46. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH: **Invasive candidiasis in**
20 **immunocompromised hospitalized patients**. *Arch Med Res* 2005, **36**(6):660-
21 671.
- 22 47. **<http://dogcat11221122.hp.infoseek.co.jp/fungus.html>**
- 23 48. **Biotechnologie, vues pédagogiques** [<http://py.guillaume1.free.fr/>]
- 24
- 25

1 **FIGURE LEGENDS**

2 **Figure 1.** Immunofluorescence analysis of the presence of antibodies against different
3 yeast species in patients' sera. In the case of *C. famata*, the protocol described in
4 Materials and Methods was followed. As positive control, rabbit antiserum against *C.*
5 *famata* was employed; as negative control, PBS was added instead of primary antibody.
6 For the remaining yeast species, the commercial kit Euroimmun was used. In this case,
7 the controls were those provided by the commercial kit. MS, Multiple sclerosis patient;
8 NP, healthy donor, used as a negative control.

9 **Figure 2.** Analysis by immunofluorescence of the presence of antibodies against
10 different yeast species in cerebrospinal fluid from a multiple sclerosis patient. In the
11 case of *C. famata*, the protocol described in Materials and Methods was followed. As
12 positive control, rabbit antiserum against *C. famata* was employed; as negative control,
13 PBS was added instead of primary antibody. For the remaining yeast species, the
14 commercial kit Euroimmun was used. In this case, the controls were those provided by
15 the commercial kit. MS, Multiple sclerosis patient; NP1 and NP2, cerebrospinal fluid
16 from healthy donors, used as negative controls.

17 **Figure 3.** Presence of *C. famata* antigens in patients' CSFs analyzed by dot-blot assay.
18 Different dilutions (indicated in upper part or the right side in the case of control +) of
19 sera were blotted to a nitrocellulose membrane, which was incubated with the rabbit
20 antiserum against *C. famata*. Control +: serum from a patient with chronic candidiasis.
21 Control -: no human serum added. MS, Multiple sclerosis patient; NP, control serum
22 from healthy donor.

23 **Figure 4.** Analysis by immunofluorescence of fungal structures in brain slices obtained
24 from multiple sclerosis patients [46], using an anti *C. parapsilosis* antibody. Slices were
25 processed as described in Material and Methods. A, Hypha-like structures. Below the

1 immunofluorescence are images of hyphae and arthrospores from *Trichosporon beigeli*
 2 and *Geotrichum* spp. respectively. Sources: [http://dogcat11221122.hp.infoseek.co.jp/](http://dogcat11221122.hp.infoseek.co.jp/fungus.html)
 3 <http://py.guillaume1.free.fr/> [47] and <http://py.guillaume1.free.fr/> [48]. B, spore- or yeast- like
 4 structures. Below, images of spores from *Penicillium* spp., obtained from
 5 <http://py.guillaume1.free.fr/>. C, Control -: brain sample from healthy donor.

TABLE I. SUMMARY OF PATIENTS ANALYZED IN THIS WORK.

| PATIENT | BIRTH YEAR | GENDER | COMMENTS |
|----------------|-------------------|---------------|------------------------------------|
| MS1 | 1970 | FEMALE | WHEEL CHAIR |
| MS2 | 1980 | FEMALE | SOME DIFFICULTIES TO WALK AND TALK |
| MS3 | 1951 | MALE | WHEEL CHAIR |
| MS4 | 1978 | MALE | WHEEL CHAIR |
| MS5 | 1962 | FEMALE | SLIGHT PROBLEMS TO WALK |
| MS6 | 1962 | FEMALE | WHEEL CHAIR |
| MS7 | 1954 | FEMALE | SLIGHT PROBLEMS TO WALK |

6

7

TABLE II. PRESENCE OF SERUM ANTIBODIES AGAINST DIFFERENT CANDIDA SPP.

| PATIENT | CF | CA | CP | CG | CK |
|---------|-------|-------|-------|-------|----|
| MS1 | ++ | ++++ | - | +++ | - |
| MS2 | ++ | +++++ | ++++ | ++++ | + |
| MS3 | - | - | + | + | ++ |
| MS4 | +++++ | +++++ | +++ | + | - |
| MS5 | + | +++++ | +++++ | +++++ | ++ |
| MS6 | - | - | - | - | - |
| MS7 | ++ | +++ | - | + | - |

CF: *C. famata*, CA: *C. albicans*, CP: *C. parapsilosis*,
CG: *C. glabrata*, CK: *C. krusei*.

Same fluorescence as positive control was marked with +++++, and same as negative control with -.

1
2
3
4
5
6
7

8

TABLE III. SUMMARY OF RESULTS OF QUANTITATIVE PCR AND β -GLUCAN MEASUREMENT

9

| PATIENT | PCR (rRNA copies/ml) | FUNGITELL (glucan pg/ml) |
|---------|----------------------|--------------------------|
| MS1 | 5423 | 95 + |
| MS2 | - | 162 + |
| MS3 | 1746 | 62 UNC |
| MS4 | 5596 | 236 + |
| MS5 | 4979 | 48 - |
| MS6 | 6708 | ND ND |
| MS7 | 2123 | 312 + |

Glucan levels were considered POSITIVE for values higher than 80 pg/ml; UNCERTAIN, between 80 and 60 pg/ml; and NEGATIVE for values smaller than 60 pg/ml.

TABLE IV. SERUM ANTIGENS IMMUNOREACTING WITH ANTIBODIES AGAINST DIFFERENT YEAST SPECIES, ANALYZED BY DOT-BLOT.

| PATIENT | CF | CA | CP | CG | SC | RM |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| MS1 | 52 | 12 | 10 | 7 | 0 | 11 |
| MS2 | 8 | 11 | 15 | 12 | 1 | 14 |
| MS3 | 17 | 7 | 4 | 5 | 1 | 21 |
| MS4 | 18 | 27 | 21 | 3 | 1 | 6 |
| MS5 | 7 | 6 | 9 | 10 | 0 | 9 |
| MS6 | 18 | 236 | 147 | 48 | 43 | 136 |
| MS7 | 20 | 5 | 2 | 0 | 0 | 10 |

CA: *C. albicans*, CP: *C. parapsilosis*, CG: *C. glabrata*, SC: *S. cerevisiae*, RM: *R. mucilaginosa*.

Different dilutions of sera were blotted to a nitrocellulose membrane, which was incubated with rabbit antisera against different yeast species as described in materials and methods. Numbers are the data of optical density obtained by densitometry of the bands.

Antigen levels were considered high when the highest value of optical density was 80 or higher; low, when it was between 50 and 15; uncertain, between 15 and 10; and negative if it was smaller than 10.

1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

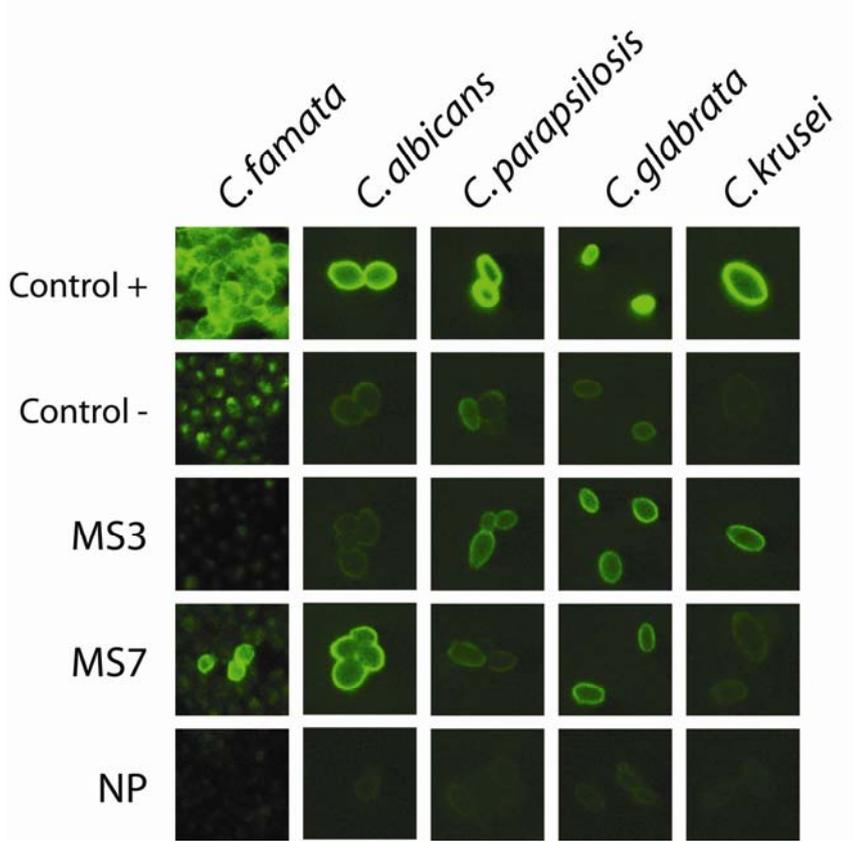


Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

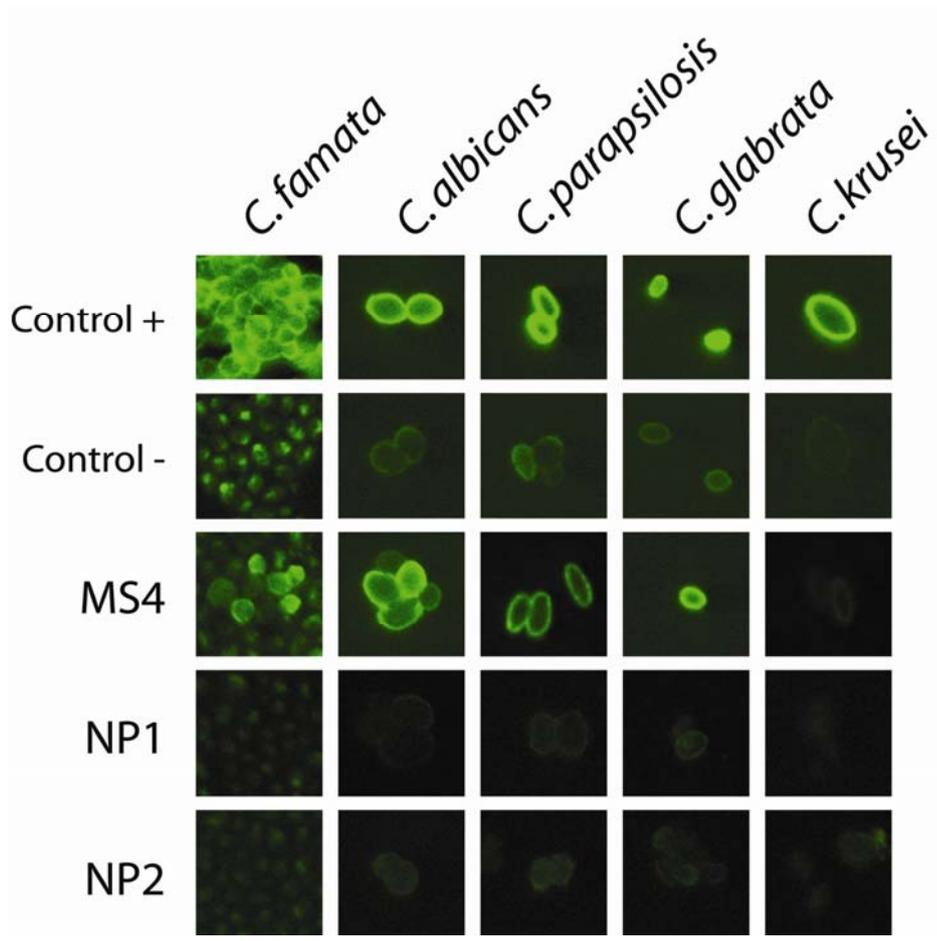


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

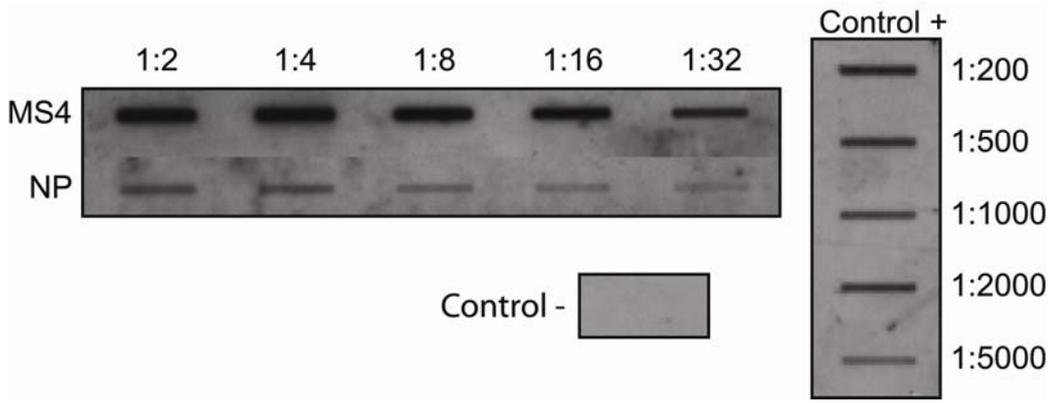


Figure 3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

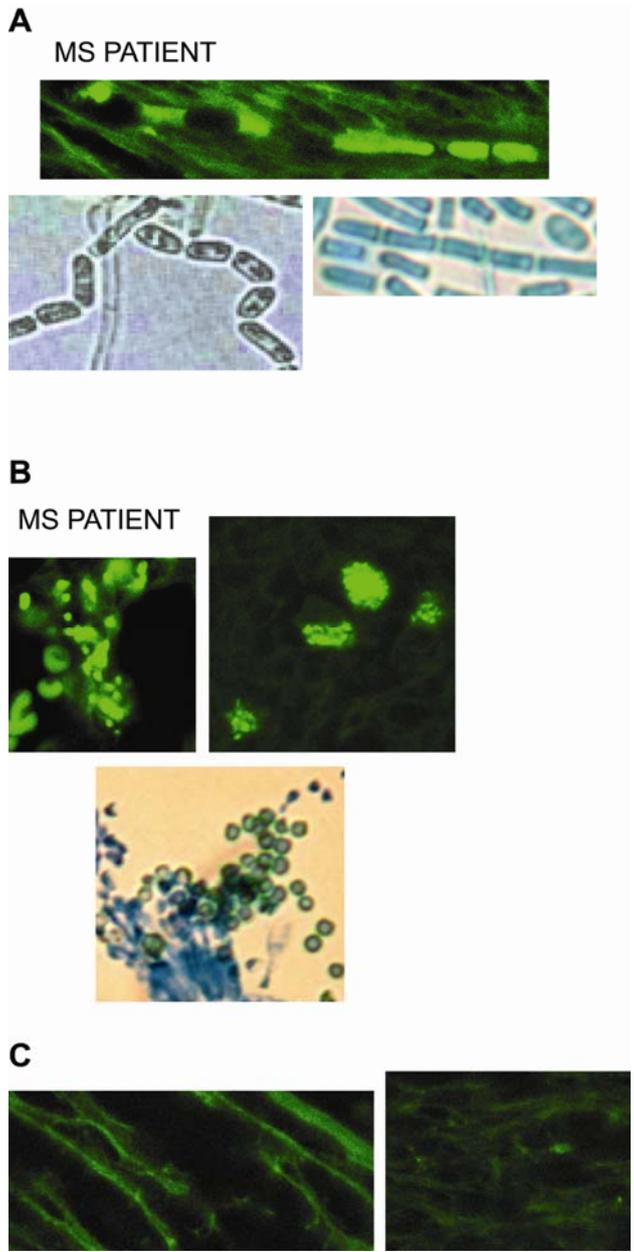


Figure 4

