

TESIS DEFENDIDA POR
ALMA AURORA ARREOLA CRUZ
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez

Miembro del Comité

Dr. Stephen Holmes Bullock Runquist

Miembro del Comité

Dra. Liria Yamamoto Kimura

Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

*Coordinador del programa en
posgrado en Ciencias con
Orientación en Biotecnología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

10 de Agosto de 2009

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Candida* spp. EN PACIENTES
GINECO-OBSTÉTRICAS.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ALMA AURORA ARREOLA CRUZ

Ensenada, Baja California, México, Agosto de 2009.

RESUMEN de la tesis de **Alma Aurora Arreola Cruz**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en MICROBIOLOGÍA. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 2009.

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Candida* spp. EN PACIENTES
GINECO-OBSTÉTRICAS**

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Directora de Tesis

Las especies de *Candida* como agentes etiológicos de las Candidiasis, han emergido como unos de los patógenos oportunistas por excelencia, relacionados con la especie humana. *Candida* spp. es un microorganismo comensal oportunista presente en mucosa vaginal de un gran número de mujeres. *Candida albicans* es la especie encontrada con más frecuencia. Sin embargo *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. Krusei*, y *C. parapsilosis* también han sido aisladas de pacientes, con una amplia distribución geográfica. El aumento significativo de la frecuencia de Candidiasis clínica ha alentado al desarrollo de técnicas moleculares que sustituyan a los métodos tradicionales de diagnóstico. Nuestro objetivo fue estudiar la diversidad y la distribución de especies de *Candida* en muestras clínicas de pacientes gineco-obstétricas con y sin síntoma de vulvovaginitis. Se llevaron a cabo muestreos de exudado vaginal en 140 pacientes del Hospital General de Ensenada. Los aislamientos clínicos primarios se realizaron en medio Sabouraud-Agar, fueron reinoculadas en el laboratorio en medio YPD y las colonias recuperadas fueron analizadas por el método de PCR, empleando los

oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Las diferentes especies se identificaron por la técnica molecular de PCR-RFLP, usando la enzima de restricción *MspI*. El 42.1 % de las pacientes incluidas en este estudio fueron positivas para *Candida* por PCR, se compararon los perfiles de PCR-RFLP de cada aislamiento vaginal, y en el 90 % de las muestras positivas, se llegó a la identificación a nivel de especie: *Candida albicans* fue la especie predominante (67.7%), seguida de *C. glabrata* (16.9%), *C. tropicalis* (5.1%) y el 10.2% representa al resto de las especies de *Candida*. En el 15% de las muestras vaginales se pudieron identificar dos especies diferentes de *Candida* en una misma paciente. Finalmente se hizo una correlación entre los datos clínicos, el aislamiento e identificación de *Candida* spp., y la citología vaginal, utilizando microscopía de contraste de fases.

Palabras Clave: *Candida* spp., Candidiasis, Vulvovaginitis, PCR-RFLP.

ABSTRACT of the thesis presented by **Alma Aurora Arreola Cruz** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in Microbiology. Ensenada, Baja California, México. August, 2009.

In the last years, *Candida spp.* have emerged as major opportunistic pathogens, mainly due to the increased number of immunocompromised patients. *Candida albicans* is the species most frequently found; nevertheless *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* have increasingly been isolated with a wide geographic distribution. *Candida spp.* infect women of all ages; the significant increase in the frequency of candidiasis has encouraged the development of molecular based techniques to replace traditional diagnostic methods. Our goal was to study the diversity and distribution of *Candida* species among gynecologic patients from the Ensenada General Hospital. 140 women from the Ensenada General Hospital were included. Vaginal swabs were first inoculated in YPD and the recovered colonies were analyzed using a PCR-based method with primers ITS1 and ITS4 and subsequently by RFLP using Msp1 as a restriction enzyme. 42.1% of the women included in this study were positive for *Candida* by PCR. By comparing the PCR-RFLP profiles of the vaginal isolates, 90% of the positive samples were identified to the species level, only one sample was not *Candida*. *Candida albicans* was the predominant species (67.7%), followed by *C. glabrata* (16.9%), *C. tropicalis* (5.1%) and 10.2% were unidentified *Candida spp.* In 15 % of the vaginal samples we could detect two different species of *Candida*. We could not tell whether the above percentages pertain to the original 42.1% or to some other population. This work represents the first study of the molecular epidemiology of vaginal candidiasis in México. We found, as reported for other countries, that *C. albicans* was present in more than the half of the positive samples.

Keywords: *Candida spp.*, Candidiasis, vaginitis, PCR-RFLP.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al CICESE y a CONACYT por la oportunidad y el apoyo para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

A la Dra. Rosa R. Mouriño Pérez por su apoyo incondicional, así como a todos los miembros de mi Comité de Tesis, la Dra. Rufina Hernández Martínez, la Dra. Liria Yamamoto Kimura y el Dr. Stephen Bullock. También a mi asesor clínico el Dr. José Juan Godínez Montaña.

A todos mis compañeros de generación, y a mis compañeros de laboratorio y a todas las ardillas.

Dedico ésta tesis a las 3 mujeres más importantes en mi vida.

A mi hija Julie,

Que es mi motivo principal para vivir y para seguir adelante. No concibo la vida sin ti mi niña.

A mi madre,

Por su amor incondicional, su cuidado y por ser un gran ejemplo de lucha y dedicación. Gracias por todo mami.

A mi abuela,

por darnos tanto amor, enseñanzas, sabiduría y consejos.

Y a mi padre que hoy falleció.

Te voy a extrañar mucho...

CONTENIDO

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
II.1 Historia.....	2
II.2 Candidiasis.....	5
II.2.1 Enfermedad.....	5
II.2.2 Etiología.....	8
II.2.3 Patogenia.....	8
II.2.4 Factores predisponentes.....	8
II.2.5 Epidemiología.....	11
II.3 Candida “el organismo”.....	13
II.3.1 Género Candida.....	13
II.3.2 Características Moleculares.....	15
III. OBJETIVOS.....	17
III.1 Objetivo General.....	17
III.2 Objetivos Específicos.....	17
IV. MATERIALES Y METODOS.....	18
IV.1 Diseño metodológico.....	18
IV.2 Características de la muestra.....	18
IV.3 Cuestionario.....	19
IV.4 Exploración física.....	20
IV.4.1 Aislamiento primario de muestras clínicas.....	20
IV.5 Identificación Fenotípica y Genotípica de Aislamientos Clínicos.....	21
IV.5.1 Estudio Micológico.....	21
IV.6 Cepas y condiciones de cultivo.....	21
IV.6.1 Medio de Cultivo Agar Dextrosa-Sabouraud.....	21
IV.6.2 Medio de Cultivo YPD.....	21
IV.7 Diagnóstico molecular de Candida spp.....	22
IV.7.1 Técnica Molecular de PCR –RFLP.....	22
IV.7.2 Mezcla de reacción para PCR, en muestras positivas.....	22
IV.7.3 Mezcla de reacción para PCR, en muestra negativas a Candida spp.....	23
IV.8 Identificación de Cepas de Candida spp.....	23
IV.8.1 Extracción de DNA para las cepas positivas.....	23

CONTENIDO (continuación)

	<i>Página</i>
<i>IV.8.2 Extracción de DNA para los cultivos negativos.....</i>	24
<i>IV.8.3 Cuantificación de DNA genómico por espectrofotometría...</i>	24
<i>IV.8.4 Diluciones a 20 µg/ ml.....</i>	25
IV.9 Oligonucleótidos.....	25
<i>IV.9.1 ITS 1 e ITS 4, para identificación de muestras de Candida spp.....</i>	25
<i>IV.9.2 Oligonucleótidos para identificación de bacterias.....</i>	26
IV.10 Técnica de PCR.....	26
<i>IV.10.1 Condiciones para la PCR en muestras positivas.....</i>	26
<i>IV.10.2 Condiciones para la realización de PCR en muestras negativas a Candida spp.....</i>	27
<i>IV.11 Purificación de bandas de DNA de productos de PCR.....</i>	27
<i>IV.12 Marcador Molecular de RFLPs.....</i>	28
<i>IV.13 Controles.....</i>	29
IV.14 Citología vaginal.....	29
<i>IV.14.1 Tinción de las muestras.....</i>	29
<i>IV.14.2 Microscopía.....</i>	30
<i>IV.15 Análisis de secuencias.....</i>	30
<i>IV.16 Análisis de datos.....</i>	30
V. RESULTADOS.....	31
<i>V.1 Aspectos generales.....</i>	31
<i>V.2 Portadoras de Candida spp.....</i>	31
<i>V.3 Especies de Candida.....</i>	33
<i>V.4 Candida spp. y Edad.....</i>	38
<i>V.5 Uso de métodos anticonceptivos y presencia de Candida spp.....</i>	40
<i>V.6 Diabetes mellitus y Candida spp.....</i>	43
<i>V.7 pH y Candida spp.....</i>	44
<i>V.8 Presentación de síntomas y portadoras de Candida.....</i>	44
<i>V.9 Presentación de signos y portadoras de Candida.....</i>	45
<i>V.10 Morfología de las diferentes especies.....</i>	46
VI. DISCUSIONES.....	48
VII. CONCLUSIONES.....	52
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	53

CONTENIDO (continuación)

	<i>Página</i>
IX. ANEXOS.....	62
IX.1 Anexo A.....	62
<i>Hoja de Consentimiento Informado.....</i>	62
IX.2 Anexo B.....	63
<i>Formato del Cuestionario.....</i>	63
IX.3 Anexo C.....	65
<i>IX.3.1 Medios de cultivo.....</i>	65
<i>IX.3.2 Medio utilizado en el aislamiento primario y conservación de diversos hongos patógenos. Sabouraud-agar.....</i>	65
<i>IX.3.3 Medio selectivo para levaduras (YPD).....</i>	65
<i>IX.3.4 Medio para inducir la filamentación de Candida spp. Agar- agua+ BSA.....</i>	65
<i>IX.3.5 Medio de cultivo líquido nutritivo utilizado para el crecimiento de diversas bacterias. LB (Luria-Bertani).....</i>	66
X. GLOSARIO.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Posición de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR en la región 18s-ITS1-5.8s- ITS2-28s de <i>Candida albicans</i> IFM 49030. ITS1 (rojo), ITS4 (verde), región 5.8s (azul).....	25
2	Diagrama de localización de oligonucleótidos propuestos en el genoma fúngico. Las distancias están representadas en pares de bases. SSU: Unidad pequeña ribosomal (18S), LSU: Unidad mayor ribosomal (36S); ITS: Región espaciadora intergénica. Modificado de Martin y Rygiewicz, 2005.....	26
3	Distribución geográfica de las pacientes ginecológicas por lugar de origen.....	32
4	Aislamientos por cultivo primario y por confirmación por PCR de muestras de exudado vaginal de pacientes ginecológicas en Ensenada, B.C.....	33
5	Electroforesis de los RFLPs realizados de la digestión con <i>MspI</i> de la región amplificada por PCR (ITS1-4) de cada uno de los aislamientos de <i>Candida</i> en pacientes ginecológicas en Ensenada, B.C.. El número superior a cada columna corresponde a la identificación de la paciente, se utilizó marcador de peso molecular de 1,000 pb.....	34
6	Amplificación de dos bandas que corresponden a especies diferentes de las muestras de exudado vaginal de pacientes gineco-obstétricas.....	35
7	Árbol filogenético realizado en base al patrón de bandas del RFLP.....	37
8	Árbol filogenético de las cepas aisladas considerando el resultado de los RFLPs y las secuencias de los fragmentos ITS1-4. Se identifica en cada caso el lugar de origen de la paciente.....	38
9	Porcentaje de mujeres portadoras de <i>Candida spp.</i> por grupo de edad, en el grupo de pacientes ginecológicas en Ensenada, B. C.....	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

10	Porcentaje de mujeres portadoras de <i>Candida</i> spp. de acuerdo al uso de métodos anticonceptivos en pacientes gineco-obstetricas en Ensenada, B.C.....	42
11	Distribución de las portadoras de <i>Candida</i> spp. de acuerdo al grado de inflamación del cervix, vagina y vulva.....	46
12	Imágenes de <i>Candida</i> (a) Control positivo de <i>C. albicans</i> (ATCC 9028), (b) Blastoconidias de <i>C. glabrata</i> , (c) Blastoconidias de <i>C. albicans</i> (d) Hifas y pseudohifas de <i>C. albicans</i> . Las flechas blancas señalan blastoconidias y las flechas negras conidias germinadas. Las células fueron teñidas con la técnica de Grocott-Gromori.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Taxonomía de <i>Candida</i>	14
II	Reactivos utilizados para la digestión.....	28
III	Distribución por especie de los aislamientos en pacientes ginecológicas en Ensenada B. C.....	32
IV	Distribución de las diferentes especies de <i>Candida</i> en pacientes gineco-obstétricas en Ensenada B. C., incluyendo los dobles aislamientos.....	36
V	Distribución por edad de las portadoras de <i>Candida spp.</i> en Ensenada, B.C.....	39
VI	Distribución por edad y por especie de <i>Candida</i> aislada en portadoras en Ensenada , B. C.....	40
VII	Distribución de portadoras de <i>Candida spp.</i> de acuerdo al uso de métodos anticonceptivos en pacientes gineco-obstetricas en Ensenada, B.C.....	41
VIII	Distribución de pacientes portadoras y no portadoras de <i>Candida spp.</i> en pacientes con menopausia y embarazadas.....	43
IX	Distribución de pacientes portadoras y no portadoras de <i>Candida spp.</i> en pacientes con diabetes mellitus.....	43
X	Relación entre portadoras de <i>Candida spp.</i> y pH vaginal.....	44
XI	Aparición de síntomas en pacientes portadoras de <i>Candida spp.</i>	45
XII	Morfología de las cepas aisladas de <i>Candida spp.</i>	47

Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de Suero Bovino)
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide (Cetil Bromuro de Trimetilamonio)
DIU	Dispositivo Intrauterino
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido tetracético de etilendiamino)
ITS	Internal Transcribed Spacer (Región Espaciadora Interna Transcrita)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
RNAasa	Ribonucleasa pancreática
RNAr	RNA ribosomal
TAE	Tris-acetato EDTA

°C	grados centígrados
M	Molar
Mb	Mega bases
min	minutos
mm	milímetros
mg	miligramos
ml	mililitros
mM	microMolar
ng	nanogramos
rpm	revoluciones por minuto
μl	microlitros
λ	Bacteriófago lamda

I. Introducción

En general las enfermedades infecciosas han disminuido en casi todo el mundo, sin embargo las infecciones micóticas han aumentado de manera constante. En Estados Unidos las micosis ocupan el séptimo lugar como causa de muerte; de 1980 a la fecha el número de muertes por esta causa se ha triplicado, siendo las principales causas la candidiasis y la aspergilosis. Este incremento se ha relacionado con diversos factores entre los que sobresale el aumento de población con Diabetes mellitus, pacientes con cáncer, con terapia esteroidea, con transplantes o con VIH-SIDA.

De las infecciones por cándida, la candidiasis vaginal es una de las infecciones más comunes del tracto genital femenino. Se ha estimado que del 40 al 75% de las mujeres con vida sexual activa experimentan candidiasis vaginal sintomática. A pesar de que *Candida albicans* es el agente más común causante de candidiasis vaginal, en los últimos años se ha incrementado la proporción de infecciones atribuidas a otros miembros del genero, especialmente *Candida glabrata*, que en la última década ha sido considerada un patógeno emergente tras aislares con mayor frecuencia de pacientes con vaginitis o con infecciones de otra localización, además de ser la especie menos sensible a los antifúngicos azólicos. Aunque hay otros factores que determinan las fallas en los tratamientos

con antifúngicos, la resistencia primaria o secundaria de los microorganismos es de las más importantes.

El propósito de este estudio fue determinar las diferentes especies de *Candida* aislada de pacientes ginecológicas sintomáticas y asintomáticas y caracterizar los patrones moleculares de cada una de las especies aisladas con técnicas de biología molecular avanzadas como el RFLP.

II. Antecedentes

II.1 Historia

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza. Se estima que hay 1,500, 000 especies fúngicas (Hawksworth, 1991; 2001), pero solo cerca de 80, 000 han sido descritos (Scannell *et al.*, 2007). De todas las especies encontradas, solo se conocen alrededor de 30 con capacidad de infectar tejidos humanos y por lo tanto son considerados como patógenos obligados y en otros casos, como oportunistas de gran impacto e importancia para la salud pública.

Las primeras micosis en humanos fueron descritas desde hace más de 3,000 años en el *Atharva Veda* (Méndez-Tovar y López-Martínez, 2009). Diferentes especies de levaduras son oportunistas y pueden ocasionar micosis. Un ejemplo de estas levaduras es el género *Candida*, cuyo daño es causado como acción directa del microorganismo en respuesta a cambios fisiológicos en el hospedero (Casadevall y Pirofski, 1999; Soll, 2007).

La Candidiasis fue descrita por primera vez por Hipócrates entre 500-400 a. c., aparece en su obra "*Sobre las epidemias*". En 1665, Pepys identificó y describió lesiones con las características clínicas de esta patología en mucosa oral. En 1835, Véron en "*Memoire sur le muguet*", postuló la transmisión madre-

hijo. En años posteriores, Wilkinson (1849), describió un hongo dimórfico obtenido de la vagina que correspondía a *Candida*.

La detección microscópica de células de levadura ocurrió en el año de 1839 con los estudios de Langenbeck, posteriormente confirmados por Berg y Gruby (Ainsworth, 1986). En 1842, Gruby describió y presentó evidencias ante la “*Academie de Science*”, de París con el tema: “*Le vrai muguet des enfants*”; asimismo postuló la transmisión intrauterina provocada por este agente biológico, tal como lo había descrito Véron. Berg realizó en 1846 el primer estudio científico donde se aisló *Candida* por primera vez. Hausmann en 1875, notó la relación del proceso infeccioso de la candidiasis vaginal de la madre con la aparición de candidiasis oral en el recién nacido.

Un hallazgo interesante fue hecho por Grawitz en 1877, en que describió el proceso dimórfico de la *Candida*, sin embargo no se tenía de la identidad del causante de la enfermedad. Posteriormente se desarrollaron y probaron varios medios de cultivo para el aislamiento del género *Candida* (Mc Clary 1952). Berkhout y otros investigadores en 1923, observaron que los organismos que provocan lesiones aftosas no eran claramente una especie de *Monilia*, en consecuencia, por lo que se propuso que el nombre del agente etiológico de ésta patología, se denominara *Candida*.

Candida se deriva de la frase en Latín *toga Candida* y fue usado para describir a un traje blanco especial llevado por *Candidatos* del senado romano (Calderone, 2002). Algunos autores refieren que muy probablemente, el nombre se le confirió, por las observaciones de las características de colonias blancas que se presentan en los medios de cultivo. El término *Candida* fue adoptado oficialmente en 1939 en el 3er. Congreso Internacional de Microbiología (Arenas, 2008) y durante el 8vo. Congreso de Botánica en 1954 fue oficialmente adoptada la nomenclatura binomial de *C. albicans*. Esto contribuyó, que cinco especies médicamente importantes de *Candida* fueran descritas hacia 1963 (Hazen, 1995).

Entre las décadas de los cincuentas y noventas, los estudios sobre esta levadura fueron expandidos, especialmente en las áreas de taxonomía, y bioquímica, permitiendo sentar las bases en la investigación de la micología que posteriormente contribuyeron a mejorar los diagnósticos médicos. Los esfuerzos iniciales para el diagnóstico y tipificación de cepas de *Candida* llevaron al desarrollo de diferentes técnicas. Una de estas técnicas fue el empleo de medios de cultivo específicos para *Candida* en combinación con otras técnicas como la microscopía y la detección por pruebas serológicas. El diagnóstico serológico y la determinación antigénica de *Candida* spp. dió como resultado la definición de dos serotipos: A para *C. albicans* (que incluían a *C. tropicalis*) y el B incluía al resto de las especies. Surgieron después otros estudios clínicos y modelos experimentales en animales de laboratorio, que permitieron realizar descripciones sobre los mecanismos de respuesta inmunológica en contra de *C. albicans*, tanto en mucosa oral como vaginal, descubriendo mecanismos diferentes de acción (Sobel, 1988).

II.2 Candidiasis

II.2.1 Enfermedad

Candidiasis es el término aplicado al conjunto de enfermedades producidas por hongos del género *Candida*. Diferentes especies de *Candida* spp. producen una amplia variedad de enfermedades. Constituyen un espectro de infección fúngica primaria o secundaria que originan manifestaciones agudas, subagudas o crónicas (Carrillo-Muñoz y Tur-Tur, 2000). Estas infecciones pueden manifestarse como micosis mucocutáneas leves a formas diseminadas graves con posible participación de cualquier órgano o sistema.

Una de las características de las candidiasis que se presenta en la capa epitelial y en el tejido conjuntivo subyacente (Ross, 2007) es extremadamente común en pacientes inmunosuprimidos. Pero a diferencia de la micosis orofaríngea o esofágica provocadas por *Candida*, la candidiasis vaginal es común

en mujeres sanas (Fidel *et al.*, 1999). En el hospedero normal, este microorganismo puede presentarse como un exitoso comensal (Cutler, 1991).

La candidiasis vulvovaginal (CVV) se define como la colonización e infección de la mucosa vaginal por levaduras del género *Candida*. La vulvovaginitis es considerada como los diferentes grados de inflamación de la vulva, la vagina y el tejido endocervical ectópico, provocada por dos causas principales: el 90% de las vaginitis son provocadas por agentes infecciosos y por otra parte son provocadas por causas no infecciosas como en los casos de atrofia vaginal, alergias e irritación química (Egan y Lipsky, 2000). Los hallazgos vaginales y vulvares son variables y van de una normalidad completa de la zona a la afectación vaginal, cervical y vulvar difusa.

En vulvovaginitis provocada por *Candida* predomina un enantema doloroso con exudado blanco o beige por debajo del cual puede haber petequias o erosiones hemorrágicas que suelen ulcerarse. En algunas ocasiones se pueden presentar con escamas lamerales y costras mieliséricas. Clínicamente la CVV se manifiesta con prurito hasta en un 50% de los casos (Eckert *et al.*, 1998) y leucorrea que suele ser blanquecina, grumosa, adherida a las paredes vaginales. La paciente puede presentar además, ardor, dolor pélvico y dispaurenia (López Martínez *et al.*, 2004). Para el desarrollo de la CVV, resultan necesarias la adhesión, colonización e invasión del hongo desde la piel o mucosas.

Estas alteraciones son ocasionadas por infecciones vaginales que tiene como condicionantes, la actividad sexual, el ciclo menstrual, la administración de estrógenos, durante la menopausia las duchas vaginales por lo que estos factores están relacionadas con alteraciones en el pH (Murta *et al.*, 2008). El establecer la especie de *Candida* como la causa de vaginitis, puede ser difícil porque no menos del 50% de mujeres son asintomáticas que tiene al organismo *Candida* como parte de su flora endógena vaginal. *Candida* no es considerada como una enfermedad

de transmisión sexual y los episodios de CVV no aparecen ser relacionados con el número de compañeros sexuales.

Por otro lado, *Candida* es potencialmente un agente patógeno en la infección intraamniótica; el riesgo de infección ascendente reportado es de un 0,8% a 2% (Cotch *et al.*, 1998). También ha sido demostrada la asociación entre la infección intrauterina y el parto prematuro y/o rotura prematura de membranas de pretérmino. La candidiasis congénita es una condición extremadamente infrecuente producto de la infección por *Candida* adquirida *in útero*. Esta infección ocurre en el contexto de una CVV, la cual se presenta en un 20% a 25% de las mujeres embarazadas (Bustos, 2003).

Algunos estudios han mostrado que el riesgo de infecciones vaginales producidas por *Candida* aumenta en las mujeres que usan anticonceptivos orales, diafragma y espermicida, o dispositivo intrauterino (Barbone *et al.*, 1990; Kent, 1991; Llovera *et al.*, 2001). Otros factores de riesgo incluyen la edad temprana del inicio de vida sexual. El riesgo de CVV también aumenta en algunas mujeres que tienen diabetes mellitus, embarazo o tratamiento con antibióticos y depresión (Foxman, 1990).

A nivel vaginal existen sistemas de defensa que pueden ser desencadenadas por un reservorio interno, por transmisión sexual y/o colpocele. Asimismo, las características inmunológicas locales (sistema humoral y fagocítico) y la coexistencia de otros organismos en la cavidad vaginal pueden favorecer la aparición de infecciones recurrentes y crónicas (Sobel, 1999).

La CVV recurrente es definida como cuatro o más episodios en un período de un año. Aunque todavía no es claro si las repeticiones son secundarias a la predisposición y/o la precipitación de factores como, la transmisión sexual, el depósito intestinal o la persistencia vaginal (Sobel, 1992).

II.2.2 Etiología

Aunque se han reportado unas 200 especies de *Candida*, sólo 17 se han descrito asociadas a enfermedad (Rinaldi, 1993; Elie *et al.*, 1998). La especie más frecuente de estas 17 especies, *C. albicans*, está entre el 60-80% del total causante de enfermedad. Y *C. albicans* es el hongo aislado en el 80-95% de los casos pero cada vez se describen con más frecuencia otras especies de *Candida no-albicans*, que incluyen *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* o *C. tropicalis*. Otras especies menos comunes son *C. guilliermondii* o *C. lusitaniae*. (Ramos y Ruiz, 2000). *C. albicans* y *C. glabrata* son dos de las levaduras patógenas más comunes. (Soll, 2007).

II.2.3 Patogenia

Algunas especies de éste género son parte de la flora normal de la piel, principalmente en mucosa genital como vagina y el aparato gastrointestinal. La primera exposición a *Candida* spp. suele producirse durante el paso del feto por el canal del parto, incrementándose durante las primeras 4 semanas de vida, período después del cual el 80% de los niños están colonizados (Ramos y Ruiz, 2000). Por lo tanto el riesgo de infección endógena siempre está presente.

Se desconoce la historia natural de la Candidiasis Vulvovaginal, pero se cree que la colonización puede durar meses e incluso años y que la infección se desencadena ante la presencia de factores que favorecen los mecanismos de virulencia de *Candida*, como resultado de una disminución de los mecanismos de defensa del hospedero (García *et al.*, 1994). Dos son los mecanismos implicados en la patogenia de la Vulvovaginitis candidósica: Los factores de virulencia de la levadura y los factores de defensa del hospedero.

Los mecanismos de adherencia de *Candida* a las células epiteliales de la mucosa constituye la primera etapa de la colonización y de la infección. *C. albicans* presenta mayor capacidad de adherencia a células del epitelio vaginal

que *C. tropicalis*, *C. krusei* o *C. kefyr*, lo que podría explicar la menor frecuencia de estos aislamientos. Se ha observado mayor adherencia de *C. albicans* en aquellas circunstancias en las que estaba incrementado el número de células de la capa intermedia del epitelio vaginal, como en el embarazo, en la última semana del ciclo menstrual y en mujeres diabéticas (Calderone y Braun, 1991).

La formación del tubo micelial constituye una fase intermedia entre la forma de blastoconidia y la forma filamentosa; la penetración parece ser intracelular. Aquellos factores que incrementan la capacidad de filamentación tienden a precipitar la infección sintomática (Vartivarian, 1992). El papel protector de la integridad mucocutánea y de la flora vaginal, son los mecanismos de defensa de la flora endógena que impiden la adherencia de las levaduras al epitelio vaginal, la competencia nutricional y la producción de toxinas bacterianas que inhiben el desarrollo y la filamentación de *Candida*. A pesar de que los leucocitos polimorfonucleares tienen un importante papel en la defensa de la enfermedad sistémica por *Candida*, estas células se encuentran característicamente ausentes en secreciones vaginales de pacientes con CVV (Levitz, 1992)

II.2.4 Factores predisponentes

Las especies de *Candida* son organismos cosmopolitas (Odds, 1988) y han sido reportadas como uno de los 3 hongos patógenos emergentes importantes que afectan la salud del individuo. Una incremento de infecciones fúngicas relacionadas con estas especies, ha sido notada en pacientes en la cual, la experiencia clínica muestra que la incidencia de estas infecciones son de origen multifactorial (Sobel, 1988).

A partir de los años cuarenta, en la era post-antibiótica se determinó a *Candida* spp., como un organismo comensal que ocasionalmente infectaba pacientes. El interés por la candidiasis fue desplazado por el auge adquirido de las enfermedades bacterianas (Arenas, 2008). Paradójicamente, el aparente control de tales enfermedades con el uso de antibióticos, el mejor control sanitario y el

aumento de sobrevivencia de las personas (Villanueva-Reyes y Arenas, 2007), ha traído consigo que las candidiasis sean consideradas como enfermedades oportunistas. Sin embargo, en las dos últimas décadas se ha incrementado la incidencia de *Candida* spp. a tal punto que se le considera entre las enfermedades re-emergentes (Hazen, 1995).

Las infecciones invasivas por *Candida* son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con trastornos de la inmunidad y han aumentado substancialmente. Por otro lado *Candida* tiene la capacidad de formar biopelículas y se ha observado que en pacientes sometidos a métodos invasivos éste organismo puede llegar al torrente sanguíneo y lograr adherirse a materiales clínicos de plástico que favorecen la aparición de infecciones diseminadas. Además, se ha comprobado que una vez formado estas biopelículas, son muy resistentes a los agentes antifúngicos (Chandra *et al.*, 2001).

Los pacientes de mayor riesgo de candidiasis son aquellos que su sistema inmune está altamente comprometido, como en casos clínicos de pacientes con cáncer, quemaduras, politraumatismo, desordenes hematológicos, trasplantes, con la pandemia de VIH-SIDA en la década de los ochentas incrementó el reporte de ésta infección micótica, colocándola como la causa más frecuente de atención médica primaria por esofagitis candidósica y de complicaciones (Macher, 1988). Este último de hasta el 90% por diseminación de las lesiones; individuos en tratamientos prolongados con antibióticos, terapia inmunosupresora, así como pacientes con problemas de drogadicción.

Se presenta candidiasis oral frecuentemente en los lactantes menores; de forma mucocutánea crónica y granulomatosa que se observa preferentemente en escolares. En enfermedades crónico degenerativos en la que manifiestan candidiasis intertriginosa como en adultos obesos y pacientes diabéticos descompensados (Owen *et al.*, 2004).

En mujeres, la vaginitis candidósica es una de las infecciones más frecuentes y recurrentes en la consulta médica diaria de gineco-obstetricia (Carr *et al.*, 1998; Bonifaz, 2000). La infección intraamniótica provocada por *Candida* spp. es causa de aborto, y una de las 2 primeras causas de parto prematuro, ruptura prematura de membranas e infección materna como neonatal (Braun *et al.*, 2003). Por lo tanto, se obtienen neonatos de bajo peso que al nacer tienen, además de una inmadurez inmunológica, una inmadurez de la piel (P C Ng, 1994; Reef *et al.*, 1998); por lo que *Candida* spp. coloniza; provocando un deterioro neurológico o la muerte, en el 73% de los casos que desarrolló la candidiasis (Oh *et al.*, 2006).

Las infecciones ginecológicas se clasifican según la localización primaria de los síntomas y/o signos clínicos y se describen como vulvitis, vaginitis y endocervicitis. Sin embargo en la práctica médica, el proceso inflamatorio no suele limitarse a una sola región anatómica; sino que en la mayoría de las paciente se manifiesta preponderantemente como una vulvovaginitis y no como una vaginitis aislada (Fernández y Lombardía, 2002).

II.2.5 Epidemiología

La candidiasis es la cuarta causa de infección nosocomial en los Estados Unidos. Tiene la mortalidad cruda más alta (40%) y tiene una tasa global de 1.4 episodios de candidemia por cada 10,000 paciente-día y una tasa de 5.3 episodios por 10,000 admisiones en hospitales (Edmond *et al.*, 1999).

Se considera que *C. albicans* es la especie más frecuentemente asociada a patogenicidad y algunas especies como *C. glabrata* y *Candida krusei* son aisladas con mayor frecuencia debido a su probable resistencia innata a los fármacos antifúngicos de uso común y disponibles actualmente. En el caso de *Candida parapsilosis*, su capacidad de sobrevivir en ambientes hospitalarios incrementa su probabilidad de infectar individuos.

Por otra parte en la relación patógeno-huésped el factor ambiental y la distribución geográfica juegan un papel muy importante. En los Estados Unidos cepas de *Candida* varían con el lugar de origen y residencia de las pacientes, aislándose *C. albicans* como primera causa de infección con altos porcentajes de prevalencia: 30.2% en el Suroeste, 54.5% en el noreste de ese país; (Edmond *et al.*, 1999). Candidiasis es una enfermedad que afecta a la población mundial sin discriminación. Sin embargo, la epidemiología de las candidemias difiere de país a país. Las infecciones por *Candida* se han estudiado ampliamente en los Estados Unidos y Europa, en América Latina no se cuenta con información suficiente sobre este problema de salud (Colombo *et al.*, 2006). En países como México, por ejemplo, el reporte de casos de Candidiasis no es obligatoria.

Otro de los grandes problemas es la incidencia de infecciones por levaduras del género *Candida* se ha incrementado en los últimos 30 años, asimismo ha aumentado la frecuencia de CVV (Horowitz, 1992). La CVV se presenta en todos los grupos socioeconómicos del mundo. La tasa de colonización es menor en mujeres prepúberes y posmenopáusicas, lo cual enfatiza la dependencia hormonal sobre la CVV (Sobel 1990). La CVV es causa común de morbilidad en mujeres y afecta alrededor de 75 % de todas las mujeres adultas, las que en algún momento de su vida padecen al menos de un episodio de esta infección (Fidel *et al.*, 2000). El criterio para el diagnóstico de la CVV durante muchos años se ha basado en la combinación de signos y síntomas y en la confirmación por estudio micológico de la presencia de hongos levaduriformes, pero la identificación de especies es técnicamente complicada. Aproximadamente el 80 % de infecciones vaginales es debido a *C. albicans* y de este porcentaje puede presentarse una infección mixta con otra especie de *Candida* incluyendo a *C. glabrata* y *Candida tropicalis*. Sin embargo, del 15 al 20 % de mujeres tienen una colonización asintomática. (Eschenbach y Hillier, 1989).

La vulvovaginitis es una de las causas más frecuentes de consulta ginecológica, del 7 al 28 % según diferentes autores. La candidiasis es la causa más frecuente de Vulvovaginitis en Europa (Howard, 1991). La candidiasis, vaginitis bacteriana y tricomoniasis constituyen el 90 % de los diagnósticos microbiológicos de vulvovaginitis (Martens, 1990). En la última década se ha observado una disminución en la incidencia de la tricomoniasis y un incremento de la CVV del 13 % en mujeres estadounidenses y del 19 % en la población europea (Horowitz, 1991).

Se estima que el 40 a 50% desarrolla infección vaginal recurrente por *Candida* siendo *C. albicans* la especie más frecuentemente aislada, responsable del 80 al 90% de las infecciones micóticas vaginales (Cantú *et al.*, 2006). Adicionalmente, un 5% de las mujeres adultas presentan episodios de CVV recurrente refractaria al tratamiento; aunado a que recientemente, la frecuencia de especie non-albicans (p.ej., *C. glabrata*) ha aumentado significativamente.

II.3 *Candida* “el organismo”

II.3.1 Género Candida

La gran mayoría de los hongos patógenos son Ascomicetos, divididos en dos grandes grupos: los *Hemiascomycetes*, en donde se encuentra la mayor parte de las levaduras y los hongos filamentosos *Euascomycetes*. Estos grandes taxones se originaron de un ancestro en común hace aproximadamente 300 a 400 millones de años. (Berbee y Taylor, 2001) entre los periodos Devónico y Carbonífero en la era Paleozoica. (Lincoln *et al.*, 1998).

La reconstrucción de la historia evolutiva realizada a partir de DNA ha sido evidenciada en estudios en los que se utilizaron secuencias del gen que codifica para el citocromo *c* (Fitch y Margoliash, 1967), describiendo también el origen de 20 especies eucariotas importantes, entre ellas, las levaduras del género *Candida*.

La clasificación de *Candida*, permite ubicar a las levaduras de este género en una jerarquía basada en relaciones filogenéticas y taxonómicas (Tabla 1). *Candida* se encuentra dentro de la familia *Saccharomycetaceae* relacionado filogenéticamente con levaduras *Saccharomyceae* (Jones *et al.*, 2004; Lutzoni *et al.*, 2004).

Tabla I. Taxonomía de *Candida*

Reino	<i>Fungi</i>
Subfilo	<i>Saccharomycotina</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Género	<i>Candida</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Saccharomycetes</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>

En cultivos o tejidos, las especies de *Candida*, crecen como levaduras ovales en gemación de 3 a 6 μm de diámetro, que puede desarrollarse en estados morfológicos distintos. Cuando las gemas continúan su crecimiento sin desprenderse generan cadenas de células alargadas, pinzadas o constreñidas entre los tabiques de las células y pueden elongarse hasta formar pseudohifas e hifas verdaderas (Brooks *et al.*, 2005).

In vitro son de color blanco cremoso, brillante, húmedas, glabras, redondeadas y de bordes bien definidos; con olor característico de las levaduras y tienen la capacidad de asimilar y fermentar carbohidratos; pero ninguna de las especies de *Candida* producen pigmentos carotenoides, ni asimilan el inositol (López Martínez *et al.*, 2004).

II.3.2 Características Moleculares.

En el 2004 se secuenció el genoma completo de la cepa SC5314 de *C. albicans* en el Stanford DNA Sequencing and Technology Center (Braun *et al.*, 2005) y el genoma de la cepa CBS138 de *C. glabrata* <http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html#> (Koszul, 2003; Dujon *et al.*, 2004) por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Candida tiene un tamaño del genoma aproximado de 16 Mb con 6,345 genes (Jones *et al.*, 2004; Chibana *et al.*, 2005) y 7 cromosomas específico para *C. albicans* (Chibana *et al.*, 2005) y de 12.3 Mb, 5,283 genes y 13 cromosomas para *C. glabrata* (Dujon, 1992; Dujon *et al.*, 2004). Otra de las características es que *Candida* es un hongo diploide o casi diploide, heterocigoto con una proporción significativa de genes localizados en varios cromosomas (Soll, 2007).

El género *Candida* consiste en un grupo heterogéneo de especies de levaduras que usualmente tiene la particularidad de ser el único hongo patógeno humano conocido, dimórfico, cuya fase micelial es infectiva. Pero dentro de estas especies, existe una especie (*C. glabrata*) que no cumple con las características de filamentación descritas. (Fidel Jr. *et al.*, 1999). Por otra parte, varios patógenos eucariotes de humanos parecen no tener reproducción sexual, como *C. albicans* y *C. glabrata* que se han considerado teleomórficos desde que se describieron. Recientemente, se descubrió que *C. albicans* posee genes similares a los que controlan el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae* denominados *MTL* (Mating-Type Like), y que es capaz de aparearse tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* en un modelo de candidiasis sistémica de ratón (Hull *et al.*, 2000; Magee y Magee, 2000).

Al igual que otros hongos patógenos, *Candida* tiene la capacidad de infectar tejidos se ha vinculado estrechamente a la capacidad de cambiar de forma de acuerdo a la naturaleza, número e intensidad de señales ambientales (nutrientes, temperatura óptima de crecimiento a 37°C y pH) (Ernst *et al.*, 2000), así como la

actividad de las rutas de transducción de señales, que incluyen factores de transcripción específicos y vías de las Map cinasas MAPK (Liu, 2001) y los factores de virulencia controlados por diferentes genes que se expresan en un número particular y momento concreto, que determinan el fenotipo y virulencia de cada aislamiento (Castrillón *et al.*, 2005).

Entre los genes conocidos asociados a la virulencia de *C. albicans* están el gen de la hexosaminidasa (*HEX1*), varios genes de proteinasas aspárticas (*SAP1*, *SAP2*, *SAP3* y *SAP4*) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (*INT1*), entre otras. (Naglikji *et al.*, 2003b).

En las bacterias patógenas a diferencia de *Candida*, la enfermedad que producen a menudo, es explicada simplemente en términos de los efectos de una toxina específica, esto es: “Ninguna toxina, ninguna enfermedad”.

Candida no produce ninguna toxina conocida hasta el momento, pero tienen un conjunto de enzimas como proteasas, lipasas y fosfolipasas, que puede degradar tejidos humanos. Las proteasas que produce *Candida* en particular, parece ser un aspecto importante de virulencia (Gow, 2002).

III. Objetivos

III.1 Objetivo General

- Identificar las diferencias moleculares entre cepas de *Candida* spp. en muestras clínicas de pacientes Gineco-Obstétricas con y sin síntomas de candidiasis en Ensenada B.C.

III.2 Objetivos Específicos

- Identificar las especies de *Candida* en muestras clínicas de pacientes Gineco-Obstétricas.
- Analizar la correlación de especies de *Candida* en pacientes asintomáticas y con infección.
- Describir la morfología de las células de *Candida* spp. en pacientes asintomáticas y con candidiasis.
- Describir la distribución de las características genéticas de acuerdo a variables sociodemográficas y clínicas de pacientes Gineco-Obstétricas.

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Diseño metodológico

Se llevó a cabo un estudio descriptivo, transversal y prospectivo en pacientes ginecológicas de las que se tomaron muestras de exudado vaginal. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a las técnicas microbiológicas descritas a detalle más adelante.

IV.2 Características de la muestra.

Se estudiaron un total de 140 muestras de secreción de la mucosa vaginal, obtenidas de pacientes de la Clínica de Displasia del Hospital General Ensenada de la Secretaría de Salud y de un consultorio privado de la misma Entidad Federativa.

Las muestras fueron tomadas durante el periodo comprendido entre Diciembre de 2007 hasta Abril de 2008, el tamaño mínimo de muestra se calculó de 91 pacientes, pero se logró un tamaño 53 % mayor.

Se incluyeron a todas las pacientes sin importar su razón para asistir a la consulta.

- Excepto a las pacientes que no aceptaron participar en el estudio
- Que estuvieran bajo tratamiento médico con antibióticos o antimicóticos de forma oral o local durante, o por lo menos 2 semanas previas al estudio.

A todas la pacientes se les informó previamente de los objetivos del estudio y del procedimiento para la toma de muestra, una vez de enterarlas y contestar sus dudas, se les dio a firmar un formato de consentimiento informado, como acto legal y requisito bioético para la investigación científica en el área de la salud humana (Dobler 2001, Mendoza *et al.*, 2003), (Anexo A).

El presente trabajo corresponde a: “Investigación sin riesgo para la paciente” y fue evaluado y aprobado por el comité de bioética de la Escuela de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Baja California (Anexo B).

Se mantuvo la confidencialidad y protección de la información obtenida en todos y cada uno de los casos, en cumplimiento del artículo décimo séptimo de los lineamientos generales de protección de datos personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación el 30 de Septiembre del año 2005.

IV.3 Cuestionario

Se obtuvo información sobre variables sociodemográficas y clínicas a través de un instrumento tipo cuestionario, con 23 reactivos (Anexo C).

El cuestionario se dividió en 5 secciones:

- a. Datos generales de la paciente
- b. Factores de riesgo que predisponen a Candidiasis vaginal

- c. Síntomas
- d. Signos detectados durante la exploración física
- e. Resultados obtenidos de todos los procesos llevados a cabo en cada una de las muestras en el laboratorio.

Las tres primeras secciones corresponden a los datos de las pacientes obtenidos de manera directa durante el interrogatorio en la consulta médica; la cuarta sección concierne a la exploración física y la quinta parte cuenta con 9 reactivos adicionales para los datos obtenidos del procesamiento de las muestras dentro del laboratorio. A cada una de las hojas se le asignó un número consecutivo igual al que se utilizó en la hoja de consentimiento informado, para la mejor identificación de cada una de las muestras obtenidas.

Exploración física

IV.4 Aislamiento primario de muestras clínicas.

Para evitar el sesgo estadístico, en todos los casos, las muestras fueron tomadas directamente de las pacientes por el mismo médico a cargo, dentro de la consulta médica.

Con la utilización de dos hisopos con punta de algodón y bastoncillo largo de madera estériles, se procedió a tomar la muestra de fondo de saco cervical.

Una vez entregados los hisopos por el médico; del primer hisopo se inóculo en caja de Petri de 8.5 cm con medio de cultivo Agar Dextrosa-Sabouraud, medio específico para aislamiento de hongos patógenos de humanos. Después el hisopo fue introducido en un vial de polipropileno de 5.0 ml con tapa redonda para criofijación (Corning[®]), conteniendo 2.5 ml de solución fisiológica isotónica al 0.9% estéril (Pisa[®]), rotulados con el número consecutivo correspondiente y colocado en una hielera que contenía hielo seco para su rápida congelación. Posteriormente

fueron trasladados al laboratorio y almacenados en refrigerador de ultracongelación a -80 °C.

El segundo hisopo fue utilizado para realizar una citología vaginal, colocando la muestra clínica sobre un cubreobjetos esterilizado y rotulado con el número correspondiente de cada paciente, muestra que fue fijada con spray GRAFCO AEROCELL, Cytology fixative spray (Graham-Field®) para citología vaginal. Con el mismo hisopo determinó el pH de la secreción vaginal utilizando una tira reactiva (pHydrion papers®) con un intervalo de pH de 3.0 a 5.5. Para la fijación instantánea de las células, al final, el hisopo fue colocado en una solución de paraformaldehído al 4% en Solución Fisiológica (v/v). Una vez obtenidas las muestras y las hojas con la información requerida, se procedió a realizar el estudio Micológico.

IV. 5 Identificación Fenotípica y Genotípica de Aislamientos Clínicos.

IV.5.1 Estudio Micológico.

El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Microbiología en la División de Biología Experimental y Aplicada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) Baja California, México.

IV.6 Cepas y condiciones de cultivo

IV.6.1 Medio de Cultivo Agar Dextrosa-Sabouraud

El Agar Dextrosa-Sabouraud (Anexo 1a) se utilizó para el aislamiento primario de las muestras obtenidas directamente de la paciente. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente de 24 a 72 hrs. y en algunos casos se mantuvieron en las cajas de Petri hasta 10 días posteriores a la inoculación.

IV.6.2 Medio de Cultivo YPD

Una vez obtenido el crecimiento del agente biológico en el aislamiento primario, se realizó un segundo aislamiento para obtener un cultivo axénico. Este

último aislamiento se efectuó en medio de cultivo YPD-agar preparado con *extracto de levadura* 1%, *Peptona* 2% , *Dextrosa* 2%, *agua destilada/desionizada* y *agar* 2% (Anexo 1b). Cultivándose de 24 a 72 hrs, a 37 °C. en un incubador (VWR).

Posteriormente de cada uno de los cultivos obtenidos del segundo aislamiento, fueron inoculados de 1 a 3 colonias (dependiendo de las características y el número de ellas encontradas en cada cultivo), en tubos de vidrio de borosilicato estériles con tapa de plástico de 20 x 150 mm, conteniendo 10 ml de medio de cultivo YPD-líquido.

Estas se inocularon en la mesa de trabajo bajo doble mechero y con todas las medidas de seguridad y en condiciones asépticas necesarias; los tubos fueron rotulados debidamente con el número respectivo de cada paciente y se mantuvieron a 37 °C con agitación continua a 180 rpm; en un incubador Environ Shaker durante toda la noche (de 12 a 20 hrs).

*IV.7 Diagnóstico molecular de *Candida* spp.*

IV.7.1 Técnica Molecular de PCR –RFLP

IV.7.2 Mezcla de reacción para PCR, en muestras positivas.

Una vez extraído y cuantificado el DNA, se comprobó la presencia de DNA de hongos, a través de la amplificación utilizando oligonucleótidos universales para obtener una región específica de RNAr.

Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 25 µl, que contenía 12.5 µl de Buffer Fail Safe 2x (EPICENTRE® Biotechnologies), 0.5 µl de cada oligonucleótido (ITS1, ITS4) a 10 mM, 20 ng/µl de DNA templado y 1.25 U de GoTaq® DNA polimerasa (Promega®), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2% utilizando cámara de electroforesis Bio Rad® a 60 V por 2 h y 30 min; teñidos

con *Gel Star*[®] y observados bajo luz UV, utilizando un transiluminador (Bio Rad[®]) y las imágenes fueron tomadas con una cámara Canon EOS Digital Rebel XT de 12 Megapíxeles.

IV.7.3 Mezcla de reacción para PCR, en muestra negativas a *Candida* spp.

Para realizar PCR de las muestras negativas, se utilizó en la mezcla de reacción: 5 µl de 5xGreen GoTaq[®] Flexi Buffer 1X (Promega[®]), con 2.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl dNTPs 1 mM, agregando 0.7 µl del oligonucleótido 27F y 0.7 µl del oligonucleótido 876 a 10 mM, utilizando de 5-10 ng/ µl de DNA templado, más 0.25 µl de GoTaq[®] DNA polimerasa (Promega[®]) y agua HPLC estéril en cantidad suficiente para completar 25 µl de reacción.

*IV.8 Identificación de Cepas de *Candida* spp.*

IV.8.1 Extracción de DNA para las cepas positivas

De los tubos de ensayo que se obtuvo un crecimiento de un agente biológico, se transfirió el cultivo a un microtubo Eppendorf de 1.5 ml; se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 567 µl de TE (Tris-HCl 10 mM a pH 8, EDTA 1mM a pH 8), se agregó 5 µl de Lisozima (Sigma[®]) y se incubó a 37 °C durante 10 min. Después de la incubación se adicionaron RNAasa (Invitogen[®]) 20 mg/ml y se incubó nuevamente a 37 °C por 1 h. Postincubación se agregaron 30 µl de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10% y 5 µl de proteinasa K (Promega[®]), después de la incubación a 37 °C por 1 h más, se adicionó 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB al 10% para obtener una solución de NaCl 0.7 M, La solución se calentó previamente a 55 °C y se incubó a 65 °C por 10 min. Para precipitar el DNA genómico se añadió 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), seguido de centrifugación a 14 000 rpm por 5 min. Se transfirió el sobrenadante (600 µl) a otro tubo de 1.5 ml y se agregó 600 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugándose a 14,000 rpm por 5 min. Nuevamente se transfirió el sobrenadante (600 µl) a otro tubo de 1.5 ml y se agregó 600 µl de isopropanol y se

centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 1 ml de etanol al 70%, fue centrifugado nuevamente a 14,000 rpm por 5 min; descartando el sobrenadante y dejando secar la pastilla celular durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el precipitado en 100 μ l de TE, los tubos se almacenaron a -20 °C., debidamente rotulados (Anexo 3).

IV.8.2 Extracción de DNA para los cultivos negativos

Para la extracción de DNA genómico de las cepas que fueron negativas en los cultivos primarios y secundarios, así como los que no presentaron crecimiento de agente biológico en medio líquido, se procedió a extraer la solución del tubo de criofijación con el hisopo resguardado en el ultracongelador (Nuaire[®]) a -80 °C. Con una pipeta se tomaron 2.5 ml de la solución fisiológica en donde se encontraba el hisopo sumergido y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para su centrifugación, descartando el sobrenadante y obteniendo un precipitado. El precipitado se utilizó para la extracción de DNA genómico, utilizando el Kit comercial de extracción para levaduras y bacterias (Mobio Laboratories Inc.) bajo las recomendaciones descritas por el fabricante.

Todas las extracciones realizadas de DNA se compararon con un marcador estándar de DNA de lambda (λ) en geles de agarosa al 1.5 % con Bromuro de Etidio a $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$, (Invitrogen[®]), utilizando una cámara de electroforesis Bio Rad[®] a 75 Volts (V) durante 35 min; y observándose en un transiluminador BioRad con luz ultravioleta (UV) y el software Quantity One[®] para la obtención de imágenes.

IV.8.3 Cuantificación de DNA genómico por espectrofotometría

Se cuantificó la concentración de DNA genómico proveniente de las extracciones de los cultivos positivos y el DNA de los tubos de criofijación que se obtuvieron correspondientes a los cultivos negativos. Se empleó 1 μ l de cada muestra en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop[™] ND-1000, en el módulo de ácidos nucleicos, correspondiente a luz ultravioleta-luz visible (UV-Vis)

que cubre un intervalo espectral de 220 a 750 nm y utilizando el software NanoDrop V 3.3.0 para la obtención de los datos de las concentraciones de DNA.

IV.8.4 Diluciones a 20 µg/ ml

En algunos casos se prepararon diluciones para obtener una concentración final de 20 µg/ml de DNA genómico, que sirvió para proceder a las técnicas moleculares de identificación de especies (PCR-RFLP).

IV.9 Oligonucleótidos

IV.9.1 ITS 1 e ITS 4, para identificación de muestras de *Candida* spp.

Se utilizaron los oligonucleótidos universales específicos para hongos. Para éste estudio se manejo ITS1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') en cadena líder e ITS4 (5.-tcctccgcttattgatatgc-3') para cadena complementaria (Figura 1). Estos oligonucleótidos amplifican la zona del DNA que codifica para RNAr que se transcribe de regiones de espaciadores intergénicas de especies de *Candida* sp. (Figura 1)

- 1 ggaagtaaaa gtcgtaaca ggtt**ccgta ggtgaacctg cgg**aaggatc attactgatt
- 61 tgcttaattg caccacatgt gttttcttt gaaacaaact tgctttggcg gtgggccag
- 121 cctgccgcca gaggtctaaa cttacaacca atttttatt aactgtcac accagattat
- 181 tactaaatag tc**aaaacttt caacaacgga tctcttggtt ctgcatcga tgaagaacgc**
- 241 **agcgaaatgc gatacgtaat atgaattgca gatattcgtg aatcatcgaa tctttgaacg**
- 301 **cacattgcgc cctctggtat tccggagggc atgcctgitt ga**gcgtcgtt tctccctcaa
- 361 accgctgggt ttggtgtga gcaatacgac ttgggttgc ttgaaagacg gtagtggtaa
- 421 ggcgggatcg cttgacaat ggcttaggtc taaccaaata cattgcttgc ggcggtaacg
- 481 tctaccacgt atatctcaa actttgacct caaatcaggt aggactaccc gctgaactta
- 541 **agcatatcaa taagcggagg a**

Figura 1. Posición de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR en la región 18s-ITS1-5.8s- ITS2-28s de *C. albicans* IFM 49030. ITS1 (rojo), ITS4 (verde), región 5.8s (azul).

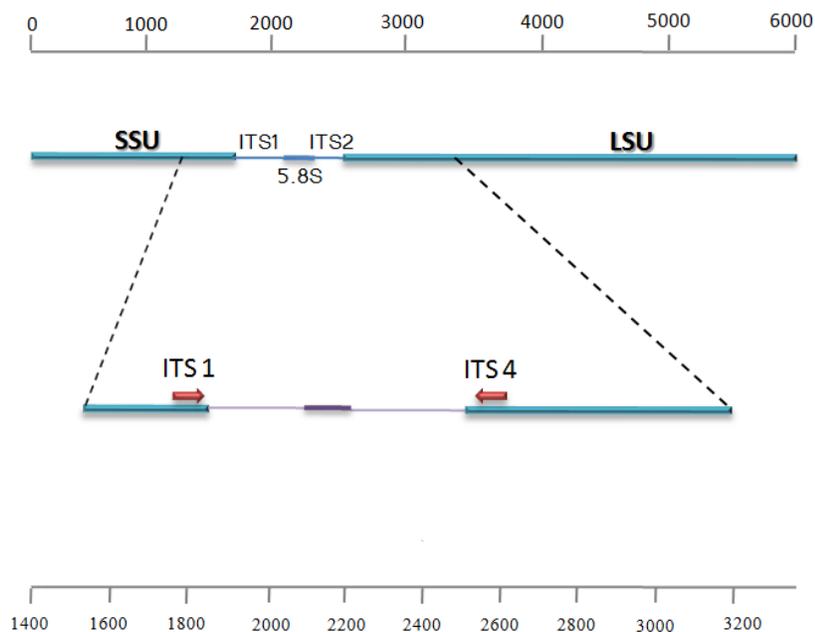


Figura 2. Diagrama de localización de oligonucleótidos propuestos en el genoma fúngico. Las distancias están representadas en pares de bases. SSU: Unidad pequeña ribosomal (18S), LSU: Unidad mayor ribosomal (36S); ITS: Región espaciadora intergénica. Modificado de Martin y Rygiewicz, 2005.

IV.9.1 Oligonucleótidos para identificación de bacterias

Se utilizaron un set de oligonucleótidos para la identificación de bacterias en las muestras clínicas negativas a *Candida spp.* Se amplificó la región variable 16S ribosomal del RNA, empleando el oligonucleótido sentido 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el oligonucleótido antisentido 797R (5' GGGTATCTAA-3').

IV.10 Técnica de PCR

IV.10 .1 Condiciones para la PCR en muestras positivas.

Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador NYX Technik ATC 401, empleando un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min (alineación), y 72 °C por 1.5 min (extensión), y una extensión final a 72 °C por 7 min.

Los productos obtenidos de PCR se mezclaron con amortiguador de carga Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) y se compararon con un marcador estándar λ ladder Hind III (Promega®). La separación de los productos de PCR de cada muestra se realizó en geles de agarosa de grado analítico al 1.5 %, (VWR®) con Bromuro de Etidio a una concentración de 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Invitrogen®). Cada producto de PCR se hizo migrar dentro de una cámara de electroforesis (Mini-Sub, Cell GT, Bio-Rad®) con solución tampón TAE 1X (Anexo 4) por 35 min a 75 V. Los geles de agarosa fueron visualizados bajo luz UV con el transiluminador (Bio-Rad®) dotado de un software Quantity One® para análisis de imagen.

IV.10.2 Condiciones para la realización de PCR en muestras negativas a *Candida* spp.

Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador NYX Technik ATC 401, empleando un ciclo de 10 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, seguidos de una alineación por 1 min a 56 °C, y una extensión 72 °C por 2 min, terminando con una extensión final por 10 min a 72 °C.

La verificación de los amplicones de PCR obtenidos, fueron visualizados en geles de agarosa de grado analítico al 2 %, (VWR®), utilizando una cámara de electroforesis por 35 min a 75 V; posteriormente teñidos con *Gel Star*® durante 30 min en oscuridad total. Se observaron bajo luz UV, utilizando un High performance

2UV™ Transilluminator UVP® y las imágenes fueron tomadas con una cámara Canon EOS Digital Rebel XT de 12 Megapíxeles.

IV.11 Purificación de bandas de DNA de productos de PCR.

Los productos de PCR de muestras positivas que presentaron una banda de amplificación, fueron purificados por shock alcalino. Esta purificación se realizó utilizando etanol absoluto a -20 °C, agregando de 2 a 2.5 volúmenes en base al producto de PCR obtenido y se mantuvo a -80 °C toda la noche. Posterior a la incubación se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante y se secó el DNA por 30 min con la técnica del microtubo invertido; finalmente, se resuspendió el precipitado con 30 µl de solución TE 10/1.

Los PCR que presentaron un doble patrón de bandas de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con Bromuro de Etídio a la concentración anteriormente descrita, empleando 75 V. por 1hr y 10 min. Posteriormente se realizó una incisión en el gel de agarosa para recuperar y purificar dichos fragmentos. La purificación se realizó bajo el protocolo descrito en el Kit comercial de QIAquick® Gel Extraction kit (50) de QIAGEN®.

IV.12 Marcador Molecular de RFLPs

Para ésta investigación de identificación de cepas de *Candida*, se utilizó la técnica de marcador molecular PCR-RFLP, variante del RFLP, descrita por primera vez por Mirhendi en el 2001, como método de identificación de importantes hongos oportunistas; pero con la modificación descrita por el mismo autor en el 2006.

Una vez purificados los productos de PCR de las muestras que resultaron positivas, se utilizó una sola enzima de restricción, *MspI* (Promega®) con las siguientes condiciones (Tabla II):

Tabla II. Reactivos utilizados para la digestión.

Mezcla	1x (μl)
H2O HPLC	16.3
Buffer B 10x	2.0
BSA	0.2
DNA (producto de PCR)	1.0
Enzima de restricción Msp 1 (5 Units)	0.5
Volumen final	20.0

El volumen final de cada muestra fue incubado a 37 °C por 2hr y 30 min., tiempo en que la enzima *MspI* disocia los enlaces fosfodiéster entre dos citocinas seguidas de dos guaninas en ambos sentidos. Los cortes fueron efectuados en sitios de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado con los oligonucleótidos: 5'....C▼CGG....3' y 3'....G GC▲C....5'

La separación de los productos de la digestión de cada muestra se realizó en geles de agarosa de grado analítico al 2 %, (VWR®) con Bromuro de Etidio a una concentración de 0.1 μg ml⁻¹ (Invitrogen®). Cada producto de la digestión se hizo migrar dentro de una cámara de electroforesis (Mini-Sub, Cell GT, Bio-Rad®) con solución tampón TAE 1X, por 2 hrs y 30 min a 60 V. Los geles de agarosa fueron visualizados bajo luz UV con el transiluminador (Bio-Rad®) las imágenes fueron tomadas con una cámara Canon EOS Digital Rebel XT de 12 Megapíxeles.

IV.13 Controles

Para este estudio se utilizó como Control Positivo a la cepa ATCC 90028 de la levadura de *C. albicans* y como Control Negativo a la cepa ATCC 484874 de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Para esta última cepa se utilizó medio LB-líquido de acuerdo al protocolo descrito por Bertani en 1951. Estas cepas fueron

procesadas de la misma manera que el resto de las muestras clínicas recolectadas (cultivo, extracción de DNA genómico, purificación y PCR-RFLP).

IV.14 Citología vaginal

IV.14.1 Tinción de las muestras

De las citologías realizadas durante la exploración física, solo se tiñeron 60 muestras que resultaron positivas en los cultivos y análisis moleculares. A estas muestras se le realizó tinción de Grocott-Gomori utilizando un Kit comercial de tinción (Productos Naturales y Analíticos).

Se realizaron análisis fenotípicos microscópicos de la forma de filamentación de algunas de las cepas de *Candida spp.*, seleccionadas, posterior al análisis molecular. Estas fueron crecidas durante toda la noche en medio líquido YPD y posteriormente se inocularon en placas de Petri con medio Agar-agua y BSA a una concentración de 1%, para su crecimiento en incubación a 37 °C de 6 a 8 h.

IV.15 Análisis de secuencias

Los productos de PCR amplificados fueron purificados utilizando un Kit comercial de QIAquick[®], para purificación de productos de gel y PCR (50) de QIAGEN[®], de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Estas reacciones se enviaron al laboratorio comercial SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com>) en San Diego, California, EUA, en donde fueron amplificadas utilizando nucleótidos terminadores de secuencia (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) y procesadas en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Automated Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems).

IV.16 Análisis de datos

Para el análisis de la información geográfica y variables espaciales de los casos, se utilizó el sistema de información geográfica ESRI ArcView 3.2.

En el caso de los análisis de datos, se utilizó el paquete estadístico *Statistica v.8.0* y *Excel*.

V. Resultados

V.1 Aspectos generales.

Se estudiaron 140 pacientes ginecológicas atendidas en Servicios de Salud públicos y privados en la Ciudad de Ensenada, Baja California. El promedio de edad de las pacientes fue de 36.2 ± 12.6 (media \pm desviación estándar) años.

La distribución de las pacientes por lugar de origen se muestra en la Figura 3. El 45 % de las mujeres eran originarias de Ensenada, 3.6 % de Tijuana, Mexicali y Rosarito y 51.6 % del resto de la República Mexicana y una paciente de California, USA.

V.2 Portadoras de *Candida* spp.

De las 140 muestras de exudado vaginal tomadas, el 70% (98) fueron positivas para colonias similares a levaduras en el aislamiento primario (Cultivo en medio Dextrosa-Sabouraud). Al confirmar por PCR la presencia de *Candida* en el DNA purificado de los cultivos, solo se pudo corroborar en el 60% (59), a todos los cultivos que resultaron negativos en la amplificación de las regiones conservadas para *Candida*, se realizó la amplificación de las regiones 16s para bacterias, encontrando que en 13 se amplificaron bandas. En todas las muestras que resultaron negativas en el aislamiento primario tampoco se amplificó el DNA de *Candida* (Figura 4).



Figura 3. Distribución geográfica de las pacientes ginecológicas por lugar de origen.

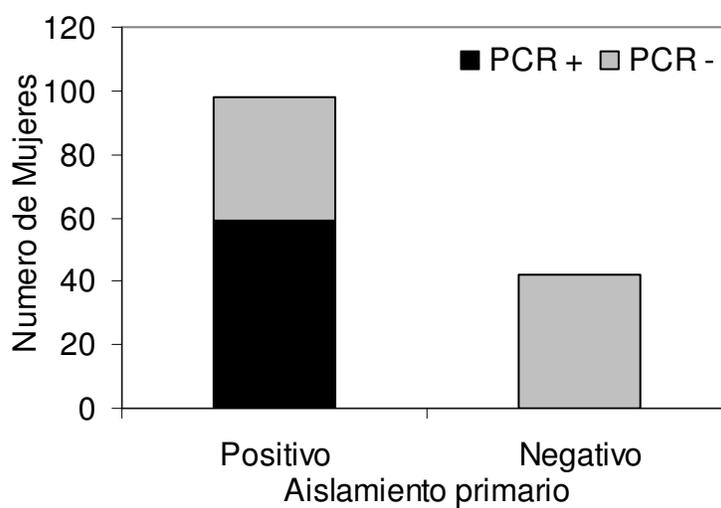


Figure 4. Aislamientos por cultivo primario y por confirmación por PCR de muestras de exudado vaginal de pacientes ginecológicas en Ensenada, B.C.

V.3 Especies de *Candida*

La Figura 5, muestra el resultado de los RFLPs realizados de la amplificación de la region ITS 1-4 de cada uno de los aislamientos de *Candida* spp.

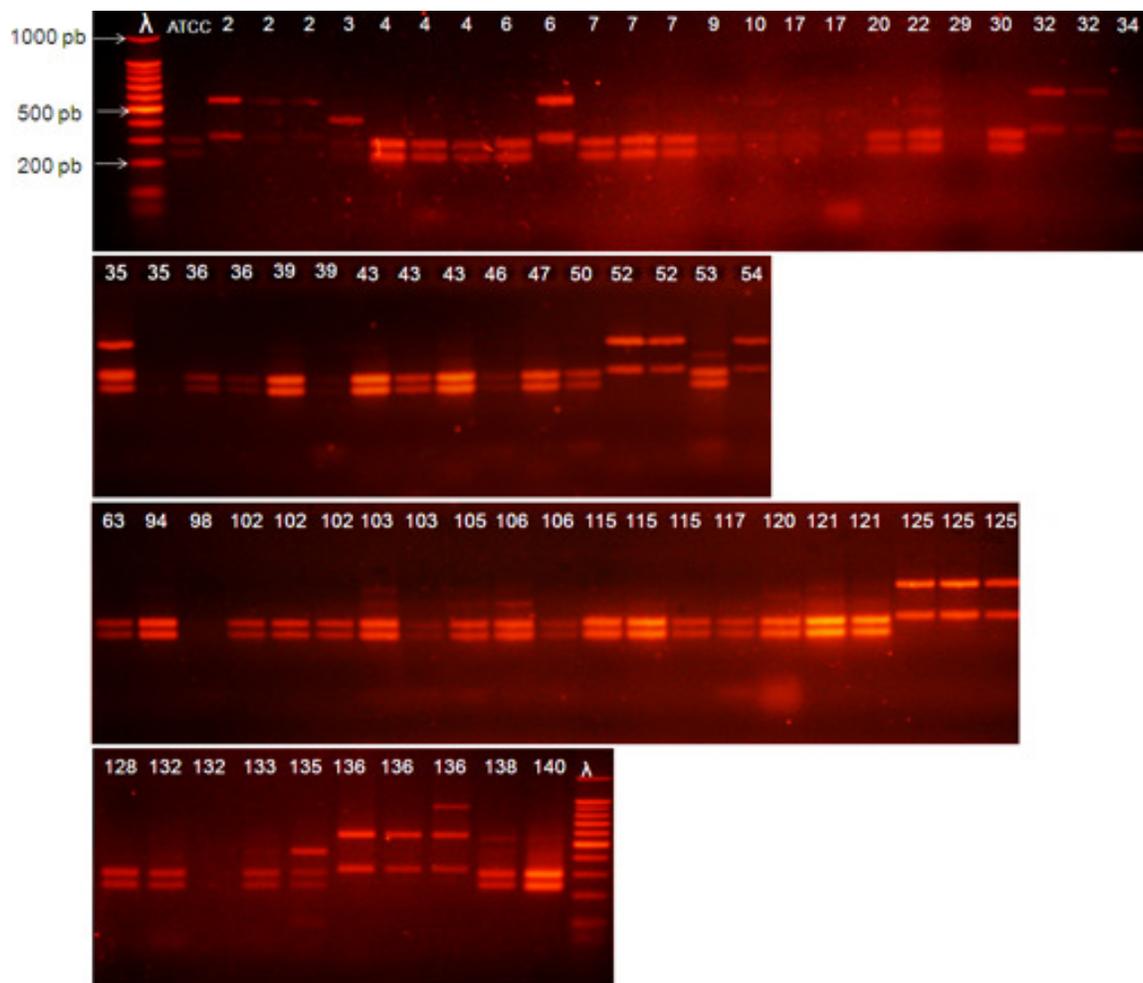


Figura 5. Electroforesis de los RFLPs realizados de la digestión con *MspI* de la región amplificada por PCR (ITS1-4) de cada uno de los aislamientos de *Candida* en pacientes ginecológicas en Ensenada, B.C.. El número superior a cada columna corresponde a la identificación de la paciente, se utilizó marcador de peso molecular de 1,000 pb.

De las 59 pacientes portadoras de *Candida spp*, se aislaron 68 especies de este organismo (Tabla III). La frecuencia mas alta fue para *C. albicans* con 64.7 % de los aislamientos, seguida de *C. glabrata* con un 22.1 %, y *C. tropicalis* con un 10.3 %, solo hubo dos casos (2.9 %) en los que no fue posible identificar la especie de *Candida*, incluso por secuenciación.

Tabla III. Distribucion por especie de los aislamientos en pacientes ginecologicas en Ensenada B. C.

Especie	No.	%
<i>C. albicans</i>	44	64.7
<i>C. glabrata</i>	15	22.1
<i>C. tropicalis</i>	7	10.3
<i>C. sp.</i>	2	2.9
Total	68	100.0

En 50 (84.7 %) pacientes se encontró una sola especie de *Candida* y en nueve (15.3 %) se encontraron dos especies concomitantes de *Candida* en las muestras de exudado vaginal (Figura 6). La distribución de especies por paciente, incluyendo los dobles aislamientos se muestra en la Tabla IV.

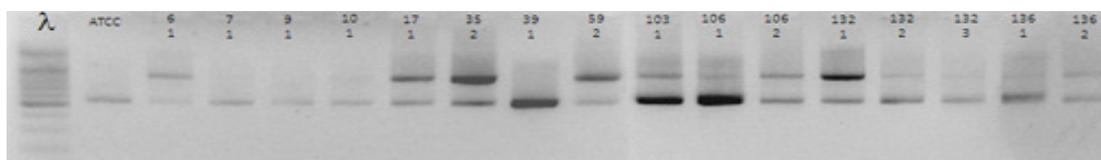


Figura 6. Amplificación de dos bandas que corresponden a especies diferentes de las muestras de exudado vaginal de pacientes gineco-obstétricas.

Tabla IV. Distribución de las diferentes especies de *Candida* en pacientes gineco-obstétricas en Ensenada B. C., incluyendo los dobles aislamientos.

Especie	No.	%
<i>C. albicans</i>	36	61.0
<i>C. glabrata</i>	10	16.9
<i>C. tropicalis</i>	3	5.1
<i>Candida sp.</i>	1	1.7
<i>C. albicans-C. glabrata</i>	4	6.8
<i>C. albicans-C. tropicalis</i>	4	6.8
<i>C. glabrata-Candida sp.</i>	1	1.7
Total	59	100.0

De acuerdo al patrón de bandas de los RFLPs, se realizó un árbol filogénico para conocer asociación de las diferentes especies, Los resultados se muestran en la Figura 7. Es importante señalar que tanto en los casos de *Candida sp.* Como de *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* los fragmentos ITS1-4 amplificados se enviaron a secuenciar y su ubicación filogénica cambio de posición (ver Figura 8).

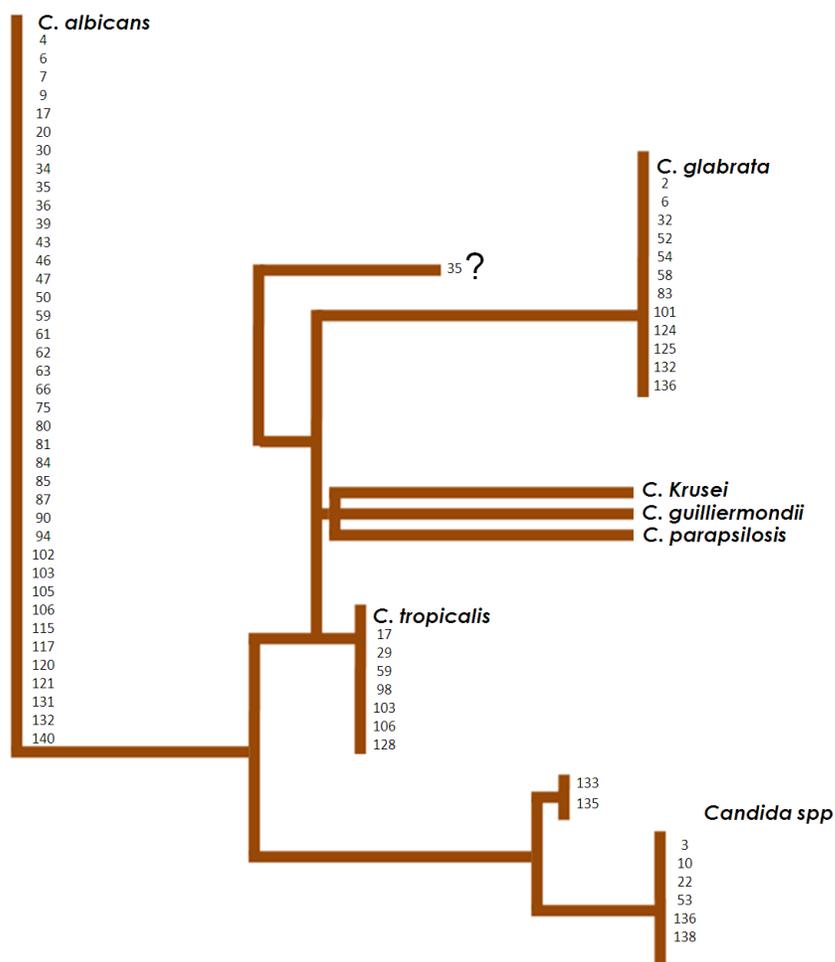


Figura 7. Árbol filogenético realizado en base al patrón de bandas del RFLP.

La Figura 8 muestra la relación filogenética considerando los resultados de la secuencia de las regiones amplificadas, considerando el lugar de origen de las pacientes, se puede apreciar tendencias sin indicación de exclusividad entre el lugar donde nacieron las mujeres y la relación filogenética de los organismos aislados. *C. Krusei*, *C. Guilliermondii*, y *C. Parapsilosis*, representan las especies que se utilizaron para compara a las muestras positivas obtenidas, de acuerdo a el patrón de bandeado, basadas en el tamaño de pb.



Figura 8. Árbol filogenético de las cepas aisladas considerando el resultado de los RFLPs y las secuencias de los fragmentos ITS1-4. Se identifica en cada caso el lugar de origen de la paciente.

V.5 *Candida* spp. y Edad

El grupo de 41-51 años fue el que presentó mayor número de mujeres portadoras de *Candida spp.*, en este grupo 58.6 % presentaron un resultado positivo a la presencia de este organismo, en segundo lugar fue el grupo de 16–20 años (50 %), en tercer lugar de 21-30 (43.6 %), con una disminución en la frecuencia de portadoras en los grupos de 51-60 (23.1 %) y de mayores de 60

(14.3 %) (Tabla V, Figura 9). La diferencia estadística entre las portadoras es significativa de acuerdo a la prueba de ji cuadrada ($X^2=8.22$). $p<0.05$

Tabla V. Distribución por edad de las portadoras de *Candida spp.* en Ensenada, B.C.

Edad	Portadoras de <i>Candida</i>					
	Positivo		Negativo		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
16 - 20	7	5.0	7	5.0	14	10.0
21 - 30	17	12.1	22	15.7	39	27.9
31 - 40	14	10.0	24	17.1	38	27.1
41 - 50	17	12.1	12	8.6	29	20.7
51 - 60	3	2.1	10	7.1	13	9.3
>60	1	0.7	6	4.3	7	5.0
Total	59	42.1	81	57.9	140	100.0

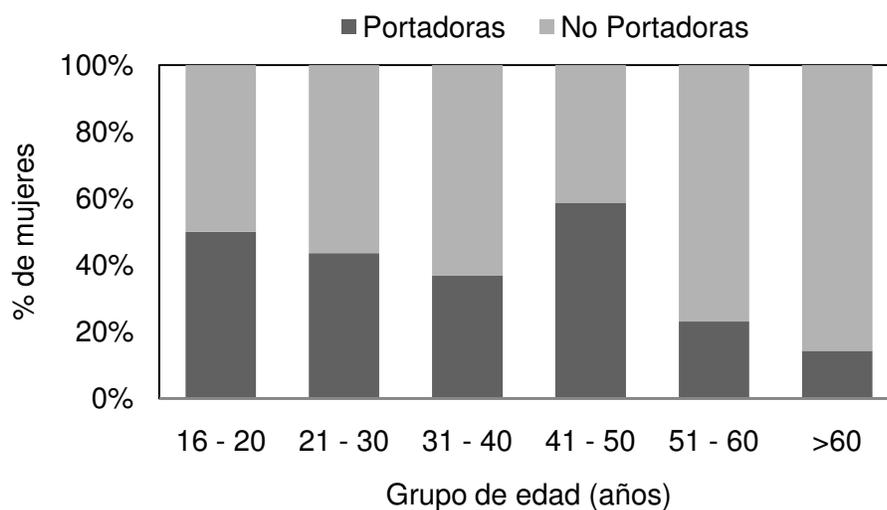


Figura 9. Porcentaje de mujeres portadoras de *Candida spp.* por grupo de edad, en el grupo de pacientes ginecológicas en Ensenada, B. C.

En lo referente a la distribución por especie, se observó que en todos los grupos de edad *C. albicans* fue la más frecuente, en segundo lugar *C. glabrata*, y por último *C. tropicalis*. En los grupos de 31-50 años se encontró el mayor porcentaje de mujeres con más de una especie de *Candida* aislada (8/9). La combinación *C. albicans* y *C. glabrata* se presentó en cuatro mujeres al igual que la combinación *C. albicans* y *C. tropicalis*, solo hubo un caso en el que se aisló *C. glabrata* y *Candida sp.* (1/9) de la misma muestra de exudado vaginal (Tabla VI).

Tabla VI. Distribución por edad y por especie de *Candida* aislada en portadoras en Ensenada , B. C..

Edad	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>Candida sp.</i>		<i>C. albicans-C. glabrata</i>		<i>C. albicans-C. tropicalis</i>		<i>C. glabrata-Candida sp.</i>		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
16-20	5	8.5	2	3.4											7	11.9
21-30	12	20.3	3	5.1	1	1.7					1	1.7			17	28.8
31-40	7	11.9	1	1.7	1	1.7			3	5.1	1	1.7	1	1.7	14	23.7
41-50	10	16.9	4	6.8					1	1.7	2	3.4			17	28.8
51-60	1	1.7			1	1.7	1	1.7							3	5.1
>60	1	1.7													1	1.7
Total	36	61.0	10	16.9	3	5.1	1	1.7	4	6.8	4	6.8	1	1.7	59	100.0

V.5 Uso de métodos anticonceptivos y presencia de *Candida spp.*

En cuanto al uso de métodos anticonceptivo se observó que las pacientes que utilizan alguno tienen un mayor porcentaje de aislamientos de *Candida spp.* a excepción de los casos en los que usan métodos definitivos como la salpingoclasia (OTB) (34.5 %) o la vasectomía (0 %). En las mujeres que utilizan el condón el 87.5 % fueron positivas para *Candida*, de las usuarias de hormonales

(orales, implantes o parches) el 64.7 % tuvieron *Candida* y de las de dispositivo intrauterino (DIU) el 53.3 %. Las que no utilizan métodos anticonceptivos solo fueron positivas para *Candida* el 33.3 % (Figura 10, Tabla VII). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con una $X^2=15.4$ y $p<0.05$. En lo referente a la distribución por especie no se encontró ninguna relación con el uso de anticonceptivos.

Tabla VII. Distribución de portadoras de *Candida* spp. de acuerdo al uso de métodos anticonceptivos en pacientes gineco-obstétricas en Ensenada, B.C.

Anticonceptivos	Portadoras de <i>Candida</i>				Total	
	Positivo		Negativo		No.	%
	No.	%	No.	%	No.	%
No	23	16.4	46	32.9	69	49.3
DIU	8	5.7	7	5.0	15	10.7
Condón	7	5.0	1	0.7	8	5.7
Hormonales	11	7.9	6	4.3	17	12.1
OTB	10	7.1	19	13.6	29	20.7
Vasectomía	0	0.0	2	1.4	2	1.4
Total	59	42.1	81	57.9	140	100.0

$X^2=15.4$

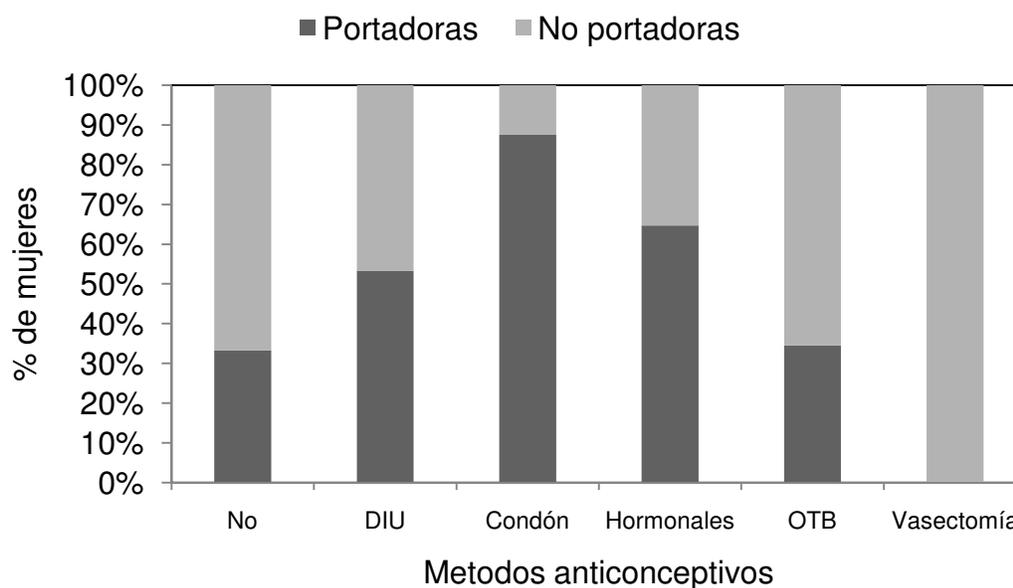


Figura 10. Porcentaje de mujeres portadoras de *Candida* spp. de acuerdo al uso de métodos anticonceptivos en pacientes gineco-obstétricas en Ensenada, B.C.

Por otro lado las pacientes que no utilizan métodos anticonceptivos ya sea porque estaban embarazadas o porque no se encontraban en etapa reproductiva por ya haber presentado la menopausia naturalmente o en forma quirúrgica, presentaron muy bajos índices de ser portadoras de *Candida* spp. (4.3%) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Distribución de pacientes portadoras y no portadoras de *Candida* spp. en pacientes con menopausia y embarazadas.

	Portadoras de <i>Candida</i>					
	Positivo		Negativo		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Menopausia	2	1.4	8	5.7	10	7.1
Menopausia quirúrgica	4	2.9	5	3.6	9	6.4
Embarazo	0	0.0	5	3.6	5	3.6
Ninguna	53	37.9	63	45.0	116	82.9
Total	59	42.1	81	57.9	140	100.0

V.6 Diabetes mellitus y *Candida* spp.

Solo el 3.6 % de las pacientes mencionaron tener diabetes mellitus, de estas tres de cinco fueron positivas para alguna especie de *Candida* (Tabla IX). No hubo diferencias significativas de acuerdo a la prueba exacta de Fisher.

Tabla IX. Distribución de pacientes portadoras y no portadoras de *Candida* spp. en pacientes con diabetes mellitus.

Diabetes Mellitus	Portadoras de <i>Candida</i>					
	Positivo		Negativo		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
No	56	40.0	79	56.4	135	96.4
Si	3	2.1	2	1.4	5	3.6
Total	59	42.1	81	57.9	140	100.0

Prueba exacta de Fisher, $p = 0.35$

V.7 pH y *Candida* spp.

El pH es otro factor que contribuye a la presentación de *Candida*, se encontró que el mayor número de casos de portadoras de *Candida* fue en las mujeres con un pH de 4.5 a 5.5, con una disminución en las que tenían un pH > a 5.5 que además en su mayoría corresponden a las que han presentado la menopausia (Tabla X).

Tabla X. Relación entre portadoras de *Candida* spp. y pH vaginal

pH	Positivo		Negativo		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
4.0	0	0.0	1	0.7	1	0.7
4.5	20	14.3	24	17.1	44	31.4
5.0	8	5.7	16	11.4	24	17.1
5.5	12	8.6	18	12.9	30	21.4
>5.5	19	13.6	23	16.4	42	30.0
Total	59	42.1	81	57.9	140	100.0

V.8 Presentación de síntomas y portadoras de *Candida*.

En 79.7 % de las portadoras no se presentó ningún síntoma relativo a vulvovaginitis micótica, el 15.3 % presentaron al menos un síntoma y el 5.1 % restante dos síntomas entre prurito, ardor, dolor pélvico y dispareunia. El síntoma más común fue el prurito (Tabla XI). Por especie de *Candida* encontrada, solo se observaron síntomas en el 22.7 % de las portadoras de *C. albicans* y en una de *C. tropicalis* y una de *C. albicans* más *C. glabrata*.

Tabla XI. Aparición de síntomas en pacientes portadoras de *Candida* spp.

Síntomas	Portadoras de <i>Candida</i>					
	Positivo		Negativo		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
No	47	33.6	70	50.0	117	83.6
Uno	9	6.4	8	5.7	17	12.1
Dos	3	2.1	3	2.1	6	4.3
Total	59	42	81	58	140	100

V.9 Presentación de signos y portadoras de *Candida*.

La presentación de signos de infección en las pacientes con aislamientos positivos fue muy limitada. El 15.2 % de las portadoras de *Candida* mostraron una coloración hiperémica de la mucosa vaginal, el 3.4 % presentaron ulceraciones, y ninguna tuvo petequias. En cuanto a la secreción vaginal característica el 49.1 % presentaron exudado blanquecino y el 15.2 % de color amarillo. La presentación de signos fue más frecuente en el caso de aislamientos de *C. albicans*.

En lo referente al grado de inflamación se observó que el 5.1 % no mostraron ningún dato, mientras que el 64.4 % presentaban datos de inflamación leve, el 28.8% moderada y el 1.7 severa. (Figura 11). En todas las especies, el grado de inflamación presente fue leve, sin embargo, *C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada en la inflamación moderada y severa.

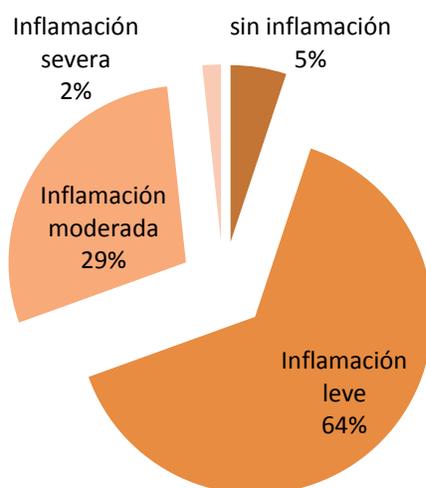


Figura 11. Distribución de las portadoras de *Candida* spp. de acuerdo al grado de inflamación del cervix, vagina y vulva.

V.10 Morfología de las diferentes especies.

Los organismos dentro del género *Candida* en general son dimórficos y es su fase micelial donde es patógeno. A través de la tinción de Grocott-Gromori (Figura 12) se encontró que de las cepas de *C. albicans* aisladas el 58 % tuvieron forma de blastoconidias, en 38.8 % se observaron células con forma de hifas y pseudohifas. Sin embargo no hubo diferencias en cuanto a la presentación de signos y síntomas y la morfología del organismo. Todos los aislamientos de *C. glabrata* y *C. tropicalis* tuvieron forma de blastoconidia (Tabla XII).

Tabla XII. Morfología de las cepas aisladas de *Candida* spp.

Forma	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>Candida</i> sp.		<i>C. albicans-C. glabrata</i>		<i>C. albicans-C. tropicalis</i>		<i>C. glabrata-Candida</i> sp.		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
No detectada	1	1.7													1	1.7
Blastospora	21	35.6	10	16.9	3	5.1	1	1.7	4	6.8	4	6.8	1	1.7	44	74.6
Hifa	10	16.9													10	16.9
ambas	4	6.8													4	6.8
Total	36	61.0	10	16.9	3	5.1	1	1.7	4	6.8	4	6.8	1	1.7	59	100.0

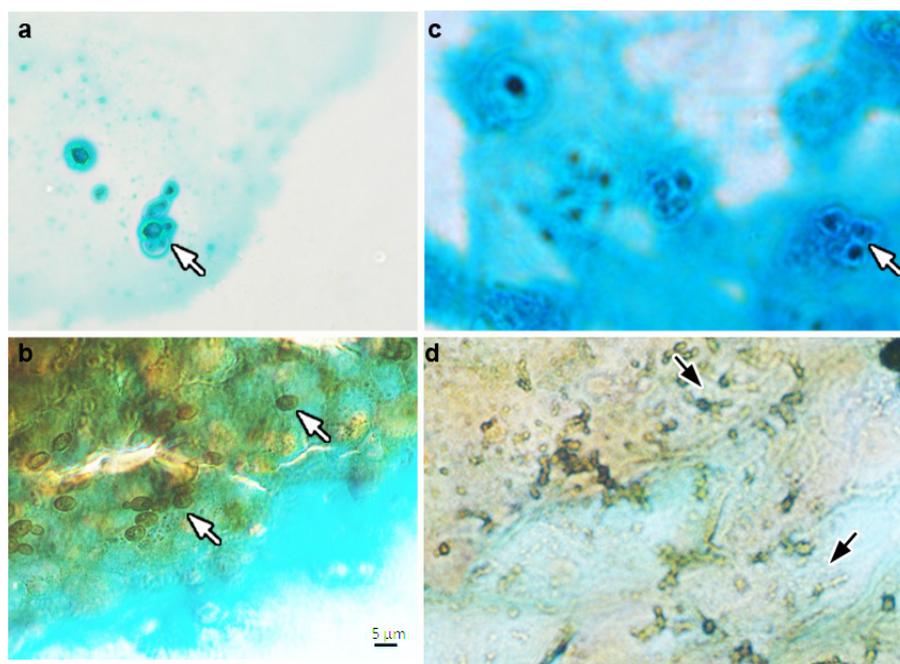


Figura 12. Imágenes de *Candida* (a) Control positivo de *C. albicans* (ATCC 9028), (b) Blastoconidias de *C. glabrata*, (c) Blastoconidias de *C. albicans* (d) Hifas y pseudohifas de *C. albicans*. Las flechas blancas señalan blastoconidias y las flechas negras conidias germinadas. Las células fueron teñidas con la técnica de Grocott-Gromori.

VI. Discusión

El estudio de la frecuencia de portadoras de *Candida* y su distribución por especie en pacientes gineco-obstétricas es un tema muy importante, ya que puede tener implicaciones en la atención a la salud de las mujeres y el control epidemiológico de los procesos patológicos. Entre el 15 y 19% de las vulvovaginitis en México son producidas por alguna especie de *Candida* (Flores-Paz *et al.*, 2003; González-Pedraza *et al.*, 2004; Rivera-Sánchez *et al.*, 2006). El potencial patogénico de *Candida*, así como la severidad y las recidivas depende de la especie que esté presente, y la diversidad de las especies tiene una gran variabilidad geográfica. En este trabajo se estudio la frecuencia de las diferentes especies de *Candida* en un grupo de mujeres en la Cd. de Ensenada que al estar situada cerca de la frontera la hace una población interesante.

En los últimos años se ha reportado un incremento de infecciones micóticas causadas por *C. albicans*, al igual que en otros reportes, en este estudio se observó que *C. albicans* (68%) fue la especie más frecuente en los aislamientos de exudado vaginal, en segundo lugar *C. glabrata* y en tercer lugar *C. tropicalis*. Estos hallazgos son similares a los encontrados en otros estudios en la Ciudad de México, Brasil y Argentina (Sobel *et al.*, 1993; González-Pedraza *et al.*, 1998; Velegraki y Logotheti, 1998; Posteraro *et al.*, 1999; Buscemi *et al.*, 2004; Buitrón García, *et al.*, 2007). En Italia, estas tres especies también son las más frecuentes, sin embargo la proporción de *C. albicans* es mayor (77%).

El segundo lugar encontrado en la población de pacientes gineco-obstétricas en Ensenada, B. C., fue *C. glabrata*, en un estudio retrospectivo en el Hospital Juárez se observó una frecuencia similar (Rivera-Sánchez *et al.*, 2006) así como en otras población en México (Buitrón-García *et al.*, 2002; Buitrón García, *et al.*, 2007). Sin embargo, en Venezuela, *C. tropicalis* fue la segunda especie más frecuente, que en este estudio obtuvo el tercer lugar en frecuencia. En Italia, este lugar lo ocupa *C. krusei* (Sobel *et al.*, 1993), en Argentina *C. parapsilosis*. Y en otros países, después de *C. albicans* se han aislado *C. kefyr*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*. En Ensenda, incluyendo pacientes originales de otras regiones, estas cinco especies no fueron encontradas en este estudio realizado.

Un hallazgo interesante del que no se tienen antecedentes, son los aislamientos en los que se encontraron dos especies de *Candida* simultáneamente. En 15.2 % de las portadoras se aisló DNA de dos tipos de levaduras. En este grupo, *C. albicans* también fue la más frecuente (8/9), la mitad asociadas a *C. glabrata* y la otra a *C. tropicalis*, también hubo un caso de asociación *C. glabrata* + *C. tropicalis*.

Las diferencias encontradas en los diferentes países, hacen evidente la importancia de que cada lugar conozca la diversidad de especies en las habitantes del lugar, para poder ofrecerles un diagnóstico y un tratamiento más preciso. Una recomendación para los médicos que tratan mujeres con vulvovaginitis micótica es que el diagnóstico lo hagan a nivel de especie para poder proponer un tratamiento más efectivo. En este estudio, distrae la rareza de síntomas de pacientes relacionados con *C. albicans*.

En este sentido cabe señalar que los métodos para el aislamiento y la tipificación de *Candida* son muy importantes. En este estudio se ha hecho evidente la ineficiencia de los métodos microbiológicos convencionales como los medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Candida*. Las técnicas

moleculares mostraron una alta sensibilidad y especificidad por lo que sería recomendable el desarrollo de técnicas simples al alcance de los médicos tratantes para que lleguen como se mencionó en el párrafo anterior a un diagnóstico de especie.

Otro aspecto importante fue que un alto porcentaje de mujeres (~80 %) portadoras de *Candida* resultaron ser asintomáticas, a diferencia de otros estudios en el que se observó que el crecimiento de *Candida* fue más abundante en las muestras de pacientes sintomáticas (Rivera-Sánchez *et al.*, 2006). Por otro lado, alrededor del 70 % de las portadoras de las diferentes especies de *Candida* mostraron datos clínicos de afección a la exploración física, aunque en su mayoría en forma leve o moderada. Los datos clínicos más contundentes para la presencia de *Candida* fueron, secreción blanquecina e inflamación. Sin embargo, al igual que en otros estudios, no hubo una sintomatología o presencia de signos en alguna especie en particular, las características clínicas causada por *C. glabrata* o por *C. tropicalis* no difiere sustancialmente de la ocasionada por *C. albicans* (Rivera-Sánchez *et al.*, 2006). Aunque en este estudio se encontró prácticamente una ausencia de síntomas pero no así de signos, en otros trabajos han encontrado que en pacientes con signos y síntomas similares a los de candidiasis vulvovaginal, no se comprobó la presencia de hongos ya sea por cultivo u observación directa (Novikova *et al.*, 2002; Sobel, 2003; Demirezen y Beksac, 2004; Buitrón García, *et al.*, 2007).

De los factores predisponentes estudiados, el pH vaginal, influyó en la frecuencia de portadoras. Así como el uso de anticonceptivos, donde las usuarias de métodos locales tuvieron mayor índice de aislamientos de *Candida* (Foxman, 1990; Fernández-Cid y Fernández-Cid 2004). Aunque no es concluyente la Diabetes mellitus también fue un factor que podía influir en la presencia de *Candida*.

De los factores que disminuyen el número de aislamientos esta la menopausia que está ligado al pH vaginal, mientras más alto sea menos probabilidades tiene este organismo de sobrevivir en este hábitat.

La mayoría de las especies del género *Candida* se transforman en blastoconidias, pseudohifas o hifas verdaderas, consideradas estas últimas como las fases infectantes del organismo; en este estudio se observó la fase micelial solo en 38.8 % de los aislamientos de *C. albicans* a diferencia de lo encontrado en otros trabajos (Buitrón García, *et al.*, 2007) donde la observación de estas formas de *Candida* han confirmado la infección. *C. glabrata* es la única especie que no germina, en este trabajo se confirmó este hecho dado que solo se observó en estadio de blastoconidia.

VII. Conclusiones

- El 42.1 % de las pacientes gineco-obstétricas evaluadas fueron portadoras de alguna especie de *Candida*.
- En el 40 % de los casos el cultivo con medios selectivos es ineficiente, debido a que tiene un alto número de falsos positivos. Sin embargo, no hubo ningún caso de falso negativo.
- La especie más frecuentemente aislada en las pacientes gineco-obstétricas fue *C. albicans*, en segundo lugar *C. glabrata* y finalmente *C. tropicalis*.
- Se encontraron especies que no fueron posibles de identificar.
- En el 15.2 % de mujeres co-existieron dos especies de *Candida*.
- En el 10 % de los casos, la identificación por especie por PCR-RFLP no fue posible por lo cual se tuvo que recurrir a secuenciación de la región ITS1-4.
- Cerca del 80% de las pacientes son portadoras asintomáticas y casi todas las sintomáticas son portadoras de *C. albicans*.
- El color blanquecino de la secreción y el grado de inflamación del epitelio cervical y vaginal son los datos clínicos que con mayor frecuencia se presentan en las portadoras de *Candida spp.*
- La menopausia parece ser un factor que protege para portar *Candida spp.*

- El uso de métodos anticonceptivos, en particular los locales como el condón parece aumentar el riesgo de ser portadora de *Candida* spp.

VIII. Bibliografía

- Ainsworth G. C.** 1986. History of medical and veterinary mycology. Cambridge University Press, Cambridge; 43–47p.
- Arenas R.** 2008. Micología Médica Ilustrada. Mc Graw Hill, 3a. ed. 218-222p.
- Barbone F., Austin H., Louv W. C., Alexander W. J.** 1990. A follow-up study of methods of contraception, sexual activity, and rates of trichomoniasis, candidiasis, and bacterial vaginosis. American Journal of Obstetric & Gynecology. 163(2):510-514p.
- Berbee M.L., Taylor J.W.** 2001. Systematics and evolution. In The Mycota VIIB (McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. and Lemke, P.A., eds.), Springer 229–245p.
- Bonifaz A.** 2000. Micología Médica Básica. Méndez Editores.
- Braun H., Vera C., Belmar C., Carvajal J. A.** 2003. Consecuencias Perinatales de la Infección Intrauterina por *Candida*. Revista chilena de obstetricia y ginecología. 68(4):343-348.
- Brooks G. F., Butel J. S., Ornston L. N., Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A.** 2005. Microbiología Médica. Ed. Manual Moderno, 18a. ed.
- Buitrón García R., Bonifaz A., Amancio-Chassin O., Basurto-Kuba E., Araiza J., Romero-Cabello R.** 2007. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. Ginecología y Obstetricia de México, 75:68-72p.
- Buitrón-García R., Romero-Cabello R. Cruz-Talonia F.; Bonifaz A., Zarama Marquez F.** 2002. Estudio de especies de *Candida* no *albicans* y su relación con candidiasis vulvovaginal recurrente. Ginecología y Obstetricia de México 70:431-436p.

- Buscemi L., Arechavala A., Negroni R.** 2004. Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the San Francisco J. Muñiz Infectious Diseases Hospital. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21:177-181p.
- Bustos B. R., Copaja L. D, Bancalari M. A.** 2003. Candidiasis congénita en un recién nacido de muy bajo peso. *Revista chilena de pediatría* 74(2):193-196p.
- Calderone R. A., Braun P. C.** 1991. Adherence and receptor relationships in *C. albicans*. *Microbiological Reviews*, 55:1-20p.
- Calderone R. A.** 2002. *Candida* and Candidiasis. Ed. American Society for Microbiology, Washington, 472pp .
- Cantú-Garza P. J, Gutiérrez-Alejo G. B., Levi-Flores A. D., Núñez-Rodríguez V., García-Tovar L. E.** 2006. Frecuencia de colonización vaginal por *Candida albicans* en mujeres embarazadas y sexualmente activas. *Medigraphic Literatura Biomédica*. 31: 93p.
- Carr P. L., Felsenstein D, Friedman R. H.** 1998. Evaluation and management of vaginitis. *Journal of General Internal Medicine* 13(5): 335-346p.
- Carrillo-Muñoz A. J., Tur-Tur C.** 2000. Micosis superficiales y *Candida* spp. [Revisiones clínicas y estudios terapéuticos]. *Actualidad Dermatológica*, 463-472p.
- Casadevall A., Pirofski L-A.** 1999. Host-pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and Immunity*. 67(8): 3703-3713p.
- Castillón L., Palma R. A., Padilla D.** 2005. Factores de Virulencia en *Candida* spp. *Dermatología revista Mexicana*. 49: 12-27p.
- Chandra J.** 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*. 183(18): 5385-5394p.
- Chibana H., Oka N., Nakayama H., Aoyama T., Magee B. B., Magee P. T. Mikami Y.** 2005. Sequence Finishing and Gene Mapping for *Candida albicans* Chromosome 7 and Syntenic Analysis Against the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Genetics Society of America*. 170: 1525-1537.

- Colombo A. Nucci M., Park B. J., Nouér S. A., Arthington-Skaggs B., da Matta D. A., Warnock D., Morgan J.** 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(8): 2816-2823.
- Cotch M., Hillier Sh., Gibbs R., Eschenbach D.** 1998. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 178(2): 374-380P.
- Cutler, J. E.** 1991. Putative Virulence Factors of *Candida albicans*. *Annual Reviews Microbiology*. 1 (45): 18-218p.
- Demirenzen S., Beksac M. S.** 2004. Relationship between the morphology of *Candida* cell and vaginal discharge. *New Microbiology* 27: 173-176p.
- Dobler-López I. F.** 2001. Aspectos legales y éticos del Consentimiento Informado en la atención médica en México. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 3-6p.
- Dujon B., 1992. Altogether now - sequencing the yeast genome. *Current biology*, 2(6): 279-281p.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., de Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J-M., Beyne E., Bleykasten C., Boisramé A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., de Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J. M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G. F., Straub M. L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wésolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet J. L.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 430: 35-44p.
- Eckert L. O., Hawes S. E., Stevens C. E., Koutsky L. A., Eschenbach D. A., Holmes K. K.** 1998. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstetrics & Gynecology* 92(5): 757-765p.

- Edmond, M. B., Wallace S. E., McClish D. K., Pfaller M. A., Jones R. N., Wenzel R. P.** 1999. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 29: 239-244p.
- Egan M. E., Lipsky M. S.** 2000. Diagnosis of Vaginitis. Ed. [American Family Physician](#). 1095-1108p.
- Elie C. M., Lott T. J., Reiss E., Morrison C. J.** 1998. Rapid Identification of *Candida* Species with Species-Specific DNA Probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(11): 3260-3265p.
- Ernst, J.**, 2000. Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology*. 146(2000): 1763-1774p.
- Eschenbach D. A., Hillier S. L.** 1989. Advances in diagnostic testing for vaginitis and cervicitis. *The Journal of Reproductive Medicine*, 34(8): 555-565p.
- Fernández M. L., Lombardía J.** 2002. Vulvovaginitis y cervicitis en la práctica diaria. *SEMERGEN*, 28(1): 15-20p.
- Fernández-Cid A., Fernández-Cid M.** 2004. El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 5(2): 75-80p.
- Fidel Jr. P. L., Vázquez J. A., Sobel J. D.** 1999. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 80-96p.
- Fidel P.L. Jr.** 1999. **Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site-specific differences.** *Revista Iberoamericana de Micología*, 16(1): 8-15p.
- Fitch, W. M., Margoliash E.** 1967. Construction of Phylogenetic Trees. A method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science*. 146(3): 279-284p.
- Flores-Paz R, Rivera-Sánchez R, García-Jiménez E, Arriaga-Alba M.** 2003. Etiología de la Infección Cérvico Vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud Pública México*. 45(5): 694-697p.

- Foxman B.** 1990. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: risk factors. *American Journal of Public Health*; 80(3): 329-331p.
- García J. F., Schneider J., Pontón J.** 1994. Vulvovaginitis candidiásica. *Medicina Clínica (Barc)*; 19: 505-508p.
- González-Pedraza, Avilez A, Mota-Vázquez R, Ortiz-Zaragoza C, Ponce-Rosas E. R.** 2004. Factores de riesgo asociados a vaginosis bacteriana. *Atención Primaria*. 34: 360-365p.
- González-Pedraza, Avilez A, Ortiz-Zaragoza C, Inzunza-Montiel AE, Ponce-Rosas E. R.** 1998. Candidiasis vaginal: diagnóstico y tratamiento en una clínica de atención primaria. *Atención Primaria*. 21: 395-398p.
- Gow N.** 2002. *Candida albicans* – a fungal Dr Jekyll and Mr Hyde. *Mycologist*, 16(1): 33-35p.
- Greenspan D., Agabian N., and Challacombe S. J.** 2003. Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(3): 469-479p.
- Hawksworth D. L.** 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432p.
- Hazen K. C.** 1995. New and Emerging Yeast Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 8(4): 462-478p.
- Horowitz B. J. Giaquinta D., Ito S.** 1992. Evolving pathogens in vulvovaginal candidiasis: implications for patient care. *The Journal of Clinical Pharmacology* 32(3): 248-255p.
- Horowitz B. J.** 1991. Mycotic vulvovaginitis: A broad overview. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 165(2): 188-892p.
- Howard L. K.** 1991. Epidemiology of vaginitis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 165(4):168-176p.
- Hull C. M., Raisner R. M., Johnson, A. D.** 2000. Evidence of mating of the “asexual” yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, 289(5477): 307-310p.

- Jones T., Federspiel N. A., Chibana H., Dungan J, Kalman S, Magee B. B., Newport G., Thorstenson Y. R., Agabian N, Magee P. T., Davis R. W., Scherer S.** 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 7329-7334p.
- Kent H. L.** 1991. Epidemiology of vaginitis. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 165(4): 1168-1176p.
- Koszul R,** Malpertuy A, Frangeul L, Bouchier C. P. 2003. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*. Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters, 534(1): 39-48p.
- Levitz S. M.** 1992, Overview of host defenses in fungal infections. Clinical Infectious Diseases, 14(1): 37-42p.
- Lincoln R. J., Boxshall G. A., Clark P. F.** 2009. Diccionario de Ecología, Evolución y Taxonomía. Ed. Fondo de Cultura Económica, 2ª ed. en inglés 1998, 2ª ed. en español. 676pp.
- Liu H.,** 2001. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. Current Opinion in Microbiology, 4: 728–735p.
- Llovera V., Perurena M.,** 2004. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. Revista Cubana de Medicina Tropical. 56(1): 21-25p.
- López-Martínez R., Méndez-Tovar L. J., Hernández-Hernández F., Castañón-Olivares R.** 2004. Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Ed. Trillas. 192pp.
- Lutzoni F, Kauff F., Cox C.J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M, Hibbett D., James T. Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold A.E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G. H., Lücking R., Lumbsch T, O'Donnell K., Binder M, Diederich P, Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R. C., Hosaka K, Lim YW, Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R.** 2004. Assembling the Fungal Tree of Life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. American Journal of Botany. 91: 1446-1480p.

- Macher A. M.** 1988. The pathology of AIDS. Public Health Report. 6(2): 246-250p.
- Magee B. B., Magee P. T.** 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. Science, 289(5477): 310-313p.
- Martens M. G.** 1990. Office diagnosis of sexually transmitted diseases. Obstetrics & Gynecology Clinics of North America, 16(3): 573-602p.
- Mc Clary**, 1952. Annals of the Missouri Botanical Garden. Ver. 39.
- Méndez-Tovar L. J. López-Martínez R.** 2009. Antecedentes de la micología médica, <http://www.asociacionmexicanademycologiamedica.com.mx>
- Mirhendi S. H., Kordbacheh P., Kazemi B., Samiei S., Pezeshki M., Khorramizadeh M. R.** 2001, A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani*. Iranian Journal of Public Health, 30(3, 4): 103-106p.
- Mirhendi H., Makimura K., Khoramizadeh M. and Yamaguchi H.** 2006, A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Japanese Journal of Medical Mycology, 47: 225-229p.
- Murta E. F., Perfeito P., Oliveira T. M., Michelin M. A., Maluf P.** 2008. Relation between vaginal and endocervical pH patients undergoing cold-knife conization and hysterectomy. Archives of gynecology and obstetrics, 277(1): 43-46p.
- Naglik J. R., Rodgers C. A., Shirlaw P. J., Dobbie J. L., Fernandes-Naglik L. L., Greenspan D., Agabian N., Challacombe S. J.** 2003a, Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal. The Journal of Infectious Diseases, 188(3): 469-479p.
- Naglik J. R., Challacombe S. J., Hube B.** 2003b, *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73(5): 400-428p.
- Novikova N., Yassievich E., Mardh P. A.** 2002. Microscopy of stained smears of vaginal secretion in the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis. International Journal of STD & AIDS 13: 318-22p.

- Odds F. C.**, 1988. Ecology and epidemiology of candidiasis, In *Candida and candidosis*. Ed. University Park Press, Baltimore. 89p.
- Oh W., Higgins R. D., Duara S., Poole K., Laptook A., Benjamin, Jr D. K., Stoll B. J., Fanaroff A. A., McDonald S. A., Goldberg R.** 2006. Neonatal Candidiasis Among Extremely Low Birth Weight Infants: Risk Factors, Mortality Rates, and Neurodevelopmental Outcomes at 18 to 22 Months. *Pediatrics*, 117(1): 84-92p.
- Owen M. K.** 2004. Management of Vaginitis. [*American Family Physician*](#), 70(11): 2125-2132p.
- P C Ng.** 1994. Systemic fungal infections in neonates. *Archives of Disease in Childhood*. 71(2): F130-F135.
- Posteraro B., Sanguinetti M., D'Amore G., Masucci L., Morace G., Fadda G.** 1999. Molecular and Epidemiological Characterization of Vaginal *Saccharomyces cerevisiae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7): 2230-2235p.
- Ramos A., Ruiz C. J.** 2000. Candidiasis, Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría, 6: 45-51p.
- Reef S., Lasker B. A., Butcher D. S., McNeil M. M., Pruitt R., Keyserling H., Jarvis W. R.** 1998. Nonperinatal Nosocomial Transmission of *C. albicans* in a Neonatal Intensive Care Unit: Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5): 1255-1259p.
- Rinaldi M. G.** 1993. Biology and pathogenicity of *Candida* species, *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Ed. Bodey G. P., Raven Press, New York, 1-20p.
- Rivera-Sánchez R., Flores-Paz R. Arriaga-Alba M.** 2006. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24(10): 634-636p.
- Ross P.**, 2007. *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5ª ed., Editorial Panamericana, 859-889p.

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5467p.
- Sobel J. D., Vázquez J., Lynch M., Meriwether C., Zervos M. J.** 1993. Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: Epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 16(1): 93-99p.
- Sobel J. D.** 1988. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 544: 547-557p.
- Sobel J. D.** 1990. Vaginal infections in adult women. *Medical Clinics of North America*, 74(6): 573-602p.
- Sobel J. D.** 1992. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 1: S148-S153p.
- Sobel J. D.** 1999. Vulvovaginitis in healthy women. *Comprehensive therapy*, 25(6-7): 335-346p.
- Sobel J. D.** 2003. Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Drugs*, 63:1059-1066p.
- Soll D. R.** 2007. Mating in *Candida albicans* and Related Species. *Biology of Fungal Cell*, 2^a edición, *The Mycota VIII*, 196-217p.
- Vazquez J.** 1991. Comparison of Restriction Enzyme Analysis and Pulsed-Field Gradient Gel Electrophoresis as Typing Systems for *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(5): 962-967p.
- Velegriaki A., Logotheti M.** 1998. Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 20: 239-241p.
- Villanueva-Reyes J., Arenas R.** 2007. Candidiasis Mucocutánea. Una revisión. *Revista Mexicana de Micología*. 25: 91-104p.

Direcciones de Internet

1. <http://www.broad.mit.edu/>
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=14005
4. <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>
5. <http://www.genolevures.org/yeastgenomes.html#1>

IX. Anexos

IX.1 Anexo A



Dependencia: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)

Sección: División de Biología Experimental y Aplicada.

Departamento de Microbiología

Km 107 Carretera Tijuana- Ensenada, Ensenada B.C

Hoja de Consentimiento Informado

Ensenada B. C. a de del 200

A quien corresponda:

Presente.

Declaro de forma libre y voluntaria sin existir ninguna presión física o moral sobre mi persona, que he comprendido las implicaciones que tiene el participar en el estudio de Epidemiología Molecular de *Candida* spp. en pacientes Gineco-Obstétricas que está realizándose en el CICESE. El procedimiento de toma de muestra de exudado no pone en riesgo mi salud y no tiene ningún costo. Todas mis dudas han sido aclaradas. Asimismo, declaro que he leído y comprendido totalmente el consentimiento y los espacios en blanco que han sido llenados antes de firmar.

Los datos recabados serán protegidos en cumplimiento del artículo décimo séptimo de los lineamientos generales de protección de datos personales, publicados en el Diario de la Federación, el 30 de septiembre del año 2005.

Autorizo que se me tome la muestra planeada (toma de muestra para exudado vaginal)

Nombre y firma

Testigo

Registro:

IX.2 Anexo B

Formato del Cuestionario

Epidemiología Molecular de *Candida* spp en pacientes Gineco-Obstétricas

Registro: _____

Fecha: _____

Nombre: _____ Edad: _____

Lugar de origen: _____

Tiempo de residencia en Ensenada: años meses días

Anticoncepción oral: No Si DIU: No Si otro: _____

FUM: ____/____/____

Embarazo: No Si Semanas de embarazo: _____

Diabetes mellitus No Si

Prurito

Dolor pélvico

Ardor

Dispauremia

Recurrencia (número al año): _____

pH vaginal: _____

Coloración de la mucosa: normal hiperémica

Secreción: No Si Color: blanco amarillo otro: _____

Edema: No Si + ++ +++

Ulceración: No Si

Petequias: No Si

* Grado del proceso infeccioso:

I	II	III	IV
---	----	-----	----

Aislamiento primario: Positivo Negativo

No de colonias aisladas: _____

2º. Aislamiento: _____

Extracción de DNA: _____

Amplificación: _____

Identificación molecular: *Candida* _____

Diferencia molecular de la especie por RFLP: No Si

Morfología microscópica: _____

Tinción con: _____

*Grado de proceso infeccioso

I	II	III	IV
Cervix	Cervix Vagina	Cervix Vagina Vulva	Cervix Vagina Vulva Perineo

IX.3 Anexo C

IX.3. 1 Medios de cultivo

IX.3.1 Medio utilizado en el aislamiento primario y conservación de diversos hongos patógenos. Sabouraud-agar

Compuesto	Cantidad
Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agar-agar	20 g
Agua destilada	aforar a 1000 ml

IX.3.2 Medio selectivo para levaduras (YPD)

Compuesto	Cantidad
Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Dextrosa	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	aforar a 1000 ml

Para medio líquido, no utilizar agar. La levadura permanece en su estado levaduriforme.

IX.3.4 Medio para inducir la filamentación de *Candida spp.* Agar- agua+ BSA

Compuesto	Cantidad
Dextrosa	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	aforar a 1000 ml

Una vez solidificado el agar; agregar BSA 1%, que se esteriliza por filtración.

IX.3.4 Medio de cultivo líquido nutritivo utilizado para el crecimiento de diversas bacterias. LB (Luria-Bertani).

Compuesto	Cantidad
Bacto-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	aforar a 1000 ml

Se ajusta el pH a 7, con 5N NaOH.

X. Glosario

Adaptación:

Proceso de modificación evolutiva cuyo resultado es una eficacia mayor de supervivencia y de la reproducción.

Blastoconidio:

Conidio holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en cadenas.

Cepa:

Población de grupo de individuos de una especie dentro de un área o volumen específico.

Consentimiento informado:

Acto mediante el cual se informa detalladamente al paciente sobre el padecimiento, los diversos procedimientos diagnósticos, terapéuticos, posibles complicaciones, secuelas o riesgos inherentes a ellos, a efecto de que decida o autorice los procedimientos médicos y de

investigación médica en forma consciente, libre y responsable.

Colonización:

Estado de interacción ente el huésped y el patógeno que conlleva una cantidad variable de daño mínimo a mayor dependiente de la respuesta inmune del huésped teniendo la capacidad de eliminar o de promover el desarrollo a otro estadio.

Cultivo axénico:

Cultivo que consiste en una sola especie microbiana. Cultivo puro. Los cultivos axénicos son muy raros en la naturaleza, por lo que se obtienen dentro de un laboratorio.

Diploide:

Dotación completa de material genético, que consta de pares de cromosomas, cada uno proveniente de un progenitor. La mayoría de las células animales,

excepto el gameto, tienen una dotación diploide de cromosomas

DNA:

Polímero largo lineal, compuesto de cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa, que es el portador de la información genética. En su estado nativo, el DNA es una doble hélice de dos hebras antiparalelas mantenidas juntas mediante enlaces de hidrógeno entre bases de purinas y pirimidinas complementarias.

DNA polimerasa:

Enzima que copia una hebra de DNA (hebra molde) para formar la hebra complementaria, que compone una nueva molécula de DNA de doble hebra. Todas la DNA polimerasas añaden desoxirribonucleótidos de a uno por vez en la dirección 5'-3' al extremo 3' de un oligonucleótido corto preexistente de DNA o RNA.

Electroforesis:

Cualquiera de diversas técnicas para la separación de macromoléculas basada en su migración en un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico.

Enzima de restricción:

Enzima que reconoce y fragmenta DNA de doble cadena en sitios específicos de la secuencia de DNA.

Enantema:

Erupción eritematosa en una superficie mucosa (interna).

Epidemiología:

Estudio de la distribución y determinantes de la salud y la enfermedad en poblaciones

Escamas lamerales:

Lesión dermatológica caracterizada por desprendimiento de piel o mucosas en forma de láminas.

Especie:

Grupo de organismos reconocido como distinto de otros grupos.

Evolución:

Cualquier cambio acumulativo en las características de los organismos o poblaciones que se da de generación en generación, descender o desarrollarse modificaciones.

Fenotipo:

Suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo; producto de la interacción entre el genotipo y el ambiente.

Frecuencia:

Número de repeticiones de cualquier fenómeno o suceso periódico en una unidad de tiempo.

Gen:

Unidad básica, tanto física como funcional, de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente

Genotipo:

Conjunto de alelos de un individuo que tiene un locus particular

Holoblástico:

Tipo de división celular en levaduras caracterizado por una separación o ruptura completa a partir de la célula en gemación.

Hospedero:

Es cualquier entidad en la cual un patógeno reside y se replica.

Incidencia:

Número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.

Infeción:

Colonización perjudicial de un organismo microbiológico al hospedero. En una infección, el organismo patógeno, interfiere con el funcionamiento normal del hospedero, provocando un daño.

Latencia:

Estado de interacción huésped-patógeno en el cual el microorganismo persiste en el huésped y puede asociarse con

daño leve celular o tisular pero no relacionado a enfermedad

Locus:

Cualquier punto o región del cromosoma (o gen)

Marcador:

Ubicación física identificable en un cromosoma, cuya herencia puede rastrearse (por ejemplo, un gen, un sitio de corte de una enzima de restricción o un marcador de RFLP).

Marcador genético:

Cualquier parte del genoma que es variable y que puede ser usado para comparar individuos

Oportunista:

Organismo que tiene la capacidad de explorar nuevos hábitats o recursos disponibles en situaciones fuera de lo habitual para su forma de vida.

Organismo Comensal:

Simbiosis en la que una especie se beneficia de una provisión común de recursos mientras que la otra especie no se ve afectada de manera inversa.

PCR:

Técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría

basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Petequias:

Lesión en piel o mucosas de origen vascular que se caracteriza por presentar una coloración de rojo-violáceo.

Patógeno:

Microorganismo capaz de causar daño a un huésped, y este puede resultar por acción directa del patógeno o de la respuesta inmune del huésped derivada de este.

Patogenicidad:

Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

Prevalencia:

Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un periodo de tiempo determinado

Pseudohifa:

Estructura filamentosa resultante del desarrollo de blastoconidios que permanecen unidas por sus extremos y que tiene la característica de que la separación de cada célula es completa no existe comunicación citoplasmática

Polimorfismo:

Aparición de diferentes formas asociadas con diversos alelos de un gen o con homólogos de un cromosoma

RFLP:

Técnica de biología molecular en la que la variación entre los individuos se detecta por la diferencia en los tamaños de los fragmentos de ADN después de la digestión con una enzima de restricción.

Tipificación:

Caracterización de organismos que comparten la misma constitución genética por lo que los agrupa en un taxón definido y son considerados los suficientemente distintos de otros grupos semejantes, para ser clasificados en una unidad separada.