

Variabilidad genética de aislados del complejo *Candida parapsilosis* en dos servicios de un hospital terciario de la Ciudad de México.

Eduardo García-Salazar¹, Esperanza Duarte-Escalante², María del Rocío López-Álvarez³, Erick Martínez-Herrera¹, Gustavo Acosta-Altamirano¹, María del Rocío Reyes-Montes² y María Guadalupe Frías De León¹.

¹Dirección de Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, México.

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

³Laboratorio de Microbiología, Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza”, ISSSTE, Ciudad de México, México.

Palabras clave: complejo *Candida parapsilosis*; RAPD; variabilidad genética.

Resumen. La infección causada por el complejo *Candida parapsilosis* puede presentarse esporádicamente o en forma de brotes, por lo que el estudio de la variabilidad genética de los aislados clínicos puede revelar la presencia de genotipos endémicos y la ocurrencia de transmisión horizontal. Este estudio analizó, mediante Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPD) con cuatro oligonucleótidos (M13, AP3, T3B y R108), la variabilidad genética de 11 aislados clínicos del complejo *C. parapsilosis*, obtenidos en los servicios de Medicina Interna y Cirugía General de un hospital de la Ciudad de México, e identificar si los pacientes fueron infectados por el mismo genotipo. La cepa ATCC® 22019™ fue incluida en el análisis. Los aislados se identificaron por VITEK 2 Compact® y PCR. Con base en los perfiles polimórficos, se construyó un dendrograma por UPGMA y se calcularon el coeficiente de correlación cofenética (CCC_r), el índice de asociación (I_A) y los indicadores de diversidad genética. Todos los aislados fueron identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*. El dendrograma mostró dos grupos (I y II), en el I se encontraron tres genotipos integrados por la cepa 22019 y cinco aislados asociados en su mayoría a candidiasis invasiva; el II mostró seis genotipos integrados por seis aislados asociados en su mayoría a candidiasis mucocutánea. El I_A y los indicadores de diversidad genética obtenidos revelaron un sistema de reproducción recombinante. El RAPD con los oligonucleótidos M13, AP3, T3B y R108 es útil en la investigación de posibles brotes causados por *C. parapsilosis* y en la determinación de su variabilidad genética.

Autor de correspondencia: María Guadalupe Frías De León. Dirección de Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca. Pueblo de Zoquiapan, 56530, Ixtapaluca, México. Correo electrónico: magpefrías@gmail.com.

Genetic variability of isolates of *Candida parapsilosis* complex in two services of a tertiary hospital in Mexico City.

Invest Clin 2017; 58(3): 227 - 237

Keywords: *Candida parapsilosis* complex; RAPD; genetic variability.

Abstract. The infection caused by the *Candida parapsilosis* complex may occur sporadically or in the form of outbreaks, so the study of the genetic variability in clinical isolates may reveal the presence of endemic genotypes and the occurrence of horizontal transmission. This study analyzed the genetic variability of 11 clinical isolates of the *C. parapsilosis* complex obtained from Internal Medicine and General Surgery services of a hospital in Mexico City, using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) with four oligonucleotides (M13, AP3, T3B and R108), also evaluated whether the patients were infected by the same genotype. The strain ATCC® 22019™ was included in the analysis. Isolates were identified by VITEK 2 Compact® and PCR. With the polymorphic profiles, a dendrogram was constructed by UPGMA and the cophenetic correlation coefficient (CCC_r), the association index (I_A), and the indicators of genetic diversity were calculated. All isolates were identified as *C. parapsilosis sensu stricto*. The dendrogram showed two groups (I and II). Three genotypes integrated by the strain 22019 and five isolates, mostly associated with invasive candidiasis, were found in the group I. The group II showed six genotypes composed of six isolates, mostly associated with mucocutaneous candidiasis. The I_A and the indicators of genetic diversity obtained, revealed a recombinant reproduction system. The RAPD with the oligonucleotides M13, AP3, T3B and R108 is useful in the investigation of possible outbreaks caused by *C. parapsilosis* and in the determination of their genetic variability.

Recibido: 08-08-2016 Aceptado: 08-06-2017

INTRODUCCIÓN

Candida parapsilosis es un hongo levaduriforme, ubicuo, comensal del tejido epitelial y mucosas del humano, que no había sido considerado como un patógeno importante, hasta que se aisló de infecciones severas en pacientes inmunocomprometidos y drogadictos (1). *Candida parapsilosis sensu lato* representa un complejo de hongos compuesto por tres especies genéticamente relacionadas: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*. Actualmente, este complejo está

clasificado como un grupo de patógenos oportunistas que causa infecciones nosocomiales, siendo *C. parapsilosis* la segunda especie más aislada, después de *C. albicans*, en los casos de candidemia, endocarditis, peritonitis, artritis séptica y endoftalmitis (2, 3). Las infecciones por *C. parapsilosis*, generalmente están asociadas con dispositivos protésicos, catéteres intravasculares e hiperalimentación intravenosa, debido a su habilidad para adherirse a distintas superficies (1,4-6). Los pacientes más propensos a adquirir una infección por *C. parapsilosis* son los neonatos, particularmente los de bajo

peso, los pacientes con cáncer o trasplantados y los pacientes críticamente enfermos de las unidades de cuidados intensivos, quienes han recibido nutrición parenteral o terapia antifúngica previa y aquellos con estancias hospitalarias prolongadas (7-9).

La transmisión de las infecciones nosocomiales por *C. parapsilosis* puede ser a través de diferentes fuentes, ya que en el medio hospitalario se han identificado diversos depósitos de hongos, que incluyen el aire no filtrado, los sistemas de ventilación, el polvo generado durante la construcción de hospitales, el agua y los alimentos (10). *C. parapsilosis* también se ha aislado de dispositivos médicos, tales como prótesis, catéteres intravasculares, líneas de nutrición parenteral, así como de la piel y uñas de las manos de los trabajadores de la salud (11). Esta fuente ambiental de contaminación se ha asociado con casos esporádicos y brotes de infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunocomprometidos (12).

Para la prevención y control de estos brotes, el estudio de la distribución de los aislados de *C. parapsilosis* causantes de infección en un hospital puede revelar la presencia de genotipos endémicos y la ocurrencia de transmisión horizontal. Para estos fines, se emplean métodos de caracterización genética; los más utilizados son la electroforesis en gel de campo pulsado y de enzimas multilocus, el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), el análisis de microsatélites y secuencias multilocus y la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (8, 13-15). Estudios previos, mediante varios métodos, entre ellos el análisis de RAPD, han encontrado que los aislados de *C. parapsilosis sensu lato* se dividen en tres grupos, lo que puso en evidencia un complejo de especies (16). Posteriormente Tavanti y col. (17), reconocieron a los grupos II y III de *C. parapsilosis* como especies separadas, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente, con base en

la tipificación de secuencia multilocus, por lo que la técnica RAPD ha mostrado ser útil en la tipificación y en la evaluación de la variabilidad genética de hongos utilizando oligonucleótidos especie específicos, como los oligonucleótidos M13, AP3, T3B y R108, los cuales permiten discriminar entre cepas de una misma especie, con base en los perfiles polimórficos (13, 14, 18, 19). La tipificación molecular de los aislados de una misma especie también es útil para discriminar entre brotes y “pseudo-brotes” o casos esporádicos que coinciden en el tiempo y el espacio (8). En México, los estudios sobre la epidemiología molecular de *C. parapsilosis* son escasos (20, 21), por lo que, en este estudio se analizó la variabilidad genética de aislados del complejo *C. parapsilosis*, mediante RAPD, recuperados de dos servicios médicos de un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México, con el propósito de evaluar la propagación del patógeno en ese nosocomio e investigar si los pacientes fueron infectados por el mismo genotipo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados

En este estudio, se incluyó un total de 11 aislados del complejo *C. parapsilosis*, recuperados de 11 pacientes adultos hospitalizados en dos servicios (Medicina Interna y Cirugía General) de un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México (Tabla I), durante un periodo de tres meses. Además se incluyó la cepa de referencia *C. parapsilosis* ATCC® 22019™.

Las levaduras fueron identificadas con tarjetas YST, según la metodología del sistema automatizado VITEK 2 Compact® (BioMérieux, Bruz, FR).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los aislados del complejo *C. parapsilosis*, se inoculó una colonia en 3 mL de medio YPD (glucosa 2%, ex-

TABLA I
AISLADOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis*

Aislado	Fecha de aislamiento	Fuente	Servicio	Diagnóstico	Candidiasis
80	16/jun/16	Punta de catéter	MI	Meningitis	Invasiva
86	17/jun/16	Punta de catéter	MI	Pancreatitis	Invasiva
88	22/jun/16	Hemocultivo	MI	Neumonía	Invasiva
89			MI	Anemia megaloblástica	Invasiva
91	27/jun/16	Hemocultivo	MI	Neumonía	Invasiva
112	8/jul/16	Cultivo de abscesos	MI	Apendicitis	Mucocutánea
113	22/jul/16	Cultivo de abscesos	MI	Apendicitis	Mucocutánea
118	26/jul/16	Cultivo de abscesos	MI	Apendicitis	Mucocutánea
119	3/ago/16	Cultivo de abscesos	CG	Hernia inguinal	Mucocutánea
120	17/ago/16	Cultivo de abscesos	MI	Apendicitis	Mucocutánea
122	25/ago/16	Cultivo de abscesos	MI	Apendicitis	Mucocutánea

MI: Medicina Interna; CG: Cirugía General

tracto de levadura 1%, peptona 2%) y se incubó a 28 °C con agitación orbital a 100 rpm, durante toda la noche. Después se centrifugó el cultivo a 1.117 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500 µL de amortiguador fosfato salino (PBS), pH 7,4 y se centrifugó durante 3 minutos a 12.410 x g, para lavar el botón. El botón se lavó dos veces y posteriormente se extrajo el ADN con el estuche comercial Yeast DNA Preparation (Jena Bioscience, Jena, GE), de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. La concentración y pureza del ADN se determinó en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, EUA) a 260 nm y por la relación de absorbancia a 260/280 nm, respectivamente. El ADN se conservó a -20°C hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para distinguir entre los miembros del com-

plejo *C. parapsilosis*, se llevó a cabo una PCR, utilizando los oligonucleótidos MnSODF (5'-GC-TTTAGTGGACAAATCAATGAYCT-3') y MnSODR (5'-ÁGTTGATGTAACCACCAC-CRTTG-3'), que amplifican fragmentos de 171, 250 y 235 pb correspondientes a *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, respectivamente. La PCR se realizó de acuerdo con lo descrito por Feng y col.(22).

Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPD)

Para el análisis RAPD de los aislados del complejo *C. parapsilosis*, se utilizaron cuatro oligonucleótidos: M13 (5' GAGGGTGGCGG-TTCT 3') (14), AP3 (5'-TCACGATGCA-3'), T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3') (18) y R108 (5'-GTATTGCCCT-3') (19). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con 10 ng de ADN genómico de los aislados

de *Candida* en un volumen final de 25 μ L que contenía 50 pmol de oligonucleótido (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 200 μ M de cada desoxinucleótido (Jena Bioscience), 2mM MgCl₂ y 1U de *Taq* polimerasa en amortiguador 1X (pH 8,5) (Jena Bioscience). Como testigo negativo se agregó agua destilada ultrapura (Sistema de purificación MilliQ, Millipore Corporation, Billerica, EUA). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, EUA) con el programa: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos a: 94°C por 20 segundos, 40°C durante 1 minuto y 72°C durante 20 segundos, con una extensión final a 72°C por 6 minutos. Los ensayos de RAPD se realizaron por duplicado.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en amortiguador TBE 0,5X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA y pH 8,3) a 90 v durante 60 minutos y visualizados por tinción con GelRed 30X (Biotium, Fremont, EUA). Como marcador de tamaño molecular se utilizó el 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR, (Bio-Rad Laboratories Inc.).

Análisis de datos

A partir de los patrones polimórficos, se construyó una matriz de presencia y ausencia de bandas. Estos datos se procesaron para obtener una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard (23) y a partir de esta matriz, se construyó un dendrograma por el Método de Agrupamiento de Pares con la Media Aritmética no Ponderada (UPGMA) (24). Se calculó el coeficiente de correlación cofenética (cccr) para determinar la confiabilidad del dendrograma. Así mismo, se obtuvieron valores de *bootstrap*, después de 5000 seudoréplicas, para determinar la solidez de las agrupaciones. El análisis se realizó con el programa NTSYS-PC versión

2.0 (25). Para distinguir entre estructura clonal y recombinante, se utilizó el índice de asociación (IA) (26), que es una prueba estadística que mide el grado de asociación no aleatoria, entre alelos de diferentes loci (desequilibrio de ligamiento). Para este análisis se utilizó el programa LIAN v 3.5 (27).

La diversidad genética de los marcadores RAPD se calculó utilizando diferentes parámetros: índice de Shannon (S), asumiendo que cada marcador fenotípico representa un locus distinto (28), la diversidad genética de Nei (h) usando frecuencias alélicas (29). Además se calcularon la heterocigosidad esperada por población (H) y la heterocigosidad promedio (HW) mediante la utilización de las frecuencias alélicas, de acuerdo con el método Bayesiano de Zhivotovsky (30).

RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos por VITEK 2 Compact[®], los 11 aislados estudiados fueron ubicados dentro del complejo *C. parapsilosis*, mientras que por PCR, la amplificación de un fragmento de 171 pb identificó a todos los aislados como *C. parapsilosis sensu stricto* (Tabla II, Fig. 1).

Los perfiles obtenidos, para todos los aislados con los oligonucleótidos M13, AP3, T3B y R108, se encontraron en el rango de 150-700, 250-1300, 150-700 y 100-1300 pb, respectivamente (Fig. 2) y las bandas generadas fueron reproducibles cuando se realizaron los ensayos por duplicado. A partir de la matriz de similitud se generó un dendrograma que formó dos grupos (I y II). En el grupo I se encontraron tres genotipos representados por la cepa de referencia ATCC[®] 22019[™] y los aislados 80, 86, 88, 89 y 112, con 30% de similitud (Fig. 3). Todos los aislados clínicos incluidos en el grupo I fueron obtenidos a partir de cultivos de sangre o de puntas de catéter, a excepción del aislado 112

TABLA II
IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS CLÍNICOS ESTUDIADOS

Aislado	VITEK 2 Compact®		PCR
	Probabilidad (%)	Nivel de identificación	Amplicón (pb)
80	88	Aceptable	171
86	91	Bueno	171
88	89	Bueno	171
89	92	Bueno	171
91	88	Aceptable	171
112	89	Bueno	171
113	88	Aceptable	171
118	89	Bueno	171
119	88	Aceptable	171
120	89	Bueno	171
122	88	Aceptable	171

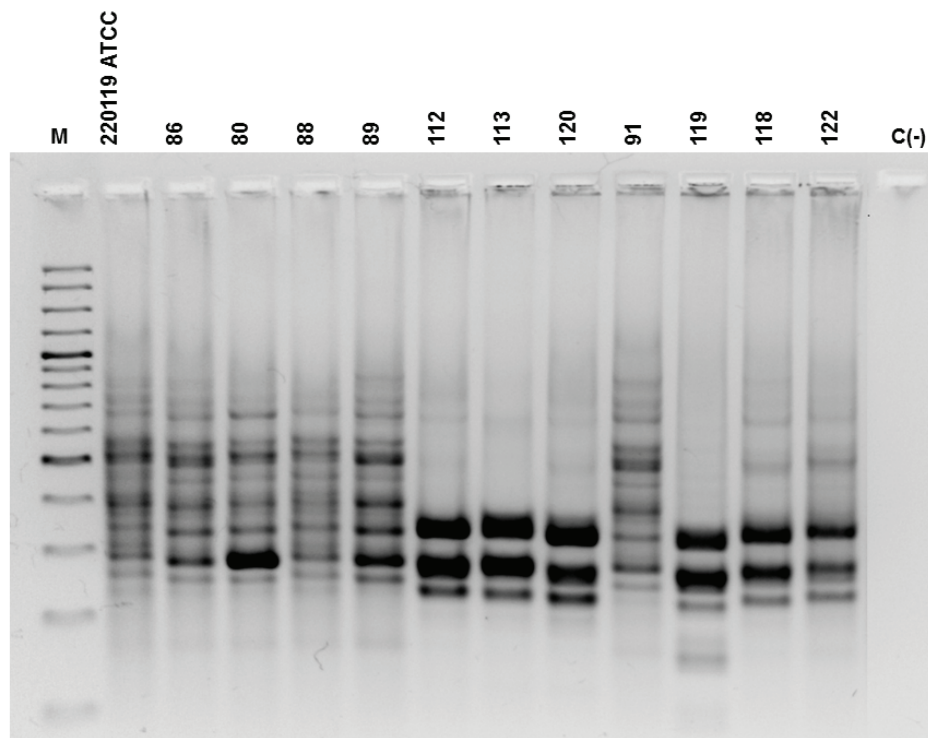


Fig.1. Identificación de 11 aislados clínicos del complejo *C. parapsilosis* por PCR, con los oligonucleótidos MnSO-DF y MnSODR. M: marcador de tamaño molecular de 100 bp. C(-): control negativo.

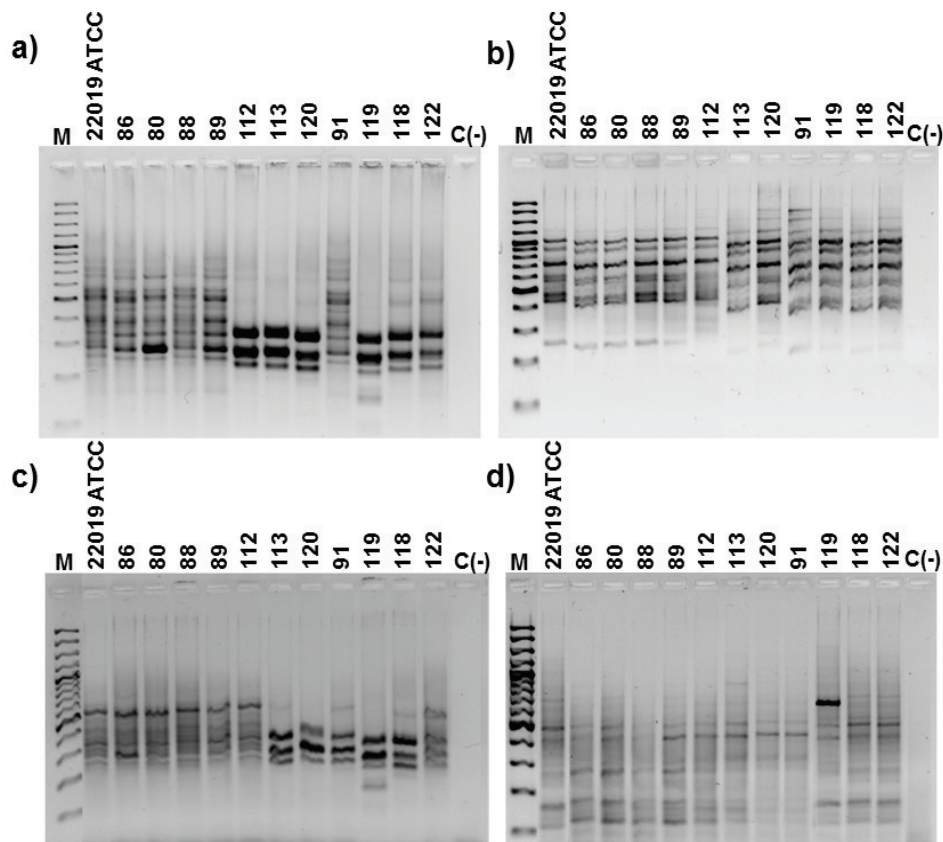


Fig.2. Patrones polimórficos de los aislados clínicos del complejo *C. parapsilosis* y la cepa de referencia ATCC® 22019™, generados por RAPD con los oligonucleótidos a) M13, b) AP3, c) T3B y d) R108. M: marcador de tamaño molecular de 100 bp. C(-): control negativo.

que fue obtenido de cultivo de abscesos (Tabla I). El grupo II mostró seis genotipos, representados por los aislados 91, 113, 118, 119, 120 y 122 con 37% de similitud entre ellos (Fig. 3). Estos aislados fueron obtenidos de cultivos de abscesos a excepción del aislado 91 que provenía de un hemocultivo. La agrupación de los aislados estudiados fue sustentada por valores de *bootstrap* (>87%) y el valor de *ccr* ($r=0,999$).

Por otro lado, el valor de IA para todos los aislados fue de 0,2801 ($p < 0,001$); este valor indicó un sistema de reproducción recombinante que es congruente con los resultados del dendrograma (Fig. 3) y con los indicadores de

diversidad genética: polimorfismo 66,67%, número efectivo de alelos $1,4675 \pm 0,3721$, heterocigosidad $0,2685 \pm 0,2046$ e índice de diversidad genética de Shannon $0,3922 \pm 0,2933$.

DISCUSIÓN

En México la epidemiología del complejo *C. parapsilosis* ha sido poco estudiada. En este trabajo, se evaluó la variabilidad entre los aislados del complejo *C. parapsilosis* obtenidos de pacientes en un hospital terciario durante un periodo de tres meses, con la finalidad de evidenciar si los pacientes fueron infectados por uno

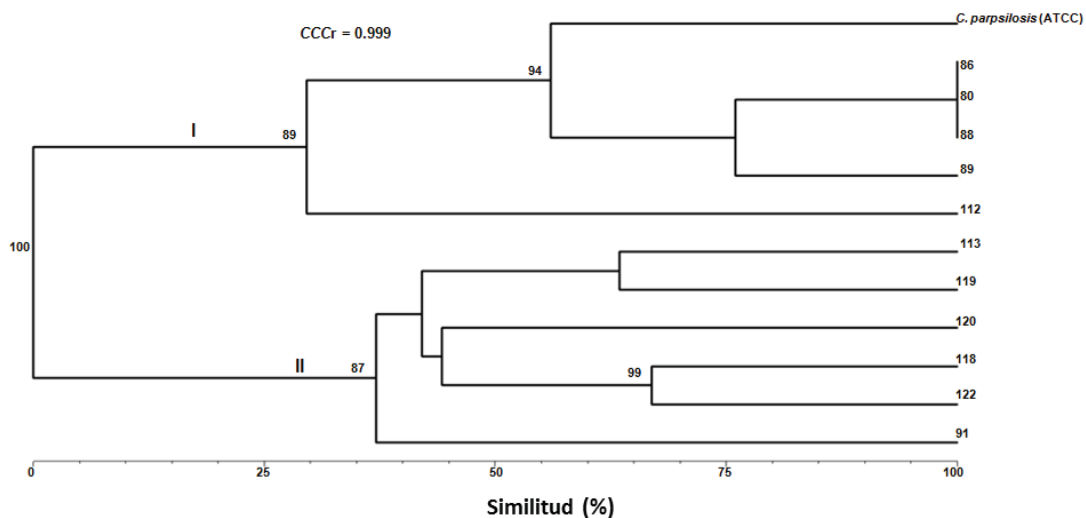


Fig.3. Dendrograma generado por UPGMA a partir de los patrones polimórficos RAPD con los oligonucleótidos M13, AP3, T3B y R108. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de *bootstrap*.

o varios genotipos prevalentes en los dos servicios hospitalarios incluidos en este estudio. Los resultados obtenidos por PCR para discriminar entre las especies del complejo *C. parapsilosis*, demostraron que *C. parapsilosis sensu stricto* fue la especie causante de las infecciones registradas durante el periodo de estudio. El análisis por RAPD indicó que un mismo genotipo fue causante de la infección entre pacientes, con un porcentaje de similitud entre los aislados de 100%, lo que destaca la necesidad de continuar recomendando las prácticas hospitalarias adecuadas en el manejo de los pacientes, principalmente el adecuado lavado de manos, para evitar la transmisión horizontal. En los ocho pacientes restantes, se encontraron genotipos distintos, es decir, que la infección en estos pacientes ocurrió de manera esporádica. Estos resultados evidenciaron gran variabilidad genotípica, que fue corroborada con los indicadores de diversidad genética obtenidos y puede ser explicada por la transmisión horizontal del patógeno.

Los cuatro marcadores utilizados (M13, AP3, T3B y R108) indicaron diversidad gené-

tica, evidenciada por la agrupación de los aislados en el dendrograma, lo que demostró que estos marcadores son una herramienta útil en la investigación de brotes con el fin de identificar uno o varios genotipos en el ambiente hospitalario, lo que coincide con lo reportado en otros trabajos en los que hallaron que entre aislados clínicos de *C. parapsilosis* prevalece la clonalidad, pero también puede encontrarse variabilidad cuando la fuente de infección es ambiental (31,32). La variabilidad genética entre aislados estrechamente relacionados, ha sido demostrada incluso por técnicas moleculares distintas al RAPD (33). También es importante mencionar que, con base en el dendrograma y los indicadores de diversidad genética, aunque todos los aislados estudiados fueron identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*, no todos mostraron similitud genética con la cepa de referencia. Esta variabilidad genética puede deberse a la presencia de mutaciones que pueden ocurrir con baja frecuencia en la naturaleza o a la recombinación intracromosómica, recientemente descrita en *C. parapsilosis* por Prysycz y col.

(32), a través de la identificación de repeticiones en tándem, como un mecanismo para generar variaciones en el número de copias entre los aislados, lo que implica la delección de genes y la creación de nuevos genes potencialmente fusionados y por la presencia de regiones genómicas de alta variación, como resultado probablemente de los eventos de recombinación entre diferentes aislados.

Es interesante destacar que en el grupo I se concentró la mayoría de los aislados obtenidos de pacientes con la forma clínica diseminada, mientras que el grupo II se integró por la mayoría de los aislados obtenidos de pacientes con la forma clínica mucocutánea (Tabla I). Esta tendencia a la agrupación entre los aislados de *C. parapsilosis* causantes de infección invasiva se ha relacionado con una mayor habilidad para formar biopelículas sobre dispositivos médicos, como los catéteres (34). Esta asociación entre el genotipo y la severidad de la enfermedad, también ha sido observada en otros hongos, como *Trichophyton tonsurans*, un hongo dermatofito que causa infecciones del cuero cabelludo con un espectro amplio, que abarca desde un estado de portador asintomático, un proceso no inflamatorio persistente hasta enfermedad aguda altamente inflamatoria; esta última se ha relacionado con cepas que tienen determinadas variaciones en la secuencia del espaciador intergénico del ADN_r de este hongo (35). Sin embargo, es difícil establecer concretamente la relación entre la variabilidad genética de los patógenos y las manifestaciones clínicas, ya que se requiere un gran número de aislados.

Finalmente, es necesario mencionar que este trabajo presenta limitaciones: la primera es el bajo número de aislados estudiados; la segunda limitación es que no se incluyeron aislados del entorno de los pacientes, por ejemplo, obtenidos de las manos del personal médico y de las superficies de dispositivos o equipos médicos, lo que impidió identificar la fuente de infección, por lo

que es necesario llevar a cabo un estudio más extenso para corroborar los hallazgos.

En conclusión, durante el periodo de estudio, se encontraron nueve genotipos distintos causantes de infección entre los pacientes de dos servicios médicos de un hospital terciario. La mayoría de los aislados del grupo I se asociaron a casos de infección invasiva y la mayoría de los aislados en el grupo II se asociaron a la forma clínica mucocutánea. El RAPD con los oligonucleótidos M13, AP3, T3B y R108 evidenció variabilidad genética entre los aislados estudiados y mostró ser una herramienta útil en la investigación de posibles brotes causados por *C. parapsilosis*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CONA-CyT-216112.

REFERENCIAS

1. **Weems J.** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 1992; 14:756-766.
2. **Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Rodrigues AG.** A first Portuguese epidemiological survey of *Candida parapsilosis* in a university hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27:365-374.
3. **Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD.** *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21:606-625.
4. **Bonassoli L, Bertoli M, Svidzinski T.** High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. J Hosp Infect 2005; 59:159-162.
5. **Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, BobbioPallavicine F, Viscoli C.** Epidemiological trends

- in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006; 6:21.doi.org/10.1186/1471-2334-6-21.
6. **Bertini A, de Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S, Tavanti A.** Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol* 2013; 303:98-103.
 7. **Del Palacio A, Alhambra A, Cuetara MS.** Factores de riesgo de la candidiasis invasora: estratificación. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23:29-31.
 8. **van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA.** *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35:283-309.
 9. **Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S.** Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2363-2369.
 10. **Sautour M, Dalle F, Olivieri C, L'ollivier C, Enderlin E, Salome E, Chovelon I, Vagner O, Sixt N, Fricker-Pap V, Aho S, Fontaneau O, Cachia C, Bonnin A.** A prospective survey of air and surface fungal contamination in a medical mycology laboratory at a tertiary care university hospital. *Am J Infect Control* 2009; 37:189-194.
 11. **Saúl-García Y, Hernández Valles R.** Aislamiento de *Candida* spp. en ambiente y personal que labora en una unidad de cuidados intensivos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2014; 34:27-32.
 12. **Rosanova M, Santos P, Pontón J, San Millán P, Paganini H.** Brote de *Candida parapsilosis* en una unidad de trasplante de médula ósea. *Medicina Infantil* 2005; XII:22-24.
 13. **De la Puente-Redondo VA, García del blanco N, Gutiérrez-Martín CB, García-Peña FJ, Rodríguez Ferri EF.** Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1016-1022.
 14. **Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC.** PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med Mycol* 2001; 39:185-193.
 15. **Reiss E, Lasker BA, Lott TJ, Bendel CM, Kaufman DA, Hazen KC, Wade KC, McGowan KL, Lockhart SR.** Genotyping of *Candida parapsilosis* from three neonatal intensive care units (NICUs) using a panel of five multilocus microsatellite markers: broad genetic diversity and a cluster of related strains in one NICU. *Infect Genet Evol* 2012; 12:1654-1660.
 16. **Lehmann PF, Lin DM, Lasker BA.** Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3249-3254.
 17. **Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC.** *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43:284-292.
 18. **Thanos M, Scönian G, Meyer W, Schweynoch C, Gräser Y, Mitchell TG, Presber W, Tietz HJ.** Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34:615-621.
 19. **Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW.** Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1036-1039.
 20. **Hernández-Castro R, Arroyo-Escalante**

- S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Álvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, Torres-Narváez P, Lavallo-Villalobos A. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatr* 2010; 169:783-787.
21. González GM, Treviño-Rangel RJ, Palma-Nicolás JP, Martínez C, González JG, Ayala J, Caballero A, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Velarde F, Ascencio EP, Tinoco JC, Vázquez JA, Cano MA, León-Sicairos N, González R, Rincón J, Elías MA, Bonifaz A. Species distribution and antifungal susceptibility of blood stream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:2847-2851.
 22. Feng X, Wu Z, Ling B, Pan S, Liao W, Pan W, Yao Z. Identification and differentiation of *Candida parapsilosis* complex species by use of exon-primed intron-crossing PCR. *J Clin Microbiol* 2014; 52:1758-1761.
 23. Real R, Vargas JM. The Probabilistic Basis of Jaccard's Index of Similarity. *Systematic Biology* 1996; 45:380-385.
 24. Sneath PHA, Sokal RR. Taxonomic structure. In: *Numerical Taxonomy*, W. H. Freeman and Co., San Francisco. 1973, p 188-305.
 25. Rholf FJ. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software Inc., Nueva York. 1998.
 26. Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4384-4388.
 27. Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 2000; 16:847-848.
 28. Allnut TR, Newton AC, Lara A, Premoli A, Armesto JJ, Vergara R, Gardner M. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Mol Ecol* 1999; 8:975-987.
 29. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci USA* 1973;70:3321-3323.
 30. Zhivotovsky LA. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol Ecol* 1999;8:907-913.
 31. Delfino D, Scordino F, Pernice IC, Lo Passo C, Galbo R, David A, Barberi I, Criseo G, Cascio A, Romeo O. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:946-951.
 32. Prysycz LP, Németh T, Gácsér A, Gabaldón T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol* 2013; 5:2382-2392.
 33. Lasker BA, Butler G, Lott TJ. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *J Clin Microbiol* 2006; 44:750-759.
 34. Branchini ML, Pfaller A, Rhine-Chalberg IJ, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:452-456.
 35. Abdel-Rahman SM, Talib N, Solidar A, Nopper AJ, Wyckoff GJ. Examining *Trichophyton tonsurans* genotype and biochemical phenotype as determinants of disease severity in tinea capitis. *Med Mycol* 2008; 46:217-223.