TESIS DEFENDIDA POR
NAIDY ALEJANDRA PINONCELY DE GANTE
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Miembro del Comité

Dr. Axayacatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del programa de posgrado en Ciencias con orientación en Microbiología

Dr. David H. Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

29 de *noviembre* de 2010.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGIA

Prevalencia de la resistencia a antifúngicos y de mutaciones en genes asociados en especies de Candida aisladas de pacientes ginecológicas

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

NAIDY ALEJANDRA PINONCELY DE GANTE

Ensenada, Baja California, México, noviembre de 2010.

RESUMEN de la tesis de **NAIDY ALEJANDRA PINONCELY DE GANTE,** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en MICROBIOLOGIA. Ensenada, Baja California. Noviembre de 2010.

Prevalencia de la resistencia a antifúngicos y de mutaciones en genes asociados en especies de *Candida* aisladas de pacientes ginecológicas

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director de Tesis

La candidiasis vaginal ocupa el primer lugar de las consultas ginecológicas en México. El principal agente etiológico es *Candida albicans*, sin embargo en las últimas tres décadas se ha reportado un incremento de especies de *Candida* no albicans que son más resistentes a los tratamientos. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la prevalencia de la resistencia a antifúngicos de uso convencional en las diferentes especies del genero *Candida*, en aislamientos vaginales de pacientes ginecológicas y determinar la prevalencia de mutaciones en genes UPC2, TAC1, MRR1 y ERG3 asociados a la resistencia a antifúngicos. De las 47 muestras positivas, el 54% pertenecían a *C. albicans*, el 37% a *C. glabrata* y el 9% a *C. parapsilosis*. Del total de las muestras el 42.6% presentó una sensibilidad intermedia y un 42.6% una resistencia total a los azoles y el 95.7% fue sensible a la nistatina. La edad de las pacientes y el uso de métodos anticonceptivos locales fueron algunas características de las pacientes que se relacionaron con la presentación de cepas resistentes. La especie de *C. glabrata* fue la que tuvo un perfil de resistencia más alto al itraconazol y ketoconazol en el 94.1% de las muestras, al clotrimazol y fluconazol en el 82.4% y al miconazol en el 58.8%. *Candida albicans* presento índices de resistencia por arriba del 40% a todos los antifúngicos azólicos y fue la única especie qué presento resistencia a la nistatina. No se encontró diferencia en la frecuencia de presentación de las mutaciones en los genes UPC2, TAC1, y MRR1, y ERG3 en cepas sensibles y resistentes a los azoles y polieno estudiados. Ninguna de las mutaciones estudiadas predice la presencia de resistencia en las cepas de *Candida* incluidas.

Palabras Clave: Resistencia, antifúngicos, azoles, nistatina, Candida

ABSTRACT of the thesis presented by **NAIDY ALEJANDRA PINONCELY DE GANTE** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE in LIFE SCIENCES degree in Microbiology. Ensenada, Baja California, México November, 2010.

Prevalence of antifungal drug resistance and mutations in *Candida* species isolated from gynecological patients

Vaginal candidiasis are a very important health problem in México. *Candida* albicans is the most common etiological agent of vaginal mycosis, although in the last three decades, there has been an increase of non albicans species that show resistance to antifungal drugs. The aim of this work was to establish the prevalence of resistance to the most common antifungal drugs in *Candida* strains isolated from vaginal swabs of gynecological patients and also to find mutations in the genes UPC2, TAC1, MRR1 y ERG3 that are associated with antifungal resistance in *C. albicans*. We isolated 47 positive samples of *Candida* spp, 54% were *C. albicans*, 37% *C. glabrata*, and 9% *C. parapsilosis*. A 42.6% of strains presented an intermediate profile of sensibility to antifungal drugs and 42.6% showed total resistance. We found a 95.7% of sensibility to nistatin in all strains. The age of the patients and the use of local contraceptive methods were some of the factors that had a relationship with the presence of resistance in *Candida* strains. *C. glabrata* was the species with the highest resistance index, 94.1% to itraconazole and ketoconazole, 82.4% to clotrimazole and fluconazole, and 58.8% to miconazole and *C. albicans* had a resistance index higher to 40% to all azoles and was the only species that showed resistance to nistatin. We did not find a statistical significance in the correlation of the resistance with the presence of mutations in UPC2, TAC1, MRR1 and ERG3, indicating that those mutations cannot explain the resistance in *C. albicans* strains

Keywords: Resistance, antifungal drugs, azoles, nistatin, *Candida*.

Dedicatoria

A mi mamá y a mi papá….

A mi esposo…

A mis hermanos…

Y a mí sapito…

Agradecimientos

Muchas gracias a mi asesora la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez y al Dr. José Juan Godínez Montaño por haberme dado la oportunidad y confianza de pertenecer a su grupo de trabajo ¨las ardillas¨, por la paciencia, orientación, y el aprendizaje que me brindaron. Gracias, por su amistad y la dirección durante este trabajo.

A la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal, quien me brindó la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad Autónoma, por su asesoría y haberme ofrecido los recursos necesarios, tanto para mi desarrollo profesional como para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Rufina Hernández y al Dr. Axayacatl Rocha, quienes me supervisaron durante la realización de este proyecto brindándome su consejo.

A mis amigos y compañeros de trabajo ¨las ardillas¨: Diego Delgado, Ramón Echauri, Ariana Román, Isadora Clark, Rosa Angelina López, Rosa María Ramírez, Alejandra Flores. Gracias, por siempre brindarme su amistad, orientación y su apoyo incondicional.

A todos los doctores, técnicos, a mis demás compañeros y amigos del departamento de microbiología, que cada uno fue parte importante para la culminación de este proyecto.

En especial a la M. en C. Olga A. Callejas Negrete por su dedicación y enseñanza durante este trabajo.

Al M. en C. Efrén Robledo quien aportó información necesaria para la realización de este proyecto. A Eduardo, Laura y mis demás compañeros del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la haberme aceptado en la maestría y haberme dado la beca para finalizar mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de la maestría.

Muchas Gracias, a mis padres, Marcelo Pinoncely Proal y América De Gante Sánchez, quienes con su orientación y su amor incondicional, han sido los pilares más fuertes en todos los sentidos de mi formación. Gracias por su confianza en cada etapa de mi vida. Los amo.....

A mi esposo Gregorio Ramírez Gutiérrez, te amo. Gracias por tu apoyo, consejo, comprensión y por siempre impulsarme a seguir adelante.

A mis hermanos Ivette, Carlos, Lyanica, Marcelo y a mi sobrino Carlitos, por siempre estar pendientes y por comprender mi ausencia en momentos especiales. Al resto de mi familia, por confiar en mí.

A todos mis amigos, por siempre brindarme sus consejos y por compartir tantas experiencias juntos.

En especial a Ariana Román por haberme orientado a ingresar a la maestría, y porque, como parte de mi familia siempre está presente en los momentos más importantes y a Paula Nudelman por haberme abierto las puertas de su casa y por su gran amistad.

Contenido

Página

Dedicatoria ..... **v**

Agradecimientos ..... **vi**

Contenido ..... **viii**

Lista de Figuras ..... **xi**

Lista de Tablas ..... **xvi**

I. Introducción **1**

II. Antecedentes **3**

II.1 Micosis 3

II.2 Candidiasis 4

II.3 Agente causal y patogénesis 4

II.4 Manifestaciones clínicas 5

II.5 Epidemiología 7

II.6 Tratamiento 9

II.7 Resistencia al tratamiento 10

III. Justificación **17**

IV. Hipótesis **18**

V. Objetivos **19**

V.1 Objetivos Generales 19

V.2 Objetivos específicos 19

Contenido (continuación)

VI. Materiales y Métodos 20
VI.1 Población y ámbito de estudio. 20
VI.2 Diseño del estudio 20
VI.3 Características de la muestra 20
VI.4 Criterios de inclusión.....20
VI.5 Carta de consentimiento informado 21
VI.6 Variables de estudio 21
VI.7 Cepas, medios y condiciones de cultivo. 21
VI.8 Procesamiento de la muestra 22
VI.9 Diagnóstico molecular de las especies de *Candida*.....23
VI.9.2.2 PCR 25
VI.9.2.3 Identificación de especies de *Candida* por PCR-RFLP.....26
VI.10 Prueba de sensibilidad a antifúngicos.....27
VI.11 Identificación de Mutaciones.....28

VII. Resultados.....35
VII.1 Datos generales.....35
VII.2 Identificación de especies de *Candida* spp.....35
VII.3 Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. 36
VII.4 Edad y respuesta a antifúngicos.....43
VII.5 Sensibilidad a antifúngicos y anticonceptivos. 43
VII.6 Presentación de signos y síntomas 45
VII.8 Micosis activa y resistencia a antifúngicos.....51
VII.9 Especies de *Candida* y resistencia a antifúngicos 53
VII.10 Diagnóstico de mutaciones en genes de *C. albicans*.....55

Contenido (continuación)

VIII. Discusión 66

IX. Conclusiones.....73

X. Bibliografía 74

Lista de Figuras

		Página
1	*Esquema del DNA ribosomal, en guinda se muestra la subunidad 18S, en blanco la región interna espaciadora transcrita 1 (ITS1), en morado la subunidad 5.8S, ITS2 en blanco y en verde la subunidad 25S. Las flechas y los recuadros en azul son las regiones donde se alinean los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4, y en naranja es el fragmento que amplifican estos oligonucleótidos.*	25
2	*Esquema del principio de la Tecnología ARMS. Donde en la figura superior se observa un oligonucleótido diseñado para detectar una mutación en el 3´terminal y en la figura inferior un oligonucleótido normal 3´complementario a la secuencia de DNA normal. Se agrega una base que no se aparea en la penúltima posición tanto en el oligonucleótido normal como en el mutante, para que cuando el oligonucleótido mutante se hibride con la secuencia mutante se de una correcta amplificación, pero sucederá lo contrario con el oligonucleótido normal al hibridarse con la secuencia de DNA mutante, no funcionara correctamente para la amplificación.*	29
3	Principio para el diagnóstico de las mutaciones en N977D en el gen TAC1 y G648D en UPC2. En el recuadro inferior derecho se pueden observar los patrones de bandeo que se pueden obtener.	32
4	*Principio para el diagnóstico de las mutaciones D19E y G977V de Erg3p y Mrr1p respectivamente. Pr_F y Pr_R son los cebadores que en par amplifican un fragmento control, Pr_F y Pr_NR amplifican un fragmento del gen de menor tamaño que el control, cuando no se encuentra la mutación que se está buscando, Pr_ y Pr_R amplifican en presencia de la mutación. En los recuadros azules se muestran los diferentes patrones de bandeo que se pueden identificar en un organismo diploide como C. albicans.*	34

Lista de Figuras (continuación)

5	*Electroforesis de los PCR-RFLPs, realizados de la digestión con MspI de la amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Se identificaron 3 patrones. A) Una banda de 520 pb correspondiente a C. parapsilosis, B) Una banda de 297 pb y otra de 238 pb correspondiente a C. albicans y C) Una banda de 557 pb y la otra de 314 pb correspondiente a C. glabrata. Las etiquetas de las columnas corresponden al número de identificación de las muestras.*	36
6	*Distribución de especies de Candida identificadas mediante PCR-RFLP, en una muestra de pacientes gineco-obstétricas del Hospital General de Ensenada.*	36
7	*Ensayos de difusión de antifúngicos con tabletas Neo-Sensitab, La primera línea de cajas de Petri presenta la prueba de sensibilidad realizada a una cepa de C. glabrata, y la segunda línea a una cepa de C. albicans. Las leyendas en los discos corresponden a: ITRAC=itraconazol, MICOZ=miconazol, CTRIM=clotrimazol, KETOC=ketoconazol, FLUCZ=fluconazol, NYSTA=nistatina. Las flechas rojas muestran los halos de inhibición.*	37
8	*Distribución de la respuesta a fármacos antifúngicos agrupados por modo de acción.*	38
9	*Distribución de la respuesta individual a cada fármaco antifúngico utilizado.*	39
10	*Distribución de la respuesta individual a cada fármaco antifúngico utilizado.*	40
11	*Distribución de la respuesta individual a los azoles utilizados agrupados en Imidazoles y Triazoles.*	41
12	*Porcentaje de cepas que fueron resistentes de 0 a 5 fármacos simultáneamente, A. Considerando sólo azoles y B. Considerando azoles y polieno.*	42
13	*Distribución de la respuesta a antifúngicos en relación al uso de métodos anticonceptivos pacientes gineco-obstétricas.*	44

Lista de Figuras (continuación)

14 *Distribución de la respuesta a antifúngicos por cada fármaco utilizado, en relación al uso de métodos anticonceptivos en pacientes gineco-obstétricas.* 45

15 *Distribución de la respuesta a antifúngicos en relación a la presentación de sintomatología asociada a CV en pacientes gineco-obstétricas.* 46

16 *Distribución de la respuesta a antifúngicos por fármaco probado en relación a la presentación de sintomatología asociada a CV en pacientes gineco-obstétricas.* 47

17 *Distribución de la resistencia a antifúngicos en relación con la presentación de signos de CV en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas.* 48

18 *Distribución de la resistencia a cada uno de los antifúngicos en relación con la presencia de signos en las pacientes gineco-obstétricas.* 49

19 *Distribución de la respuesta a antifúngicos en relación la presentación de recurrencia de CV en pacientes gineco-obstétricas.* 50

20 *Distribución de la respuesta a antifúngicos por fármaco probado en relación a la presentación de CV recurrente en pacientes gineco-obstétricas.* 51

21 *Distribución de la respuesta a los antifúngicos azólicos y polienos, en relación con el diagnóstico clínico de CV.* 52

22 *Distribución del diagnóstico clínico de CV y la respuesta a cada uno de los antifúngicos y la relación con el de las pacientes gineco-obstétricas.* 53

23 *Distribución de la respuesta a los dos tipos de antifúngicos probados en las diferentes especies de Candida aisladas de pacientes gineco-obstétricas* 54

Lista de Figuras (continuación)

24 *Distribución de la resistencia a cada uno de los antifúngicos en relación con las especies de Candida aisladas de pacientes ginecológicas. A. Muestra los datos sumando resistentes e intermedios. B. Muestra exclusivamente los datos de los resistentes.* 55

25 *Electroforesis de las amplificaciones que se utilizaron para el diagnóstico de la mutación G648D. En la parte superior se presentan los nombres de las cepas, la C es la amplificación de un fragmento de 752 pb del exón y se utiliza sólo como un control para corroborar la presencia de DNA, la columna indicada con Δ es la amplificación de un fragmento de 650 pb que amplifica solamente en el caso de que el gen presente la sustitución de las bases que confieran la mutación G648D.* 56

26 *Distribución de la sensibilidad a los dos diferentes antifúngicos en relación con el diagnóstico de la mutación G648D en las muestras aisladas de pacientes ginecológicas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de 650 pb.* 57

27 *Distribución de la sensibilidad a cada uno de los antifúngicos probados en relación con la detección de la mutación G648D en los aislados de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 650pb.* 58

28 *Electroforesis de las amplificaciones que se utilizan para el diagnóstico de la mutación N977D en Tac1p. En la parte superior de las figuras se presentan los nombres de las cepas, la C representa la amplificación de un fragmento de 585 pb del exón y se utiliza sólo como un control, las columnas indicadas con Δ son la amplificación de un fragmento de 424 pb que amplifica en el caso de que el gen cuente con la sustitución de las bases que confieren la mutación.* 59

29 *Distribución de la sensibilidad en los dos diferentes tipos de antifúngicos utilizados en relación con el diagnóstico de la mutación N977D en Tac1p en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 650 pb.* 60

Lista de Figuras (continuación)

30 *Distribución de la sensibilidad en los diferentes antifúngicos probados en relación con el diagnóstico de la mutación N977D en Tac 1p en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 424 pb.* 61

31 *Electroforesis que muestra las amplificaciones de los fragmentos de MDR1 llamados control (C) de 506 pb, normal de (N) 344 pb, y en el caso de presentar la mutación debería de haber amplificado una banda de (Δ) 212 pb. En la parte superior se encuentran los nombres de las cepas de las muestras obtenidas de las pacientes ginecológicas.* 62

32 *Electroforesis que muestra los fragmentos de ERG3. La amplificación de la columna C representa un fragmento control, La columna N es la amplificación de un fragmento sin la mutación y la columna Δ es el fragmento que amplifica la mutación D19E. Los números de las columnas son los nombres de las cepas de las muestras obtenidas de las pacientes ginecológicas.* 63

33 *Distribución de la sensibilidad a los dos tipos diferentes de antifúngicos probados en relación con el diagnóstico de la mutación D19E en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 485 pb.* 64

34 *Distribución de la sensibilidad a los diferentes de antifúngicos probados en relación con el diagnóstico de la mutación D19E en Erg3p en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 485 pb.* 65

Lista de Tablas

		Página
I	*Mutaciones puntuales en Tac1p.*	15
II	*Mutaciones reportadas en Mrr1p.*	15
III	*Cepas de Candida utilizadas en este trabajo.*	22
IV	*Oligonucleótidos diseñados para la identificación de hongos.*	24
V	*Tamaño de los productos amplificados con los oligonucleótidos ITS1-ITS4 en las diferentes especies de Candida.*	26
VI	*Tamaños de los fragmentos antes y después de la digestión con la enzima MspI*	26
VII	*Valores de referencia del diámetro de los halos de inhibición con los sensidiscos con antifúngicos.*	28
VIII	*Oligonucleótidos diseñados para la identificación de mutaciones en los genes Tac 1 y Upc2.*	30
IX	*Oligonucleótidos diseñados para la identificación de mutaciones en los genes Erg3 y Mrr1.*	31
X	*Promedio de edad de las pacientes de acuerdo a la respuesta in vitro a antifúngicos azólicos (media global 35.3 ± 9.9 años).*	43
XI	*Promedio de edad de las pacientes de acuerdo a la respuesta in vitro a Nistatina (media global 35.3 ± 9.9 años).*	43

I. Introducción

La candidiasis vaginal (CV) ocupa el primer lugar como motivo de consultas ginecológicas en México. Se ha reportado que tres cuartas partes de la población femenina en edad reproductiva presentan por lo menos un cuadro clínico de este padecimiento a lo largo de su vida, del 10% al 30% son portadoras asintomáticas y del 5% al 15% tienen CV recurrente (López-Martínez *et al*., 1984, Flores-Paz *et al*., 2003). El principal agente causal reportado a nivel mundial es *Candida albicans*, sin embargo debido a la introducción de nuevos fármacos antifúngicos se ha creado una presión de selección sobre este organismo, promoviendo la presencia de cepas resistentes y la emergencia de especies no albicans como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, etc. (Ventolini y Baggish, 2003, Sobel, 2007).

El incremento de cepas resistentes así como de especies no albicans, ha traído consigo el aumento de fallas terapéuticas, que incrementan los costos de atención a la salud y por otro lado impacta en la calidad de vida de las mujeres con CV (Jackson *et al*, 2005). Actualmente no hay datos concluyentes en México sobre la distribución de las especies causantes de CV y la prevalencia de la resistencia a antimicóticos. Por lo que consideramos conveniente llevar a cabo un estudio para establecer la prevalencia de la resistencia a los antifúngicos de uso convencional en aislados clínicos de diferentes especies del género *Candida* de pacientes gineco-obstétricas en la Ciudad de Ensenada, Baja California, así como establecer la relación entre la presentación de la resistencia y las características clínicas, microbiológicas y moleculares.

La información aquí presentada, servirá a los médicos tratantes para la selección de las mejores estrategias terapéuticas de acuerdo a las características de la paciente y del organismo que produce la CV.

II. Antecedentes

II.1 Micosis

Las enfermedades infecciosas causadas por hongos son conocidas como micosis, y se nombran de acuerdo al microorganismo causal (por ejemplo candidiasis) o de acuerdo al órgano o tejido que están afectando (por ejemplo onicomicosis). Hay micosis de origen endógeno, que son producidas por hongos que habitan como comensales en el hospedero hasta que ocurre un desequilibrio que permite al microorganismo volverse patógeno (ejem. una respuesta inmune debilitada, diabetes, etc.). También existen las micosis de origen exógeno, que son padecimientos causados por hongos que habitan fuera del organismo y en ocasiones se convierten en microorganismos infectantes (Arenas, 2008).

Otra clasificación de las micosis, incluye a hongos patógenos verdaderos, que son capaces de causar una micosis en una persona sana y los hongos oportunistas que requieren de un estado de inmunodepresión para ocasionar una infección. Además, con respecto a su localización, se pueden dividir en dos grandes grupos; las micosis superficiales y las micosis profundas. También se clasifican según la característica del cultivo, en hongos filamentosos, levaduras o dimórficos que incluye ambos estadios morfológicos (Arenas, 2008; Vargas, 2004). Las micosis con mayor índice de morbilidad y mortalidad son las causadas por *Candida* spp, *Aspergillus* spp, y *Cryptococcus* (Cowen, 2002; Villanueva-Reyes y Arenas, 2007; Marie y White, 2009).

II.2 Candidiasis

La candidiasis está considerada como una de las principales micosis en el humano, es causada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, que producen manifestaciones agudas, subagudas o crónicas. Las manifestaciones pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar tanto a la piel, como a las mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las candidiasis se clasifican en dos grupos, las candidiasis mucocutáneas y las sistémicas o profundas (Calvo, 2001; Carrillo-Muñoz y Tur-Tur, 2007; Buitrón-García *et al*., 2007; Arenas, 2008).

II.3 Agente causal y patogénesis

Las especies de *Candida*, están agrupadas dentro del Phyllum *Ascomycota*, Subphyllum *Saccharomycotina*, Orden *Saccharomycetales*, Clase *Saccharomycetes* Familia *Saccharomycetaceae* y Género *Candida* (James *et al*., 2006). *Candida* es un organismo dimórfico, porque presenta diferentes estadios morfológicos, como el de levaduras en el que mide de 3 a 6 µm de diámetro, el de pseudohifas que es cuando germinan las levaduras generando cadenas de células o pueden continuar elongandose hasta formar hifas verdaderas (Carrillo-Muñoz y Tur-Tur, 2007).

Se han identificado más de 200 especies de *Candida*, de las cuales la principal especie patógena es *C. albicans*, que se presenta en el 45 a 90% de los aislamientos, seguida de otras especies patógenas encontradas frecuentemente en el humano como, *C. glabrata, Candida krusei, Candida kefyr, Candida guillermondii, C. tropicalis, C. parapsilosis, Candida lusitaniae, Candida dublinensis*, entre otras. (Buitrón-García *et al*., 2007; Arenas, 2008).

Estos hongos se encuentran como saprobios en las mucosas y para que se conviertan en patógenos deben proliferar evadiendo los mecanismos de defensa propios del hospedero. La flora natural de estas mucosas antagoniza y suprime el

crecimiento de *Candida* e inhibe la adherencia de las levaduras al epitelio, evitando así la colonización y la invasión a los tejidos. La inmunidad celular protege al hospedero produciendo sustancias fungicidas y fagocitando levaduras. Sin embargo, *Candida* cuenta con diferentes mecanismos para colonizar al hospedero que tenga factores predisponentes.

Se han descrito un amplio repertorio de factores de virulencia que las especies de *Candida* utilizan para proliferar y producir infección como, la producción de adhesinas (le permiten adherirse a las superficies epiteliales), la morfogénesis (es el cambio de levadura a hifa o formación de pseudohifas en diferentes condiciones para la adaptación a diferentes ambientes), la producción de enzimas como aspartil-proteinasas y fosfolipasas (éstas facilitan la digestión de células, también sirven para defenderse de la respuesta inmune, para la obtención de nutrientes, para la adhesión y penetración a tejidos), y finalmente cambios en la expresión génica (que le permiten la adaptación a medios hostiles). El efecto que causan los factores de virulencia de *Candida* y la respuesta del hospedero a la colonización desmedida de este microorganismo producen las manifestaciones clínicas de la candidiasis (Noriega-Irondo *et al*., 2008).

II.4 Manifestaciones clínicas

Las candidiasis mucocutáneas; abarcan candidiasis cutáneas y candidiasis en mucosas (García, 2007). Dentro de las candidiasis mucocutáneas se encuentran: La candidiasis del pañal, foliculitis, onicomicosis, candidiasis oral, esofagitis y la CV (Calvo, 2001).

II.4.1 Candidiasis vaginal

La CV pertenece a las micosis mucocutáneas y es muy común en la consulta gineco-obstétrica de mujeres en edad reproductiva. Fue descrita por primera vez por Wilkinson en 1849; es considerada una enfermedad inflamatoria de la vagina ocasionada por diferentes especies del género *Candida*. Esta

manifestación se presenta secundariamente a condiciones fisiológicas alteradas: como cambios en la acidez normal de la vagina, desequilibrio hormonal, alteraciones en la inmunidad celular o humoral, cambios en la flora natural debido a antibioticoterapia y tratamiento con corticoesteroides, duchas vaginales, terapia de remplazo hormonal, entre otras. Para que se presenten las manifestaciones clínicas debe existir una alteración en la flora vaginal y/o una disminución en la inmunidad local que ocasiona un crecimiento desmedido de las especies de *Candida*. Lo anterior promueve la acción de la respuesta inmunológica del hospedero que a su vez producirá una reacción inflamatoria y secundariamente las manifestaciones habituales de este padecimiento (Fidel *et al*., 1999; García *et al*., 2006; Nabham, 2006; Pimentel-Sarzuri y Reynolds, 2007).

La CV se caracteriza por la presencia de flujo blanquecino espeso, abundante y grumoso, placas blanquecinas o pseudomembranosas con pústulas satélites, prurito (comezón) y disuria (dolor al orinar). Y como se mencionó anteriormente se puede presentar de manera asintomática en un 10 al 20% de los casos (Pimentel-Sarzuri y Reynolds, 2007; Buitrón-Garcia *et al.,* 2007).

En relación a la presentación clínica se clasifica en:

1. CV no complicada (80-90%); episodios esporádicos, con leucorrea moderada, y por lo general se relaciona a *C. albicans*.

2. CV complicada (10-20%); esta última a su vez se divide en:

3. CV severa.

4. CV recurrente (4 o más episodios en un año).

5. CV por especies de *Candida* no albicans (estas especies por lo general tienen concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) elevadas a los antifúngicos comerciales).

6. Resistencia a antifúngicos (se debe de sospechar en pacientes con CV recurrente que presenten fallas terapéuticas y persistan con la infección (Nabham, 2006; Ciudad-Reynaud, 2007).

II.5 Epidemiología

La candidiasis es una afección cosmopolita, que ha tenido un incremento en la prevalencia a través de los últimos 30 años. Del total de las micosis en humanos abarca el 7.4% y representa hasta un 25.0% de las micosis superficiales. Las especies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, habita de manera natural en la mucosa vaginal y gastrointestinal. Por eso se considera que la transmisión se da principalmente de manera endógena, aunque se ha demostrado la transmisión interpersonal (Guevara *et al*., 2000; Calvo, 2001; Arenas, 2008).

La CV en México ocupa el primer lugar de las vaginitis, con una prevalencia en los tres niveles de atención del 20 al 35% (González-Pedraza-Avilés *et al*., 1998; Flores-Paz *et al*., 2003). Se estima que tres de cada cuatro mujeres en edad reproductiva presentarán por lo menos un episodio de CV a lo largo de la vida (López-Martínez *et al*., 1984, Flores-Paz *et al*., 2003, Sobel, 2007). La CV recurrente se describe como la presencia de cuatro episodios en un año, se presenta del 20 al 50% de los casos, además el 10% de las mujeres en edad reproductiva puede cursar con un cuadro de CV de manera asintomática. (Fidel y Sobel, 1996; Sobel, 1997; Sobel, 1999; García *et al*., 2006; Martínez-Ojeda *et al*., 2007; Vermitsky *et al*., 2008; Ramírez y de la Torre, 2008).

Los factores predisponentes para la CV se dividen en (Hurley y Louvois, 1979; Faro *et al*., 1997; Vargas *et al*., 2004; Arenas, 2008; Noriega-Irondo *et al*., 2008):

1. Intrínsecos:

    a. Factores fisiológicos: edad, embarazo, ciclo hormonal.

b. Patologías: Cáncer, Alteraciones de la inmunidad celular y humoral, VIH/SIDA, Diabetes, Hipotiroidismo, Síndrome de mala absorción, malnutrición, etc.).

2. Extrínsecos:

a. Medicamentos: inmunodepresores, corticoesteroides, terapia de remplazo hormonal, anticonceptivos, antibióticos de amplio espectro.

b. Resistencia a antimicóticos.

c. Cirugías, trasplantes.

d. Estrés.

e. Utilización de ropa interior con poca ventilación.

f. Promiscuidad

El agente etiológico principal de CV es *C. albicans*, con una prevalencia cosmopolita entre un 40% hasta un 90% y de un 5% hasta un 60% es por especies de *Candida* no albicans como son *C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. kefyr, C. guillermondii, C. krusei* y *C. famata*. La distribución de estas especies varía dependiendo del lugar geográfico donde se han realizado las investigaciones, por ejemplo, González-Pedraza-Avilés y colaboradores en 1998 realizaron un estudio donde se tomaron muestras vaginales a 234 mujeres con diagnóstico de vaginitis, atendidas en el primer nivel de atención de la Unidad de Medicina Familiar en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se utilizaron ensayos microbiológicos e identificaron a *C. albicans* en un 60.4%, *C. glabrata* con el 26.5%, *C. famata* con el 5.9%, *C. tropicalis* con el 5.1%, y al restante 2% otras especies de *Candida*. En otro trabajo realizado en el Hospital Juárez de la Ciudad de México se obtuvieron 512 muestras de pacientes con sintomatología de CV y con diagnóstico microbiológico positivos para *Candida*

spp., el principal agente causal fue *C. albicans*, identificado en el 39% de los casos, seguido de *C. glabrata* en el 35.9% luego por *C. tropicalis* en el 16.2% (Rivera-Sánchez *et al*., 2006). Guevara y colaboradores en el 2000, estudiaron a 24 pacientes portadoras de *Candida* spp con vaginitis, al realizar los estudios microbiológicos correspondientes identificaron en primer lugar a *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, y por último *C. famata, C. krusei y C. glabrata.*

En otro estudio realizado en nuestro laboratorio por Arreola-Cruz en el 2009, Se encontró que el 42.1% de las pacientes ginecológicas de la ciudad de Ensenada, B.C. eran portadoras de alguna especie de *Candida*. Encontrándose con mayor frecuencia *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* y por último *C. tropicalis*.

II.6 Tratamiento

El tratamiento de la candidiasis está dirigido a tratar de cambiar los factores predisponentes en el hospedero y a erradicar o antagonizar el agente causal con el empleo de fármacos antifúngicos. Los agentes antifúngicos utilizados comúnmente en pacientes con CV, se dividen en dos grupos principales: azoles y polienos.

II.6.1 Azoles

Los antifúngicos azólicos son fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por tener un anillo imidazólico libre, unido mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. En relación al número de nitrógenos que contienen en el anillo imidazólico se dividen en imidazoles (con 2 nitrógenos) y triazoles (con 3 nitrógenos). El mecanismo de acción de los azoles, es que actúan sobre la membrana celular, al inhibir la enzima oxidativa asociada al citocromo P450 (14-alfa-desmetilasa o también llamada Erg11p), enzima responsable de la biosíntesis del ergosterol (componente predominante en la membrana celular). Uno de los nitrógenos libres en el anillo imidazólico se une al átomo de hierro del grupo hemo

(ubicado en el sitio de acción de la enzima), bloqueando la activación del oxígeno que es necesaria para la desmetilación del lanosterol (intermediario en la biosíntesis del ergosterol). Se cree que la posición que tiene el segundo nitrógeno al estar en contacto con la apoproteína de la enzima, determina la especificidad de los diferentes azoles por la enzima. La inactivación de la enzima Erg11p, resulta en la acumulación de 14 alfa-metil-esteroles estos son tóxicos en la membrana celular porque interfieren con las funciones del ergosterol, promoviendo la formación de una membrana anormal, situación que implica tanto la inhibición del crecimiento como de la replicación celular. Además, se observa que la acción de los azoles también genera alteraciones en la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Los imidazoles intervienen en la síntesis y la desoxificación del peróxido de hidrogeno (H_2O_2), esto causa la acumulación neta del H_2O_2 ocasionando lesiones en los organelos debido al estrés oxidativo. Entre los compuestos azólicos más utilizados en la actualidad destacan: los imidazoles (ketoconazol, miconazol y clotrimazol) y los triazoles (fluconazol e itraconazol) (Vanden Bossche, 1997; González-Pedraza-Avilés *et al*., 1998; White *et al*., 1998; Coste *et al*., 2007; Cowen, 2008).

II.6.2 Polienos

Los polienos se unen al ergosterol de la membrana plasmática fúngica, ocasionando poros hidrofóbicos en la membrana que alteran su permeabilidad, provocando la pérdida de los componentes citoplasmáticos y por ende la muerte celular. Los agentes polienos utilizados son la anfotericina B de uso sistémico y la nistatina que es tópica (Fernández-Alonso *et al*., 2005).

II.7 Resistencia al tratamiento

Debido a que los hongos son eucariotas, no hay una amplia gama de fármacos antifúngicos que se puedan utilizar para el tratamiento de la candidiasis, sin que exista una alteración o efecto tóxico en el hospedero. Desde su aparición, los antifúngicos se han utilizado de forma irracional, esto ha sometido a las

especies de *Candida* a una presión de selección que ha favorecido la emergencia de cepas resistentes.

La resistencia al tratamiento en las infecciones fúngicas, es diferente a la presentada en bacterias, porque en las bacterias los análisis de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) *in vitro* se relaciona con lo que sucede en la clínica, sin embargo en los hongos no siempre sucede así (Lupetti *et al*., 2002).

La resistencia a antifúngicos depende tanto de factores clínicos como de microbiológicos (Vanden-Bossche, 1997; Cowen *et al*., 2002). La resistencia clínica ocurre cuando una infección persiste a pesar de la administración de un antifúngico a dosis máximas. No obstante, el microorganismo responsable de la infección puede mostrar *in vitro* una sensibilidad normal al agente (Sanglard, 2002; Perlin, 2009).

La resistencia clínica es multifactorial porque involucra factores del hospedero, del hongo y del antifúngico. Los factores del hospedero son: inmunosupresión, sitio de la infección, severidad de la infección, presencia de materiales extraños y mal apego al tratamiento. Los factores del hongo son: CIM inicial, tipo de crecimiento del hongo (conidios, blastoconidios, levaduras o hifas), variabilidad genética, formación de biopelículas. Y por último se deben de tomar en cuenta los factores del antifúngico como: la capacidad del fármaco de inhibir el crecimiento o producir la muerte celular, la dosis, la farmacocinética y la interacción con otros medicamentos (White *et al*., 1998; Coste *et al*., 2007).

La resistencia microbiológica, se determina cuando la CIM de una cepa es más elevada que la habitual para esa especie. Hay tres tipos de resistencia microbiológica:

1. **Resistencia intrínseca:** ningún miembro de la especie es sensible al fármaco como la resistencia de *C. krusei* al fluconazol.

2. **Resistencia primaria:** es cuando una cepa de una especie que normalmente es sensible, muestra resistencia a un agente antifúngico sin haber tenido contacto previo con este compuesto. Se puede explicar por mutaciones puntuales que ocurren al azar. Un ejemplo de este tipo de resistencia es la reportada en *C. albicans* a la 5-fluorcitosina o *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* a la anfotericina B.

3. **Resistencia secundaria:** Se puede considerar la más interesante desde el punto de vista clínico, porque ocurre en una cepa previamente sensible que adquiere resistencia al fármaco después de haber estado en contacto con este compuesto, se puede deber a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria. Como es el caso de *C. albicans* a la 5-fluorcitosina y al fluconazol (Sanglard *et al*., 1995; White *et al*., 1998; Sanglard, 2002, Mellado *et a*l., 2002).

A pesar de que la resistencia a la anfotericina B es rara, existen reportes de casos de resistencia secundaria en *C. albicans*, y de resistencia primaria en *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* (Vanden Bossche, 1997; Sterling y Mertz, 1998).

Los primeros reportes de resistencia a los azoles fueron descritos por Holt y Azmi en 1978, quienes reportaron cepas del género *Candida* resistentes al miconazol. A partir de ese momento se han tratado de identificar los mecanismos involucrados en la resistencia a antifúngicos, entre los que se encuentran los siguientes (Tortorano *et al*., 2005):

1. **Desplazamiento de las especies de *Candida* endógenas por especies más patógenas y resistentes.** Debido a la poca diversidad de fármacos que existe para tratar las infecciones fúngicas, se ha utilizado indiscriminadamente la terapia con antifúngicos azólicos y polienos, situación que ha generado en las últimas décadas una colonización de especies menos susceptibles a estos fármacos como por ejemplo *C. glabrata* resistente a los triazoles (fluconazol),

además ha contribuido a la selección de subpoblaciones resistentes que antes eran susceptibles como es el caso de *C. albicans* (Perlin, 2009).

2. **Mutaciones en la enzima lanosterol desmetilasa (Erg11p).** Existen 21 mutaciones puntuales en la enzima reportadas hasta el momento, por ejemplo R467K (cambio de arginina por lisina en la posición 467) (White *et al*., 1998). Al parecer estas mutaciones confieren resistencia a los antifúngicos, porque implican una sustitución de aminoácidos ya sea en el sitio activo o en el sitio de reconocimiento de la enzima Erg11p por los azoles. (White *et al*., 1998; Favre *et al*., 1999; Sanglard *et al*., 2003; Marie y White, 2009).

3. **Mutaciones en la enzima Δ5, 6 desaturasa (Erg3).** Esta enzima es la responsable de la producción y acumulación de un precursor del ergosterol que es tóxico para las levaduras, es el 14α-metil-3-6-diol (intermediario en la biosíntesis de ergosterol), que en conjunto a la falta de ergosterol en la membrana causa la inhibición del crecimiento cuando existe la terapia antifúngica. Yan y colaboradores en 2008, reportaron la sustitución D19E (cambio de ácido aspártico por ácido glutámico en la posición 19) que es una mutación puntual en Erg3p, produce la inhibición de la enzima y confiere resistencia a los azoles en la cepa aislada, dando lugar a la acumulación de un esterol no tóxico para la célula, que es el 14α-metilfecosterol.

4. **Sobreexpresión del gen ERG11 y de otros genes involucrados en la biosíntesis del ergosterol.** Upc2p es un factor transcripcional involucrado en la regulación de la expresión de ERG11 y otros genes involucrados en la biosíntesis del ergosterol. Oliver en 2007 reportó la existencia del elemento CIS regulador en el promotor de ERG11, el cual es regulado por el factor de transcripción Upc2. Se cree que el factor transcripcional se autoactiva en respuesta a una disminución en la concentración de ergosterol en la membrana (efecto ocasionado por los azoles). Upc2 activado actúa en el elemento CIS de respuesta a azoles (Azole Response Element - ARE por sus siglas en inglés)

provocando la sobreexpresión de ERG11, como consiguiente un aumento en la biosíntesis de ergosterol para contrarrestar la acción de los azoles. El cambio del aminoácido glicina por aspartato en la posición 648 en Upc2p (G648D), esta reportada como una mutación puntual, adquirida durante la terapia con azoles y que ocasiona la sobreexpresión constitutiva de ERG11 y de otros genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol provocando cepas resistentes de *C. albicans* (Oliver *et al*., 2007; Dunkel *et al*., 2008; Znaidi *et al*., 2008)

5. **Reducción de la acumulación intracelular de los antifúngicos azólicos.** En las especies de *Candida*, una de las principales causas de resistencia a azoles es la sobreexpresión de los genes que codifican a los transportadores de unión a ATP (transportadores ABC; Cdr1p y Cdr2p) y los facilitadores principales o transportadores de múltiples fármacos (Mdr1p), estos transportadores tienen la función de exportar de la célula los fármacos que se encuentran en el citoplasma. Actualmente se han reportado los factores de transcripción relacionados con la sobreexpresión de estos transportadores (Sanglard *et al*., 1995).

    a. **Transportadores ABC**. Tac1p es un factor de transcripción que se une a un elemento CIS de respuesta a drogas (Drug Response Element - DRE por sus siglas en inglés) ubicado en el promotor de los genes CDR1 y CDR2. Tac1p se encuentra regulando la inducción de la expresión de estos genes. Se han reportado mutaciones puntuales en TAC1 (Tabla I) que ocasionan la sobreexpresión constitutiva de CDR1 y CDR2, esto ocasiona la exportación excesiva de los antifúngicos evitando que alcancen su sitio de acción (Coste *et al*., 2006; Yan *et al*., 2009).

Tabla I. *Mutaciones puntuales en Tac1p.*

Nombre	***Mutación***
N977D	Asparagina por ácido aspártico en la posición 977
N972D	Asparagina por ácido aspártico en la posición 972
G980E	Glicina por ácido glutámico en la posición 980
A736V	Alanina por valina en la posición 736
T225A	Treonina por alanina en la posición 225

b. **Transportadores de múltiples fármacos.** Mrr1p es un factor de transcripción que induce la expresión de los genes que codifican los transportadores principales (Mdr1p) en *Candida* spp. Se han identificado diferentes mutaciones puntuales (Tabla II) que están relacionadas con la resistencia a antifúngicos, debido a que ocasionan una sobreexpresión constitutiva del gen MDR1 en *Candida* (Harry *et al*., 2005; Morschhäuser *et al*., 2007; Dunkel *et al*., 2008; Schubert *et al*., 2008; Marie y White, 2009).

Tabla II. *Mutaciones reportadas en Mrr1p.*

Nombre	***Mutación***
K335N	Lisina por Asparagina en la posición 335
T360I	Treonina por isoleucina en la posición 360
P683S	Prolina por serina en la posición 683
P683H	Prolina por histidina en la posición 683
G878E	Glicina por ácido glutámico en la posición 893
W893R	Triptófano por arginina en la posición 893
G997V	Glicina por valina en la posición 997
Q350L	Glutamina por leucina en la posición 350
T381I	Treonina por isoleucina en la posición 381
N803D	Asparagina por ácido aspártico en la posición 803
R863T	Arginina por triptófano en la posición 863
A880E	Alanina por ácido glutámico en la posición 880
T896I	Treonina por isoleucina en la posición 896
L998F	Leucina por fenilalanina en la posición 998

c. **Pérdida de la penetración de la droga.** Debido a cambios en la permeabilidad en la membrana celular causada por alteración de los niveles de ergosterol, etanolamina y fosfatidilcolina.

6. **Producción de biopelículas.** Los biofilms o biopelículas son comunidades microbianas, bien estructuradas y embebidas en una matriz extracelular de sustancias producidas por las células que integran dicha comunidad. Están relacionadas a infecciones micóticas, por lo general cuando existen dispositivos médicos tales como catéteres venosos, sondas urinarias entre otros. Estas comunidades microbianas utilizan los siguientes mecanismos para evadir la acción de los antifúngicos azólicos y polienos: se ha descrito una disminución en la difusión de la droga al incrementar la producción de β-1,3 glucanos en la pared celular, estos compuestos se asocian al secuestro de fluconazol (Nett *et al*., 2007), fisiológicamente obstaculizan o disminuyen la velocidad de crecimiento, también activan y sobreproducen los transportadores que expulsan del citoplasma los fármacos (transportadores ABC y facilitadores principales), mediante la alteración de los esteroles en la membrana celular y también utilizan la expresión de patrones diferenciales en comparación con los que no se encuentran en las biopelículas (Cowen, 2008).

7. **Aneuploidía.** Ocasionado por el incremento del número de copias de un gen o por la duplicación de todo un cromosoma, también se debe a otros rearreglos cromosomales. Estas alteraciones se presentan en situaciones de estrés, por ejemplo, la administración continua de antifúngicos. Últimamente se ha identificado un isocromosoma asociado a la resistencia a azoles en *C. albicans*, esté consiste en dos brazos izquierdos del cromosoma 5 unidos cabeza con cabeza. La resistencia se debe a que en el cromosoma 5 se encuentran los genes que codifican a Tac1p y Erg11p (Marie y White, 2009).

III. Justificación

Existe un aumento en la incidencia de enfermedades por hongos y en particular de la CV por la especie *C. albicans* y de especies de *Candida* no albicans. Este padecimiento ocupa el primer lugar de las consultas ginecológicas en México, existe un número considerable de mujeres con recurrencias de este padecimiento y con fallas terapéuticas, sin embargo son pocos los estudios sobre este padecimiento en Ensenada, B.C como en el resto de México. Por lo que se hace necesario establecer las especies presentes en pacientes gineco-obstétricas y también cuantificar la tasa de resistencia a antimicóticos, así como relacionarlo con algunos factores del hospedero y del patógeno, para así poder ofrecer alternativas preventivas, diagnósticas y terapéuticas.

IV. Hipótesis

1. La prevalencia de la resistencia a antifúngicos en Ensenada B.C será igual o mayor que la referidas en otras regiones de México, debido a que la población en la zona fronteriza tiene características sociodemográficas muy particulares.

2. La prevalencia de mutaciones hiperactivas de los factores de transcripción Upc2p, Tac1p, Mrr1p, y en la enzima Erg3p, no determina la prevalencia de la resistencia *in vitro* a los antimicóticos. Porque la presencia o ausencia de estas mutaciones no determinan que *C. albicans* sea resistente.

V. Objetivos

V.1 Objetivos Generales

1. Determinar la prevalencia de resistencia a antifúngicos de uso convencional en las diferentes especies del género *Candida*, en aislamientos vaginales de pacientes ginecológicas de Ensenada, B. C.

2. Determinar la prevalencia de mutaciones en genes UPC2, TAC1, MRR1 y ERG3 asociados a la resistencia a antifúngicos.

V.2 Objetivos específicos

1. Identificar la distribución de las especies de *Candida* aisladas de muestras de exudado vaginal de pacientes gineco-obstétricas.

2. Describir la relación entre especies de *Candida* aisladas y la presencia de resistencia a antifúngicos.

3. Describir la distribución de la resistencia a antifúngicos de acuerdo a las variables clínicas de las pacientes.

4. Identificar la presencia de mutaciones específicas en los genes UPC2, TAC1, MRR1 y ERG3 en *C. albicans.*

VI. Materiales y Métodos

VI.1 Población y ámbito de estudio

El estudio fue realizado en Ensenada, Baja California, México, las muestras fueron recolectadas en la Clínica de Displasias del Hospital General de Ensenada (HGE), perteneciente al Instituto de Servicios de Salud del Estado de Baja California.

VI.2 Diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio observacional, transversal y prospectivo para determinar la prevalencia de la resistencia a antifúngicos en las diferentes especies de *Candida* y la presencia de mutaciones relacionadas con la resistencia a antifúngicos en *C. albicans*, de muestras recolectadas en la consulta ginecológica.

VI.3 Características de la muestra

Se entrevistaron y se tomaron muestras vaginales de 110 mujeres de las que se obtuvieron 35 muestras positivas a *Candida* spp, las muestras se tomaron de febrero a diciembre del 2009, y además se usaron 19 cepas pertenecientes al cepario de *Candida* spp del laboratorio de microbiología en el CICESE.

VI.4 Criterios de inclusión

En el estudio se incluyeron todas las pacientes con vida sexual activa que aceptaban participar voluntariamente en el estudio, después de firmar la carta de consentimiento informado, que tuviera diagnóstico molecular positivo a *Candida* spp.

VI.5 Carta de consentimiento informado

Cada paciente involucrada en este trabajo fue informada sobre los objetivos, el método de la toma de muestra, sobre su estado clínico y después de haber aclarado sus dudas, en el caso de que accedieran, se les dió a firmar un formato de consentimiento informado previamente evaluado y aprobado por un comité de bioética. Lo anterior como un derecho del paciente y un lineamiento de bioética y legalidad para la investigación científica en el área de salud humana (Dobler–López 2001). En este proyecto de investigación se han cumplido los lineamientos generales de protección de datos personales, que se publicaron en el Diario Oficial de la Federación en el artículo décimo séptimo en septiembre del 2005.

VI.6 Variables de estudio

Las variables a estudiar fueron del hospedero y el ambiente. Mediante un formato de recolección de datos, se obtuvo la siguiente información del hospedero: identificación, socio-demográfica, antecedentes patológicos, antecedentes hormonales en la fecha de la toma de muestra, farmacológicos, tipo de antifúngico previamente utilizado y signos y síntomas clínicos de la CV. Del patógeno, se identificaron las especies asociadas a CV y de los fármacos la prevalencia de resistencia a dos tipos de antifúngicos de los cuales se estudiaron 5 compuestos azólicos y 1 polieno, otra variable fue la identificación por métodos moleculares de 4 diferentes mutaciones previamente descritas asociadas a la resistencia a antifúngicos.

VI.7 Cepas, medios y condiciones de cultivo

Se utilizaron diversos medios de cultivo para levaduras, uno de los principales utilizado para realizar aislamientos secundarios fue un medio líquido que fue el YPD (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%), se incubaron a 37°C bajo agitación continua a 180 rpm durante 12 a 72 h. También

se utilizó este medio adicionado con 2% de agar, YPDA, para realizar los aislamientos primarios, que se incubaron a 37°C durante 24 hasta 72 h. Para los antifungigramas, se utilizó el Agar Mueller-Hinton (Extracto de carne 0.2%, caseína 1.75%, almidón 0.15%, Agar 1.7%).

Como controles para la identificación de las diversas especies de *Candida*, se utilizaron las cepas de referencia, amablemente donadas por el Dr. Héctor Manuel Mora Montes de la Universidad de Guanajuato, enlistadas en la tabla III.

Tabla III**. Cepas de Candida utilizadas en este trabajo.**

Especie	**Referencia**
C. albicans	ATCC90028
C. glabrata	ATCC 2001
C. tropicalis	MYA3404
C. parapsilosis	ATCC 96143

VI.8 Procesamiento de la muestra

Se recolectaron 110 muestras por el médico a cargo de la Clínica de Displasias, el Dr. José Juan Godínez Montaño. Se le pidió a la paciente que se colocara en posición ginecológica y posteriormente se colocó un espejo vaginal para visualizar el fondo de saco posterior y se realizó la toma de la muestra de exudado vaginal con dos hisopos estériles con punta de algodón y además se llevó a cabo la exploración física.

El primer hisopo se utilizó para realizar un estriado en una caja Petri con medio de cultivo YPDA y posteriormente el mismo hisopo se introdujo en un tubo Falcón de polipropileno de 15 ml que contenía 5 ml de medio YPD más glicerol al 2%. El segundo hisopo se utilizó para medir el pH vaginal, utilizando una tira reactiva con intervalos de detección de pH de 3.0 a 5.5 (pHydrion papers ®).

El procesamiento posterior de las muestras se realizó en el laboratorio de microbiología en el CICESE. La inoculación inicial, que se realizó en medio YPDA fue considerado el aislamiento primario, las cajas de Petri fueron incubadas a 37°C durante 24 a 48 h, en caso necesario se incubaron hasta 7 d, posterior a la toma de muestra. Para la obtención de un cultivo axénico y monoespecífico, se tomó una azada de una colonia individual del aislamiento primario y se reinoculó en medio YPDA incubándolo a 37°C durante 24 a 72 h.

Para realizar la extracción de DNA y los antifungigramas se tomó una azada de 1 a 5 colonias del aislamiento secundario, para inocular 10 ml de medio YPD en tubos de borosilicato estériles, se incubaron a 37°C en agitación continua a 180 rpm, durante 12 a 24 h o hasta que se obtuviera una densidad óptica de 0.09 a 530 nm λ, para obtener una concentración similar en todos los inóculos para los antibiogramas. La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro, marca Jenway modelo CE UK 6505 UV/VIS.

VI.9 Diagnóstico molecular de las especies de *Candida*

VI.9.1 Extracción de DNA.

Se incubaron tubos con 10 ml de YPDA más el inoculo del aislamiento secundario a 37°C en agitación continua durante 12 h o hasta obtener turbidez. Posteriormente se transfirió 1 ml a un tubo de 1.5 ml; se centrifugó a 12 000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 0.5 ml de agua estéril, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. A continuación se resuspendieron las células en 0.2 ml de buffer de lisis (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM TrisCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8), adicionándole 0.2 ml de microperlas de vidrio y 0.2 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1, se mezcló por vortex durante 3 min para posteriormente agregarle 0.2 ml de buffer TE (1mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA pH8). Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, se retiró la capa acuosa, se transfirió a otro tubo de 1.5 ml, se agregó 1 ml de etanol al 70%

mezclado por inmersión, se centrifugó durante 5 min a 14 000 rpm para posteriormente decantar el sobrenadante. Al pellet obtenido se le agregaron 0.4 ml de Buffer TE más 1.5 µl de RNAsa 20 mg ml-1 (CONCERT TM, Invitrogen), se incubo a 37°C durante 10 min, después se le agrego 10 µl de acetato de amonio 4 M y 1 ml de Etanol al 70% se mezcló por inmersión, se incubó a -20°C durante 20 min, para posteriormente centrifugarlo a 14 000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min, para finalmente agregarle 0.1 ml de buffer TE. Los tubos se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados.

La presencia de DNA se analizó haciendo una electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de Etidio a 0.1 µg ml^{-1}, y fueron observados en un transiluminador BioRad con luz UV y el software Quantity One.

VI.9.2 Amplificación de DNA

VI.9.2.1 Oligonucleótidos.

Se utilizaron los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (Tabla IV) diseñados por White y colaboradores (1990), para la amplificación de las región ITS que comprende el ITS1, 5.8S, ITS2, esta región presenta zonas conservadas que nos permite la identificación de hongos a nivel de género, pero también incluye regiones hipervariables que nos permiten diferenciar a nivel de especies a través de la secuencia o el tamaño del fragmento amplificado (Figura 1).

Tabla IV. *Oligonucleótidos diseñados para la identificación de hongos.*

Nombre	*Secuencia*	*Referencia*
ITS1	*5´ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´*	*White et al., 1990*
ITS4	*5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´*	*White et al., 1990*

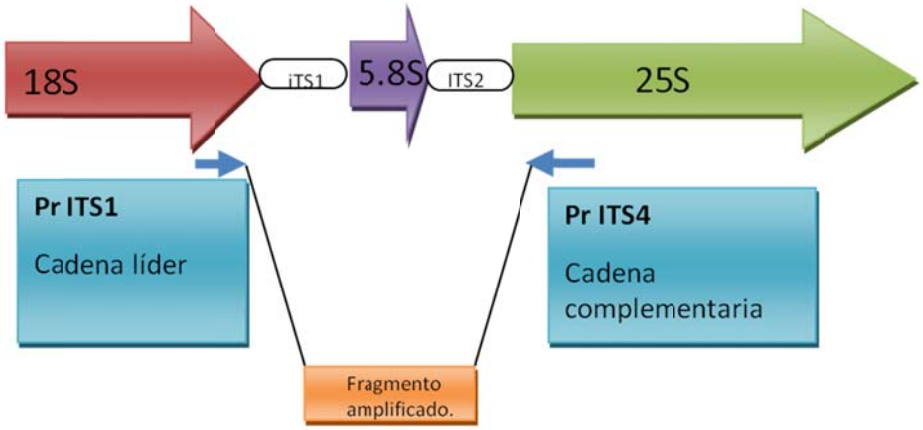

Figura 1. *Esquema del DNA ribosomal, en guinda se muestra la subunidad 18S, en blanco la región interna espaciadora transcrita 1 (ITS1), en morado la subunidad 5.8S, ITS2 en blanco y en verde la subunidad 25S. Las flechas y los recuadros en azul son las regiones donde se alinean los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4, y en naranja es el fragmento que amplifican estos oligonucleótidos.*

VI.9.2.2 PCR

La mezcla para PCR contenía 10 µl de buffer colorless 10 X (Promega®), 5 µl de MgCl2 (25 M) (Promega®), 10 µl de dNTP (1mM), 3 µl DNA (150 ng) y 1 U de taq polimerasa GoTaq DNA (Promega®), y se utilizaron 20 µl de H_20 grado HPLC, las reacciones se llevaron a un volumen final de 50 µl. Cada una de las reacciones fue sometida a un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por dos min, y 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), alineamiento (55 °C, 30 s) y extensión (72°C, 1 min) y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min.

A los productos obtenidos de las amplificaciones con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, se les realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% más bromuro de etidio a 0.1 µg ml^{-1}, utilizando un marcador de peso molecular de I Kb (Promega®) para corroborar los tamaños. Los tamaños esperados para cada especie se muestran en la tabla V. Los geles se observaron bajo luz UV en el transiluminador (Bio Rad®) y la captura de imágenes se realizó ayuda del software Quantity one y una cámara Canon EOS Digital Rebel XT de 12 Megapixeles.

Tabla V. *Tamaño de los productos amplificados con los oligonucleótidos ITS1-ITS4 en las diferentes especies de Candida.*

Especie de *Candida*	**Tamaño**
C. albicans	535
C. glabrata	871
C. tropicalis	534
C. krusei	510
C. guillermondii	608
C. parapsilosis	520

VI.9.2.3 Identificación de especies de *Candida* por PCR-RFLP

Posteriormente a la amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2, se utilizó la enzima de restricción *MspI*, la cual corta los enlaces fosfodiester entre dos citosinas que son seguidas por dos guaninas en ambos sentidos. Al cortar los fragmentos amplificados, se genera un patrón de bandas distinto para cada especie (Tabla VI) (Mirhendi *et al*., 2006).

Tabla VI. *Tamaños de los fragmentos antes y después de la digestión con la enzima MspI.*

Especie	**Tamaño de ITS1-ITS4**	**Fragmentos después de MspI**
C. albicans	535	297,238
C. glabrata	871	557,314
C. tropicalis	534	340,184
C. krusei	510	261,249
C. guillermondii	608	371,155,82
C. parapsilosis	520	520

La mezcla para la restricción enzimática, se utilizaron 35 µl del producto de PCR, 4 µl Buffer B 10X (Promega®), 0.4 µl de BSA 10 µg $µl^{-1}$ (Promega®) y 1 µl de la enzima de restricción Msp1 10 U $µl^{-1}$ (Promega®), se llevó a un volumen total de 40.4 µl, en un tubo de 1.5 ml y se incubó a 37°C durante 90 min. Se realizó una electroforesis del producto de la digestión de cada muestra en un gel de agarosa al 1.5% más bromuro de etidio a 0.1 µg ml^{-1}. Los geles fueron visualizados con el transiluminador bajo luz UV y con la ayuda del software Quantity One fueron capturadas las imágenes.

VI.10 Prueba de sensibilidad a antifúngicos

La técnica utilizada está basada en la guía de usuarios del método M44-A que es una técnica aprobada por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS por sus siglas en inglés) para medir la sensibilidad de los antifúngicos en levaduras con discos de difusión.

Colonias de los aislamientos secundarios fueron inoculadas en tubos de cultivo con 10 ml conteniendo medio YPD, y se incubaron a 37°C, bajo agitación continua a 180 rpm, hasta obtener la densidad óptica mencionada. Bajo condiciones de asepsia, se introdujo un hisopo estéril en el medio de cultivo y se frotó en las paredes para retirar el exceso de líquido, para posteriormente realizar un estriado en tres direcciones que cubriera por completo la superficie de la caja de Petri con MHA, se dejó secar el inoculo durante 10 a 30 min, para después con unas pinzas de disección colocar discos de 9 mm Neo-Sensitab (Roscko Diagnostica) que contenían los siguientes antifúngicos: Nistatina 50 µg, Fluconazol 25 µg, Clotrimazol 10 µg, Itraconazol 8 µg, ketoconazol 15 µg y Miconazol 10µg por disco. Las cajas de Petri se incubaron a 37°C durante 24 a 48 h para la medición de los halos de inhibición. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para los antifúngicos azólicos la medición de la zona de inhibición se determinó por el diámetro del halo de inhibición, considerando como limite la presencia de colonias con un tamaño homogéneo en el cultivo. Para la nistatina se

midió el área de inhibición desde donde no había crecimiento alguno. Las colonias que se encontraban dentro del área de inhibición se consideraban mutantes resistentes. De acuerdo al NCCLS se han determinado los valores de referencia de las zonas de inhibición de diferentes antifúngicos y se engloban en tres categorías: sensibles, intermedio o dosis dependiente y resistente (Tabla VII). La categoría intermedio contempla dos respuestas, una que es dosis dependiente, que se utiliza para indicar que un organismo puede ser susceptible a un antifúngicos utilizando una dosis más altas, que permita que se alcance el nivel máximo del fármaco en sangre o en el tejido afectado y la categoría de realmente intermedio, que es cuando la CIM del antimicótico se encuentra cerca del límite máximo de concentración del antifúngico en sangre o en tejidos. Para ambos casos existe la posibilidad de obtener una respuesta clínica o microbiológica menor que los aislados sensibles.

Tabla VII. *Valores de referencia del diámetro de los halos de inhibición con los sensidiscos con antifúngicos.*

Respuesta	**Miconazol**	**Itraconazol**	**Clotrimazol**	**Ketoconazol**	**Fluconazol**	**Nistatina**
Sensible	≥ 20	≥ 23	≥ 20	≥ 28	≥ 19	≥ 15
Intermedio	12 a 19	14 a 22*	12 a 19	21-27	15 a 18*	10 a 14
Resistente	≤ 11	≤ 13	≤ 11	≤ 20	≤ 14	≤ 10

* Sensible dosis dependiente. Valores de referencia establecidos por el NCCLS M-44-A

VI.11 Identificación de Mutaciones

VI.11.1 Tecnología del sistema de amplificación refractaria a mutaciones (ARMS)

Esta técnica detecta mutaciones puntuales o pequeñas deleciones en el DNA. Se basa en el diseño de oligonucleótidos con un residuo 3’ que no se aparea con el DNA normal o sin la mutación que se busca, por lo tanto no sirve como iniciador de la reacción en cadena de la polimerasa. La selección de los oligonucleótidos adecuados hace posible que se puedan amplificar o detectar

determinadas secuencias mutantes o normales en el DNA (Figura 2) (Newton, 1989).

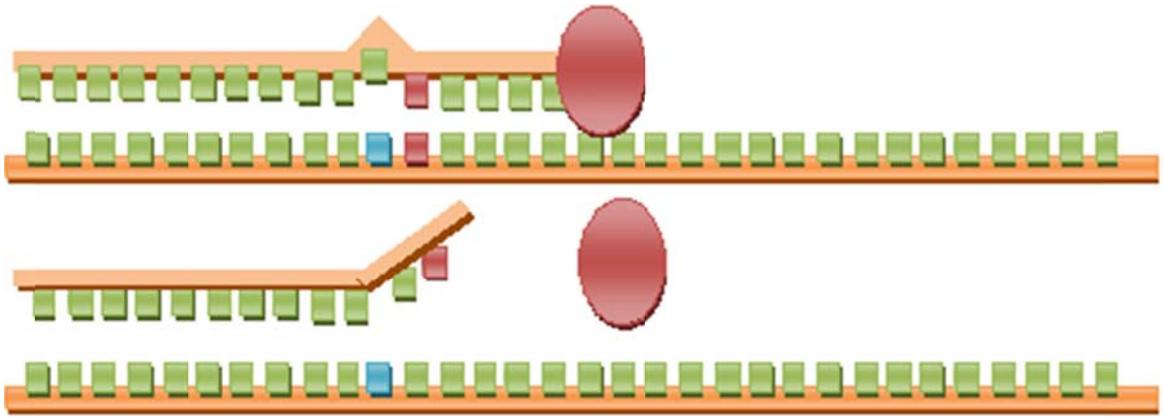

Figura 2. *Esquema del principio de la Tecnología ARMS. Donde en la figura superior se observa un oligonucleótido diseñado para detectar una mutación en el 3´terminal y en la figura inferior un oligonucleótido normal 3´complementario a la secuencia de DNA normal. Se agrega una base que no se aparea en la penúltima posición tanto en el oligonucleótido normal como en el mutante, para que cuando el oligonucleótido mutante se hibride con la secuencia mutante se de una correcta amplificación, pero sucederá lo contrario con el oligonucleótido normal al hibridarse con la secuencia de DNA mutante, no funcionara correctamente para la amplificación.*

VI.11.2 Diseño de oligonucleótidos para detección de mutaciones

Se realizó una búsqueda bibliográfica de mutaciones en genes de importancia en la resistencia a antifúngicos, y se encontró que los más estudiados son ERG3, MRR1, TAC1 y UPC2, se realizó una búsqueda bioinformática de los genes de interés en *C. albicans,* utilizando la base de datos del GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide) y se utilizó el software Bio Edit. Para el diseño de los oligonucleótidos mutantes se realizaron alineamientos de las secuencias de estos genes, identificando el sitio de la mutación en el DNA de tal manera que el diseño de la secuencia del oligonucleótido terminara en el sitio de la mutación. También se diseñó un par de oligonucleótido control para cada uno de estos genes. Y para el caso de los genes MRR1 y ERG3 se diseñó aparte un oligonucleótido normal que su extremo 3´ se

hibridara con el DNA normal en el sitio donde se encuentra la mutación. Los oligonucleótidos para la detección de mutaciones en los genes ERG3, MRR1 y TAQ1 fueron diseñados en el laboratorio de la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal en el Departamento de Microbiología e Inmunología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León (Robledo, 2009) donde se realizó parte de este trabajo. Y en el laboratorio de microbiología del CICESE se diseñaron de los oligonucleótidos para detectar mutaciones en UPC2.

VI.11.2.1 Oligonucleótidos refractarios a mutaciones

VI.11.2.1.1 TAQ1 y UPC2

Para el diagnóstico de la mutación N977D ubicada en el gen TAQ1 y G648D en el gen UPC2, se utilizó un par de oligonucleótidos para amplificar un control del exón del gen deseado y con el mismo oligonucleótido de cadena sentido utilizado para el control, más un oligonucleótido diseñado para diagnosticar la mutación y que identifica un cambio de una guanina en donde normalmente se encontraba una adenina y de una adenina en el lugar de una guanina, en el extremo 3´ para el diagnóstico de la mutación N977D en TAC1 o G648D en UPC2 respectivamente (Figura 3). Así sólo realizará amplificación de ADN, en el caso de que la mutación se encuentre presente en la muestra (Tabla VIII).

Tabla VIII. *Oligonucleótidos diseñados para la identificación de mutaciones en los genes Tac 1 y Upc2.*

Oligonucleótidos sentido 5'-3'	**Oligonucleótido antisentido 5'-3'**	**Amplicón**
TAC1_F	TAC1_R	585pb
CGTCCAAAATGATTGCATTG	TATTGGACTCGGGGTTTTC	
UPC2_F	UPC2_R	752pb
GCTACGAGAAGCCGTGTTGAATAT	CTAAATTACTGGTAAGGACGCTTGG	
TAC1_F	Pr N977D_R	424pb
CGTCCAAAATGATTGCATTG	AACCCTTAAATCCCCAAATTAAC	
UPC2_F	Pr G648D_R	424pb
GCTACGAGAAGCCGTGTTGAATAT	CCAAGGAAATCCATCATCATATGCATT T	

VI.11.2.1.2 ERG3 y MRR1

Para la detección de las mutaciones D19E en el gen ERG3 y G977V en MRR1 se utilizó una estrategia diferente, se utilizaron un par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento mayor del gen como control y un par de oligonucleótidos que incluyen el sentido del control y un antisentido que en el extremo 3´ hibrida con la mutación. También se diseñó otro oligonucleótido sentido, que el extremo 3´ se hibrida con el DNA normal en el sitio donde se ha reportado la mutación, así que sólo amplifica si se encuentra la secuencia normal del gen junto con el oligonucleótido antisentido utilizado en el control (Tabla IX; Figura 4).

Tabla IX. *Oligonucleótidos diseñados para la identificación de mutaciones en los genes Erg3 y Mrr1.*

Oligonucleótidos sentido 5'-3'	**Oligonucleótido antisentido 5'-3'**	**Amplicón**
ERG3_F	ERG3_R	740pb
AGGTCAACCTTCCCATCACA	TGGCAGTAGTGGCACGTTTA	
MRR1_F	MRR1_R	506pb
TGCGTGGAAGATTACCAAGG	TGCCTCTCCTCAGTTCTGGT	
ERG3_F	ERG3_NR	303pb
AGGTCAACCTTCCCATCACA	GCACCATCTTTAGGGAAAAGA	
MRR1_F	MRR1_NR	344pb
TGCGTGGAAGATTACCAAGG	TCTCTTGATTATTATTTACTAAATCCAAC C	
PrT57G	ERG3_R	485pb
GCACCATCTTTAGGGAAAAGA	TGGCAGTAGTGGCACGTTTA	
MRR1_F	MRR1_R	242pb
CTCAAGAAAGTATACCAATGATTTT CT	TGCCTCTCCTCAGTTCTGGT	

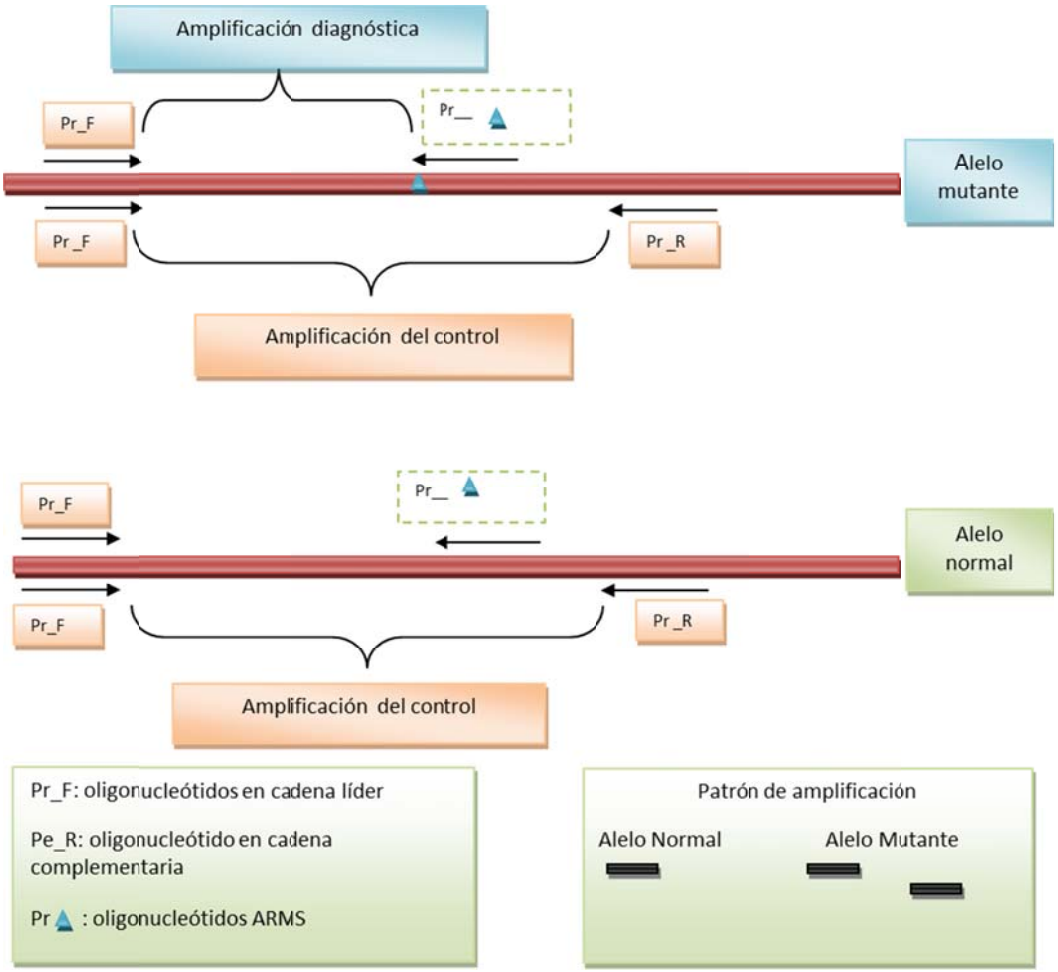

Figura 3. *Principio para el diagnóstico de las mutaciones en N977D en el gen TAC1 y G648D en UPC2. En el recuadro inferior derecho se pueden observar los patrones de bandeo que se pueden obtener.*

VI.11.3 Condiciones de reacción de PCR-ARMS

Las reacciones de amplificación contenían 10 µl de Buffer colorless 5X (Promega®), 5 µl de $MgCl_2$ (25 mM) (Promega®), 10 µl de dNTP (10 mM), 1 µl del oligonucleótido sentido (10 mM), 1 µl oligonucleótido antisentido (10 mM), 3 µl de DNA (300ng), 0.25 µl Taq polimerasa GoTaq DNA polimerase (5 U) (Promega®) se llevaron a un volumen final de 50 µl. Se utilizaron los oligonucleótidos en pares como se indicó anteriormente. Para cada reacción se realizó un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por dos min, y 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), alineamiento (55 ó 56 °C, 30 s, según el par de oligonucleótidos) y extensión (72°C, 1 min) y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Para los pares de oligonucleótidos Tac1_F- Tac1_R y Tac1_F- N977D_R se utilizó una temperatura de alineamiento de 55°C y para ERG3_F-ERG3_NR, ERG3_F-ERG3_R, T57G-F-ERG3_R, UPC2_F-UPC2_R, UPC2_F-G648D_R, MRR1_F-MRR1_R, MRR1_F-MRR1_NR, G977V_F-MRR1_R, fue de 56°C.

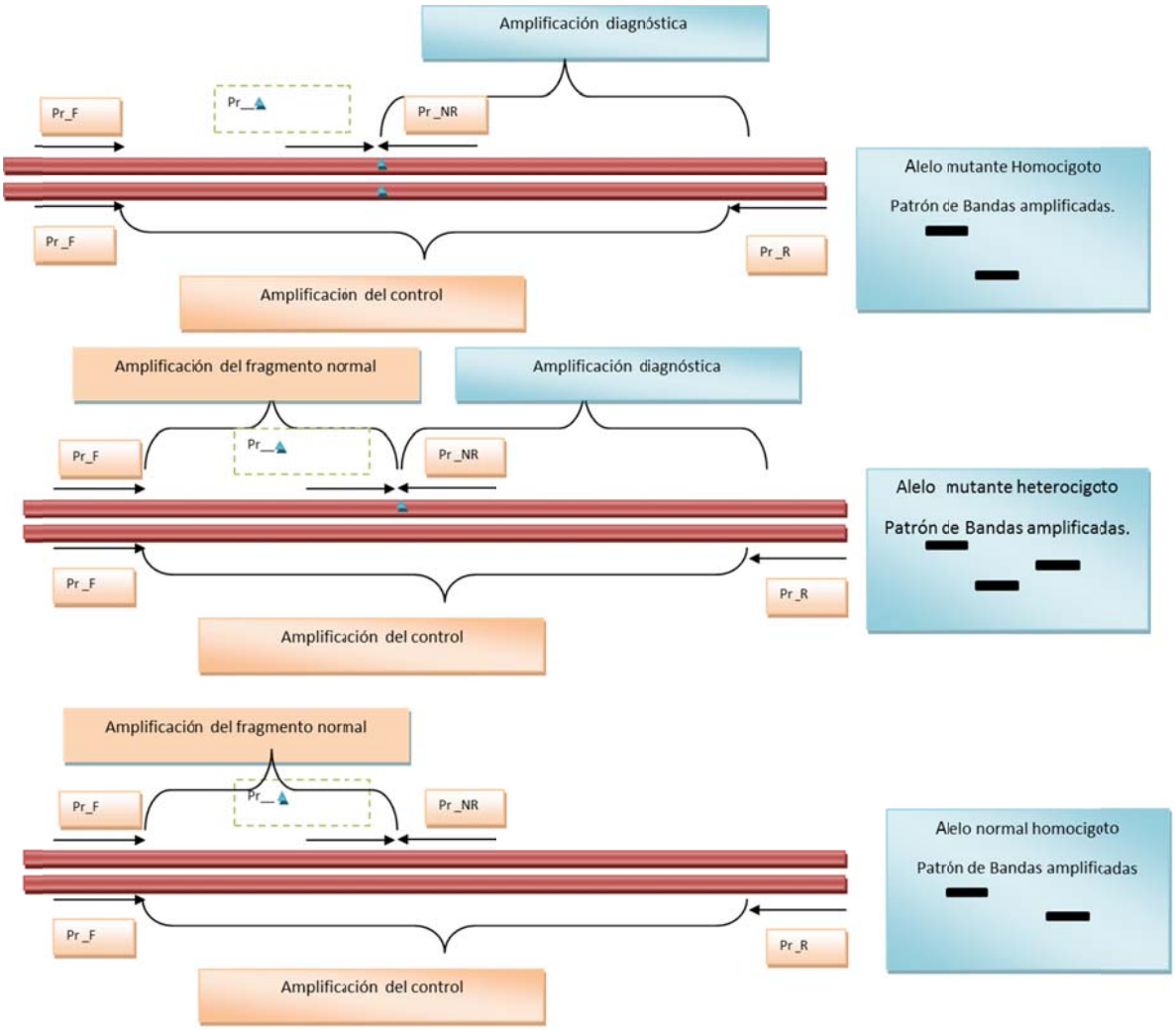

Figura 4. *Principio para el diagnóstico de las mutaciones D19E y G977V de Erg3p y Mrr1p respectivamente. Pr_F y Pr_R son los cebadores que en par amplifican un fragmento control, Pr_F y Pr_NR amplifican un fragmento del gen de menor tamaño que el control, cuando no se encuentra la mutación que se está buscando, Pr_ y Pr_R amplifican en presencia de la mutación. En los recuadros azules se muestran los diferentes patrones de bandeo que se pueden identificar en un organismo diploide como C. albicans.*

VII. Resultados

VII.1 Datos generales

En este trabajo se incluyeron 110 mujeres, a las que se les realizó un cuestionario y se les tomó una muestra de exudado vaginal. Solo 35 (31.8%) fueron portadoras de alguna especie de *Candida* de acuerdo a los cultivos obtenidos. Las observaciones realizadas en estas 35 pacientes más 19 adicionales de un muestreo anterior se incluyeron en este estudio. La edad promedio de las pacientes incluidas fue de 35.3 ± 9.9 (media ± desviación estándar). Sin embargo, sólo se logró realizar el antibiograma en 47 cepas por lo que se presentan sólo los datos de este grupo.

VII.2 Identificación de especies de *Candida* spp

La figura 5 muestra un ejemplo los diferentes patrones de bandas como resultado del PCR-RFLP, donde se utilizaron los DNA, obtenidas de cultivos puros. De las 47 muestras positivas a *Candida*, el 54% (25) tenía un patrón de bandas en el PCR-RFLP de *C. albicans*, el 37% (17) de *C. glabrata* y el 9% (4) de *C. parapsilosis* (Figura 6).

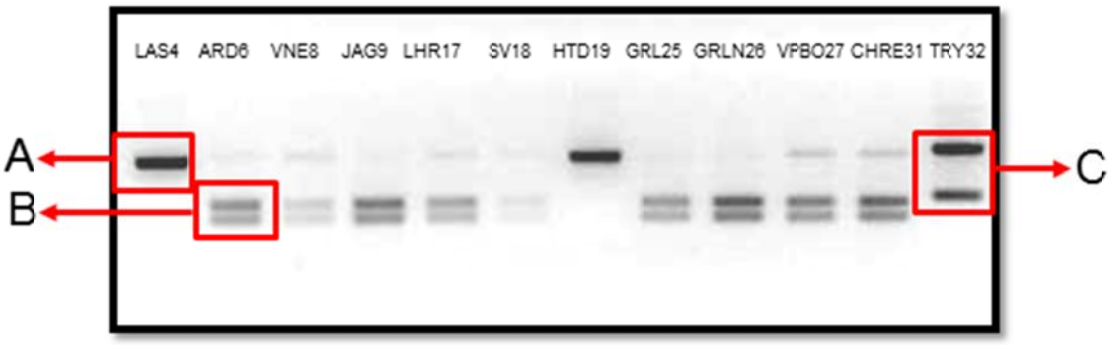

Figura 5. *Electroforesis de los PCR-RFLPs, realizados de la digestión con MspI de la amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Se identificaron 3 patrones. A) Una banda de 520 pb correspondiente a C. parapsilosis, B) Una banda de 297 pb y otra de 238 pb correspondiente a C. albicans y C) Una banda de 557 pb y la otra de 314 pb correspondiente a C. glabrata. Las etiquetas de las columnas corresponden al número de identificación de las muestras.*

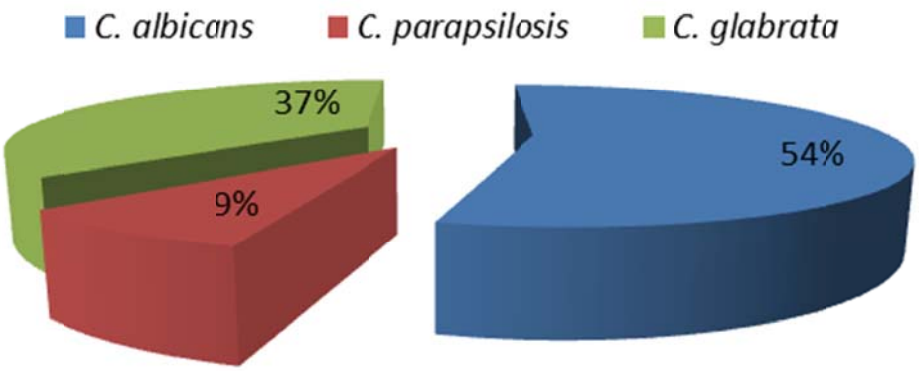

Figura 6. *Distribución de especies de Candida identificadas mediante PCR-RFLP, en una muestra de pacientes gineco-obstétricas del Hospital General de Ensenada.*

VII.3 Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos

De las 54 muestras sólo se realizaron los ensayos sobre resistencia a los antifúngicos a 47. Se midió el halo de inhibición y se promedió el resultado de las tres mediciones y de acuerdo a los valores en la tabla VI se agruparon en

sensible, intermedio o dosis dependiente y resistente. La figura 7, muestra uno de los ensayos, mostrando los halos de inhibición y también algunos ejemplos de no respuesta al antifúngico probado.

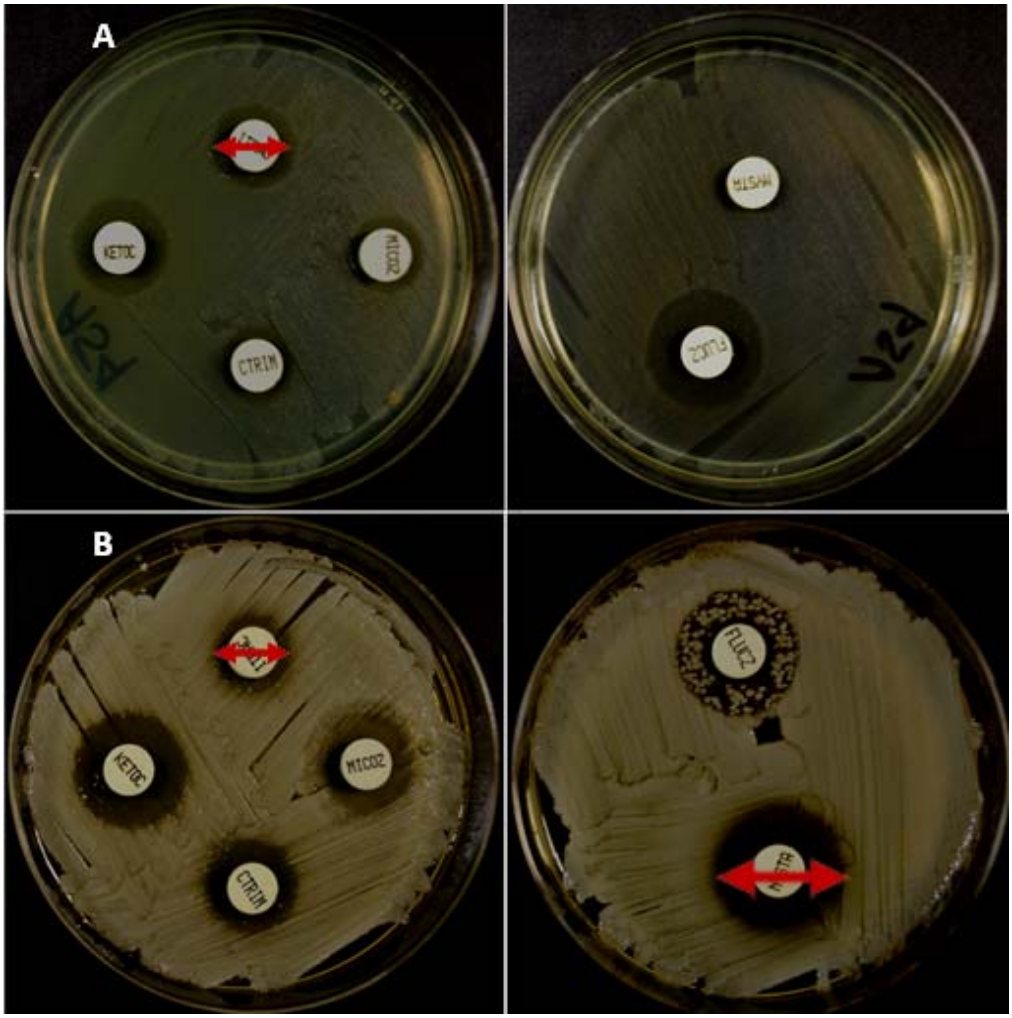

Figura 7. *Ensayos de difusión de antifúngicos con tabletas Neo-Sensitab, La primera línea de cajas de Petri presenta la prueba de sensibilidad realizada a una cepa de C. glabrata, y la segunda línea a una cepa de C. albicans. Las leyendas en los discos corresponden a: ITRAC=itraconazol, MICOZ=miconazol, CTRIM=clotrimazol, KETOC=ketoconazol, FLUCZ=fluconazol, NYSTA=nistatina. Las flechas rojas muestran los halos de inhibición.*

En los ensayos se utilizaron dos grupos de antifúngicos: polieno y azoles. Agrupando los resultados de los azoles, se observó que de las cepas aisladas, el 14.9% fue sensible, el 42.6% presento una sensibilidad intermedia y un 42.6% fue resistente. Estos resultados contrastan con los de la nistatina, el único polieno probado, para el que el 95.7% de los casos hubo sensibilidad y sólo el 4.3% fue resistente (Figura 8).

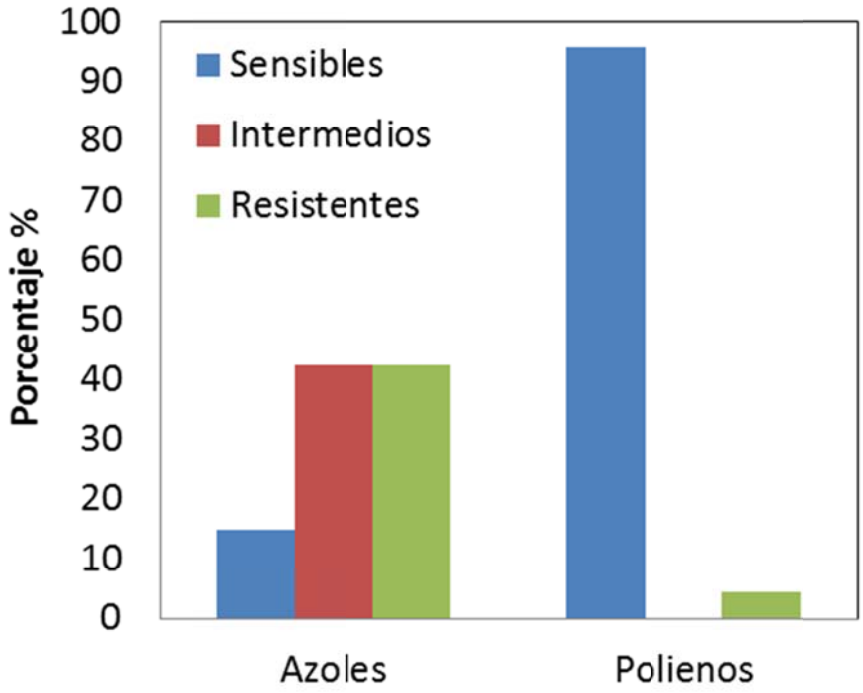

Figura 8. *Distribución de la respuesta a fármacos antifúngicos agrupados por modo de acción.*

La distribución de la respuesta a antifúngicos de acuerdo a cada uno de los fármacos utilizado se muestra en la Figura 9. Se observa que el itraconazol y ketoconazol mostraron los más altos índices de resistencia, 31.9% y 44.7% respectivamente. El fluconazol, miconazol y clotrimazol tuvieron índices de resistencia de 10.6% para los dos primeros y 8.5% para el último. Sin embargo,

todos presentaron un alto número de respuesta intermedia que en algunos casos es dosis dependiente, este tipo de respuesta se observó en el 53.2% de aquellos tratados con fluconazol, 42.8% con itraconazol, 51.1% con miconazol, 29.8% con ketoconazol y 44.7% con clotrimazol. En el caso del polieno probado se encontró un índice de resistencia de 4.3% y no se encontró ninguno con respuesta intermedia.

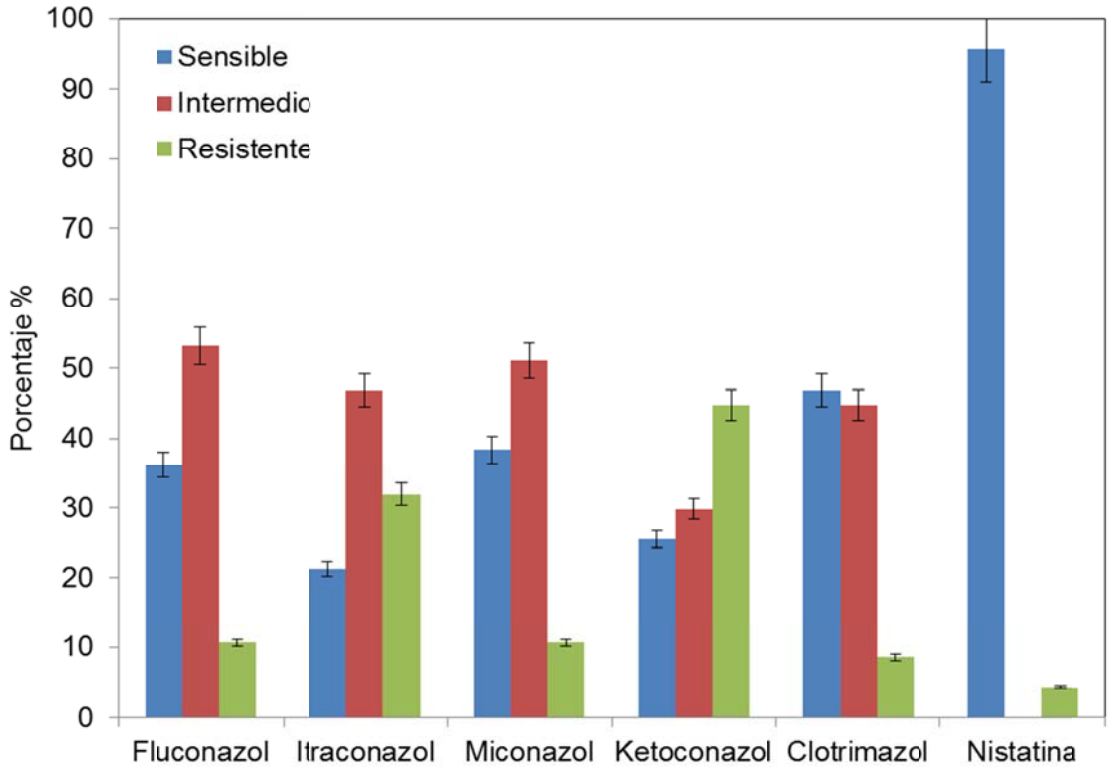

Figura 9. *Distribución de la respuesta individual a cada fármaco antifúngico utilizado.*

Como la respuesta intermedia es considerada como una disminución del efecto de la droga, ya sea porque la dosis es insuficiente o porque no hay una respuesta completa, se consideró conveniente contabilizar a los casos intermedios como resistentes, tomando en cuenta que *in vivo* tienen alta probabilidad de fallar

en el tratamiento de la CV. En la figura 10 se muestra la distribución de la respuesta a los antifúngicos probados, considerando solo, sensibles y en una sola categoría intermedios y resistentes. Se encontró que la sensibilidad para los azoles estaba entre el 21.3% y el 46.8%, en todos los fármacos de este grupo la resistencia fue mayor al 50%, siendo del 63.8% para el fluconazol, del 78.7% para el itraconazol, del 61.7% para el miconazol, del 74.5% para el ketoconazol y del 53.2% para clotrimazol. Para la nistatina, hubo una sensibilidad de 95.7% y 4.3% de resistencia.

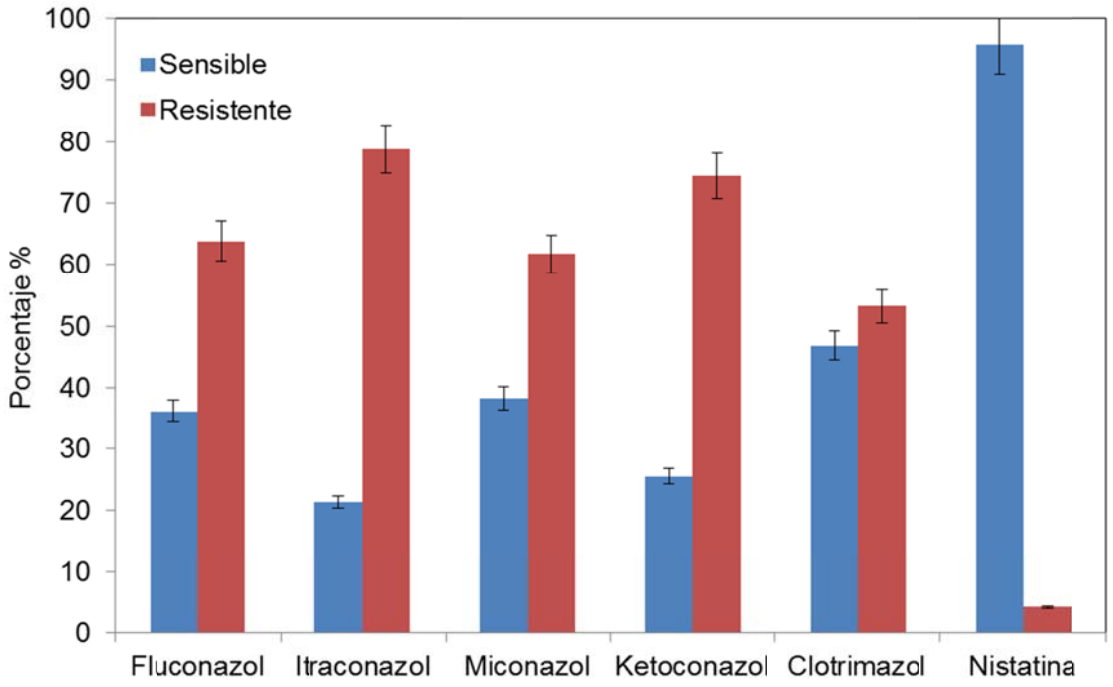

Figura 10. *Distribución de la respuesta individual a cada fármaco antifúngico utilizado.*

Por otra parte, analizando exclusivamente los azoles, se agruparon los imidazoles (Ketoconazol, miconazol, clotrimazol) y los triazoles (fluconazol, itraconazol), y se consideró como resistente aquellos que tuvieron resistencia a al

menos uno de ellos. Se encontró que el 85% eran resistentes a los imidazoles y el 80% a los triazoles, esto fundamentalmente por la resistencia presentada al ketoconazol e itraconazol (Figura 11).

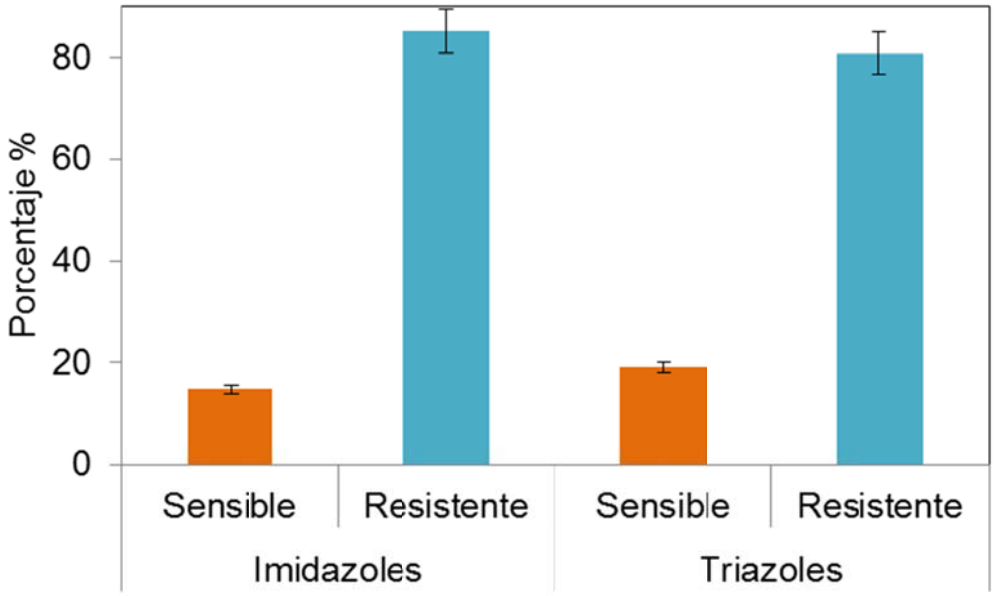

Figura 11. *Distribución de la respuesta individual a los azoles utilizados agrupados en Imidazoles y Triazoles.*

Adicionalmente, se cuantificó el porcentaje de cepas que fueron sensibles a todos los fármacos incluyendo azoles (Figura 12A) y azoles y polieno (Figura 12B), y los que fueron resistentes sucesivamente a uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco fármacos simultáneamente (Figura 12A y 12B). Considerando exclusivamente los azoles, sólo el 14.9% fue sensible a todos los fármacos probados, el 4.2% fue resistente a un azol, el 8.5% a dos, el 17.0% a tres, el 17.0% a cuatro y el 38.3% a todos los azoles (Figura 12A).

Considerando azoles y polienos, se encontró que el 10.6% fueron sensibles a todos los fármacos probados, el 8.5% fueron resistentes al menos a un fármaco,

el 8.5% a dos, el 17.0% a tres, el 17.0% a cuatro y el 38.29% a cinco, de los casos resistentes a nistatina, los dos fueron sensibles a todos los azoles (Figura 12B).

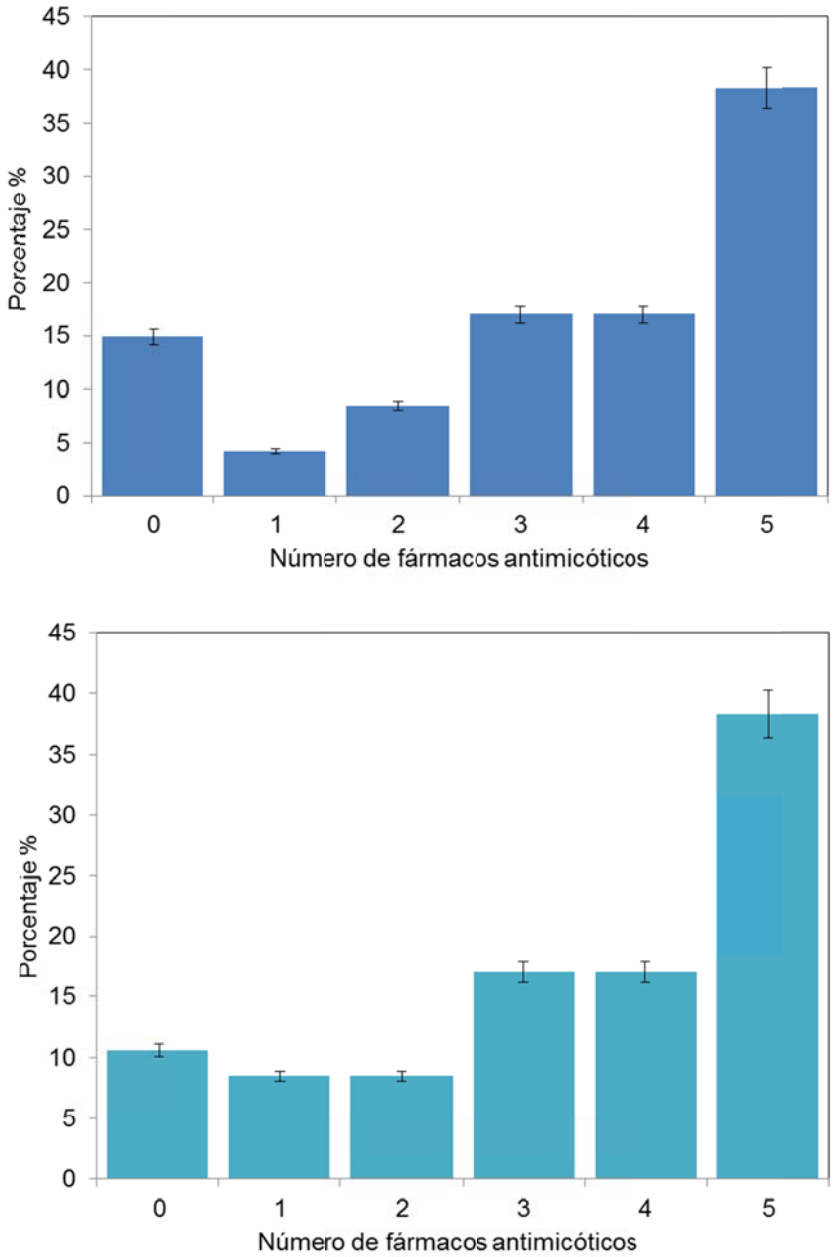

Figura 12. *Porcentaje de cepas que fueron resistentes de 0 a 5 fármacos simultáneamente, A. Considerando sólo azoles y B. Considerando azoles y polieno.*

VII.4 Edad y respuesta a antifúngicos

Se calculó el promedio de edad de las pacientes de las que se tomaron las muestras, agrupadas de acuerdo a la respuesta a cada uno de los antifúngicos probados, se observó que en todos los casos, el promedio de edad fue más alto en las mujeres de las que se aislaron cepas con resistencia a los fármacos (Tablas X y XI). En el caso del uso de clotrimazol e itraconazol esta diferencia de edad, resultó ser estadísticamente significativa con una $p<0.05$ (t de student).

Tabla X. *Promedio de edad de las pacientes de acuerdo a la respuesta in vitro a antifúngicos azólicos (media global 35.3 ± 9.9 años).*

Respuesta	**Clotrimazol**		**Itraconazol**		**Miconazol**		**Ketoconazol**		**Fluconazol**	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
Sensible	31.8	8.4	34.3	7.3	33.9	8.8	32.8	7.9	32.2	9.2
Intermedio	38.3	11.6	29.9	9.5	35.8	12.2	36.3	11.5	35.7	11.7
Resistente	37.5	9.1	43.0	8.8	35.0	7.3	35.7	11.4	39.0	8.4

X=Media, s=Desviación estándar

Tabla XI. *Promedio de edad de las pacientes de acuerdo a la respuesta in vitro a Nistatina (media global 35.3 ± 9.9 años).*

Respuesta	**Nistatina**	
	X	S
Sensible	34.2	10.6
Intermedio	0.0	0.0
Resistente	36.3	3.5

X=Media, s=Desviación estándar

VII.5 Sensibilidad a antifúngicos y anticonceptivos

En cuanto a los métodos anticonceptivos y la sensibilidad a los antifúngicos, se observó un mayor porcentaje de cepas resistentes en pacientes que no utilizaban métodos anticonceptivos o utilizaban métodos locales (condón) o

definitivos ($p<0.05$, X^2). Pero no se encontró diferencias en el uso de métodos hormonales y uso de dispositivo intrauterino (DIU) (Figura 13). En lo referente a polienos, en los dos casos que mostraron resistencia a nistatina, una de las pacientes utilizaba métodos definitivos y la otra DIU.

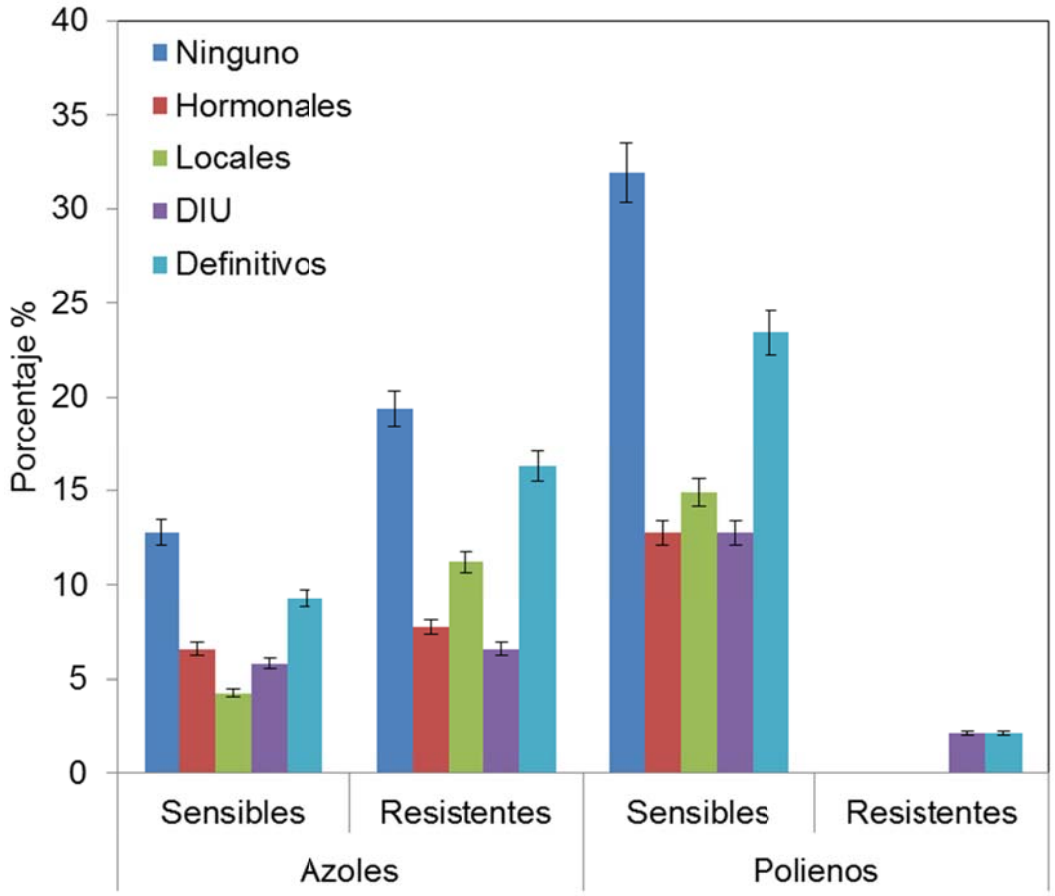

Figura 13. *Distribución de la respuesta a antifúngicos en relación al uso de métodos anticonceptivos pacientes gineco-obstétricas.*

Al analizar por separado cada uno de los azoles, se encontraron resultados similares, en casi todos hubo un mayor porcentaje en el no uso de métodos, así como en los métodos locales y definitivos, mostrando la mayoría diferencias significativas entre la presencia de resistencia y el uso de estos métodos ($p<0.05$; X^2) (Figura 14).

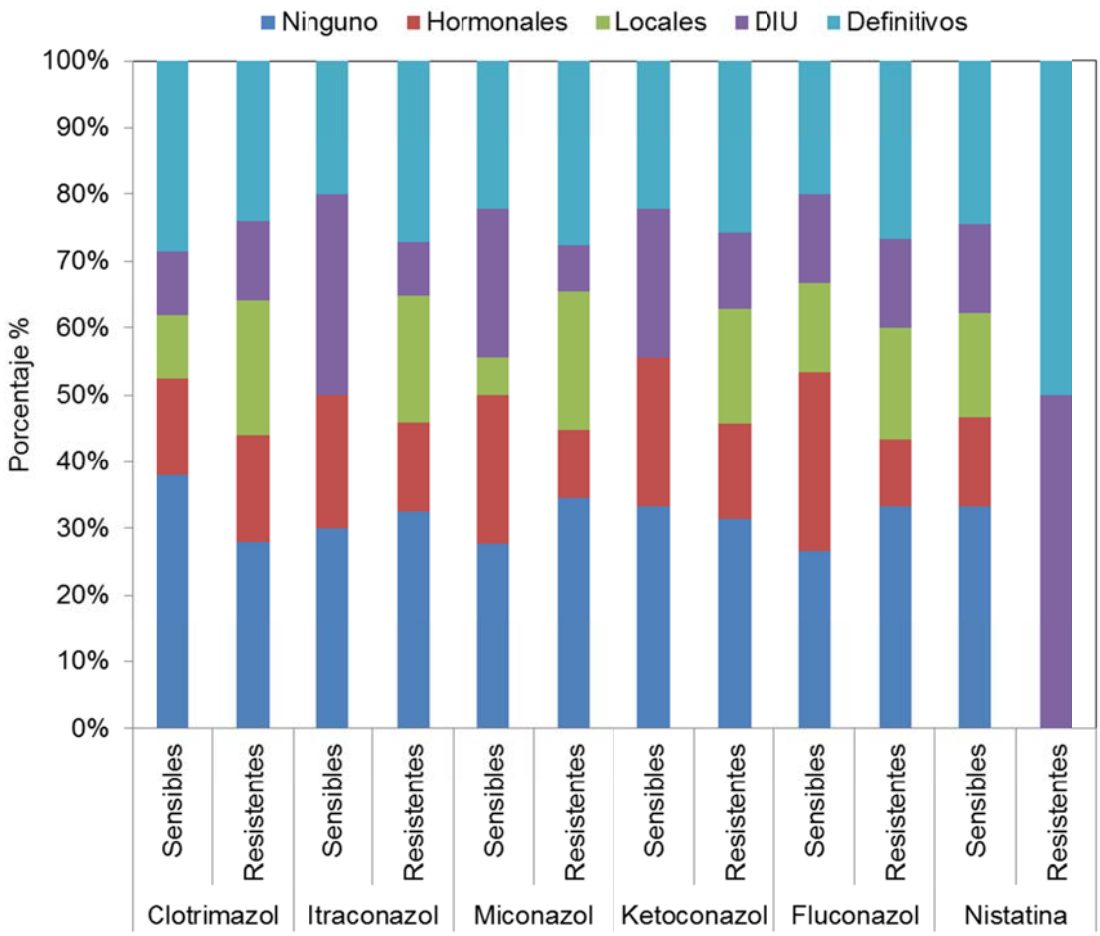

Figura 14. *Distribución de la respuesta a antifúngicos por cada fármaco utilizado, en relación al uso de métodos anticonceptivos en pacientes gineco-obstétricas.*

VII.6 Presentación de signos y síntomas

VII.6.1 Síntomas

De las 47 muestras se observó que el 53% de los aislados provenían de pacientes con síntomas de CV como, leucorrea blanquecina (flujo vaginal de color blanco), prurito, ardor y dispaurenia (dolor durante el coito). Las pacientes con síntomas tuvieron cepas resistentes a los azoles (100%) ($p<0.05$; X^2). (Figura 15). En la resistencia a nistatina, las dos cepas provenían de mujeres que tenía

síntomas pero también había un alto porcentaje de cepas sensibles procedentes de mujeres con síntomas ($p>0.05$; X^2) (Figura 15).

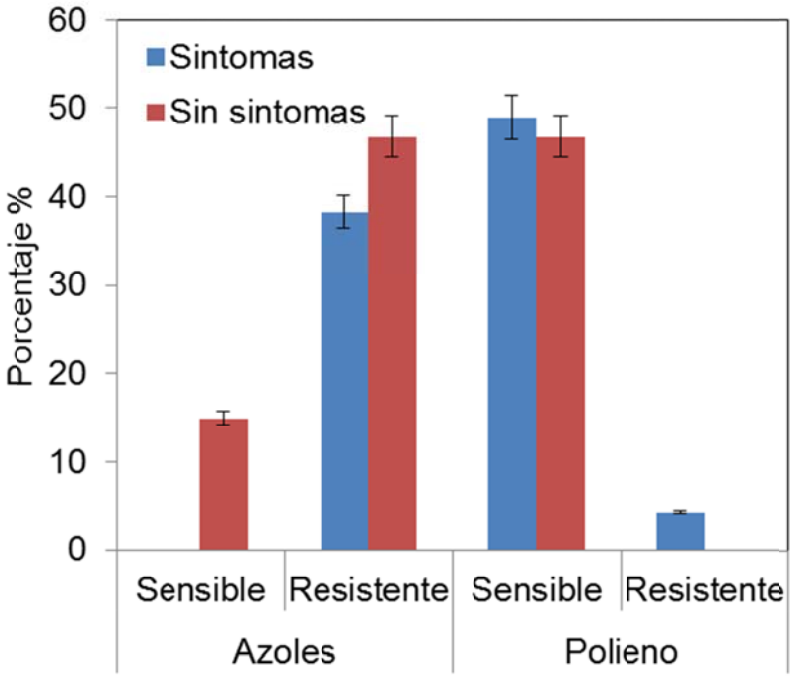

Figura 15. *Distribución de la respuesta a antifúngicos en relación a la presentación de sintomatología asociada a CV en pacientes gineco-obstétricas.*

Al analizar la presencia de síntomas en mujeres portadoras de especies de *Candida* y su relación con los diferentes azoles y polieno utilizados, se encontró que sólo en el caso del miconazol hubo un porcentaje mayor de mujeres sintomáticas en aquellas cepas que resultaron resistentes, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p<0.05$; X^2). En el resto de fármacos probados no se observó ninguna relación entra la resistencia y la presentación de síntomas ($p>0.05$; X^2) (Figura 16).

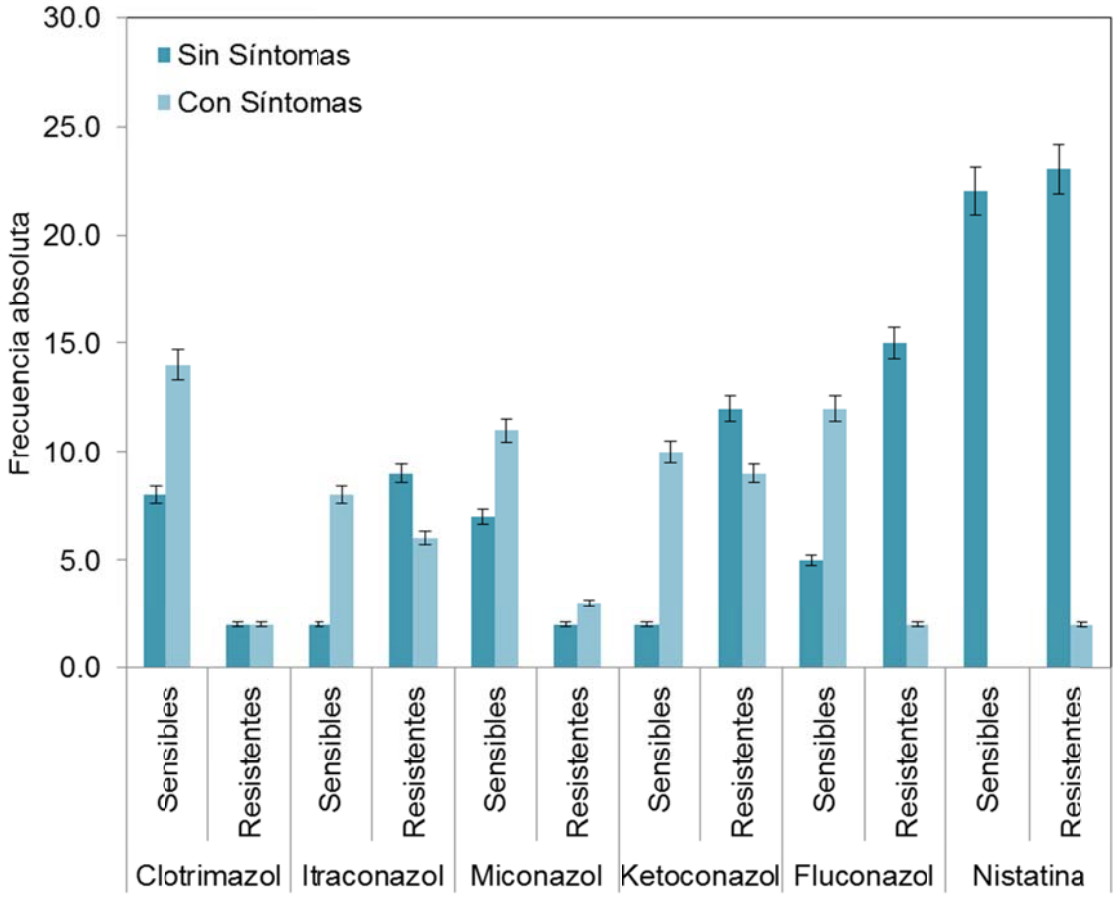

Figura 16. *Distribución de la respuesta a antifúngicos por fármaco probado en relación a la presentación de sintomatología asociada a CV en pacientes gineco-obstétricas.*

VII.6.2 Signos

Los signos como la leucorrea blanquecina, el edema (inflamación por retención de líquidos) y el eritema (enrojecimiento) son indicadores que se utilizan para el diagnóstico clínico de CV. En cuanto a estos signos y la sensibilidad a antifúngicos, se observó que la mayoría de los aislados resistentes a los azoles tuvieron signos principalmente leucorrea blanquecina, aunque no fue significativa la presencia de estos ($p>0.05$; X^2). Las dos cepas resistentes a los polienos pertenecían a pacientes con signos de CV (Figura 17).

Al analizar la presencia de signos en relación con cada uno de los antifúngicos, se observó que los aislados resistentes a cada uno de los azoles fueron obtenidos con mayor frecuencia de pacientes que no presentaban signos (Figura 18).

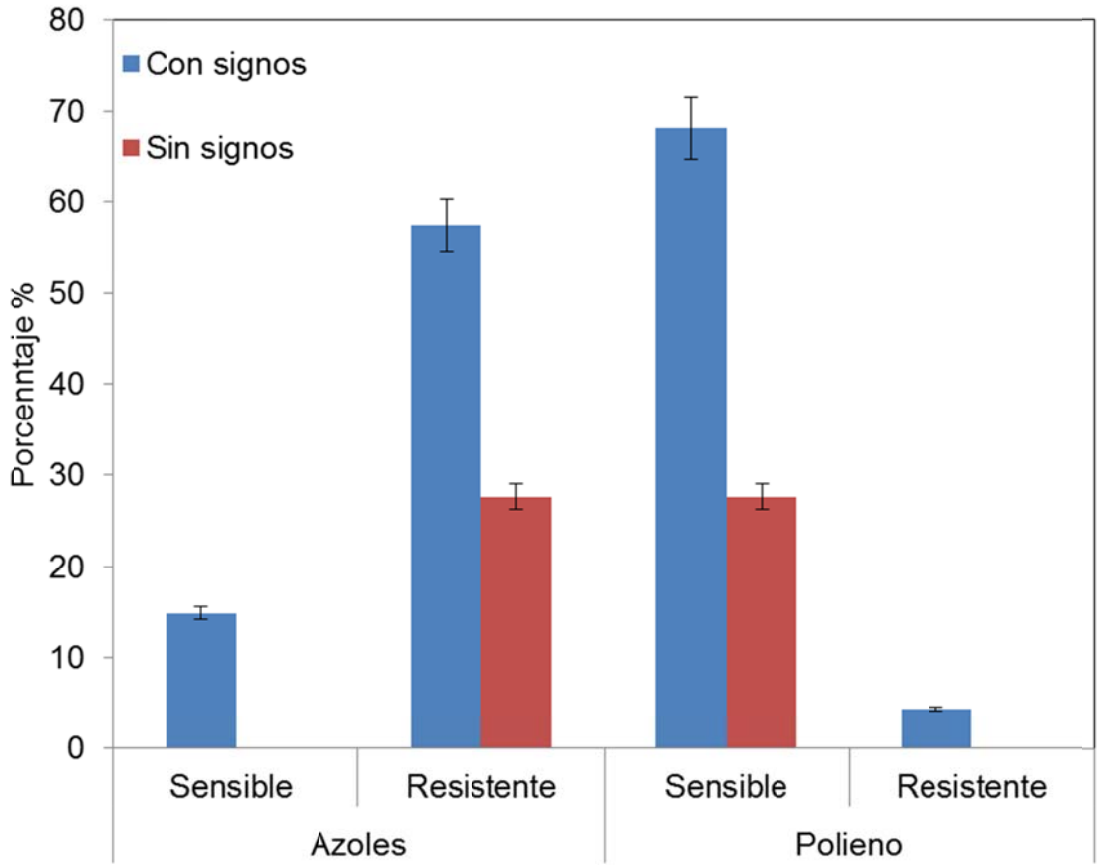

Figura 17. *Distribución de la resistencia a antifúngicos en relación con la presentación de signos de CV en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas.*

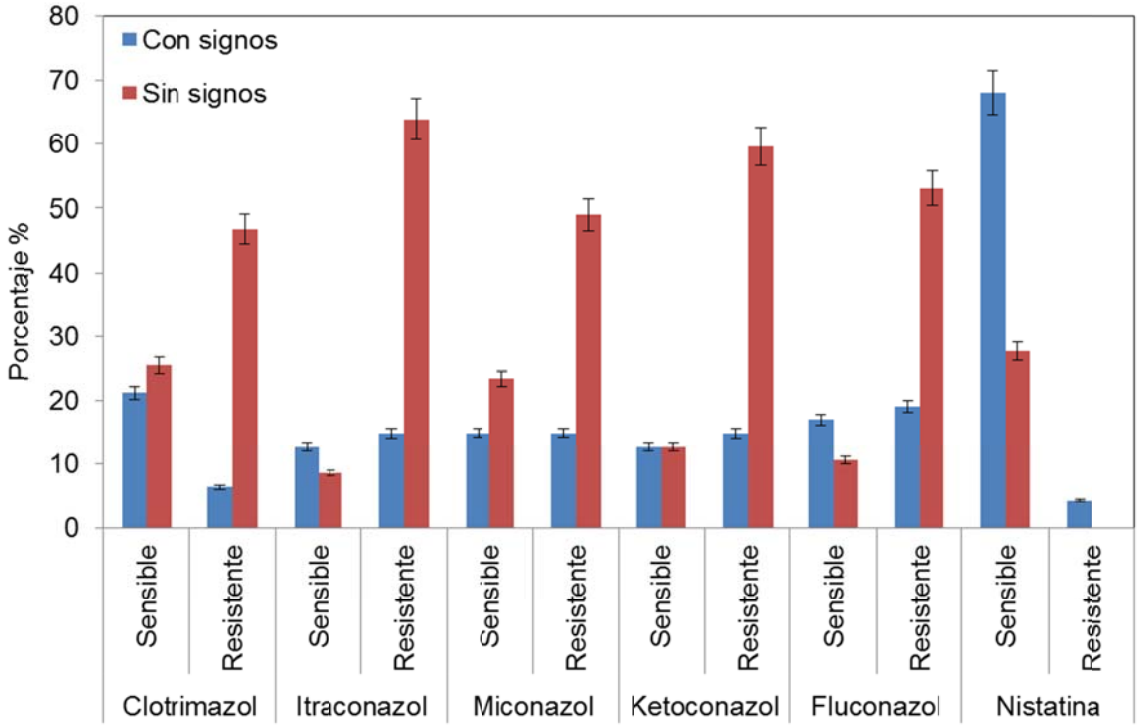

Figura 18. *Distribución de la resistencia a cada uno de los antifúngicos en relación con la presencia de signos en las pacientes gineco-obstétricas.*

VII.7 Recurrencia de CV y resistencia a antifúngicos

El 19% de las pacientes reportaron CV recurrente. El mayor número de pacientes con recurrencia se encontró en el grupo que portaban cepas con resistencia a los azoles, pero no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$, X^2). Con lo que respecta a la nistatina, de las dos cepas resistentes sólo una pertenecía a una paciente que reportó CV recurrente (Figura 19).

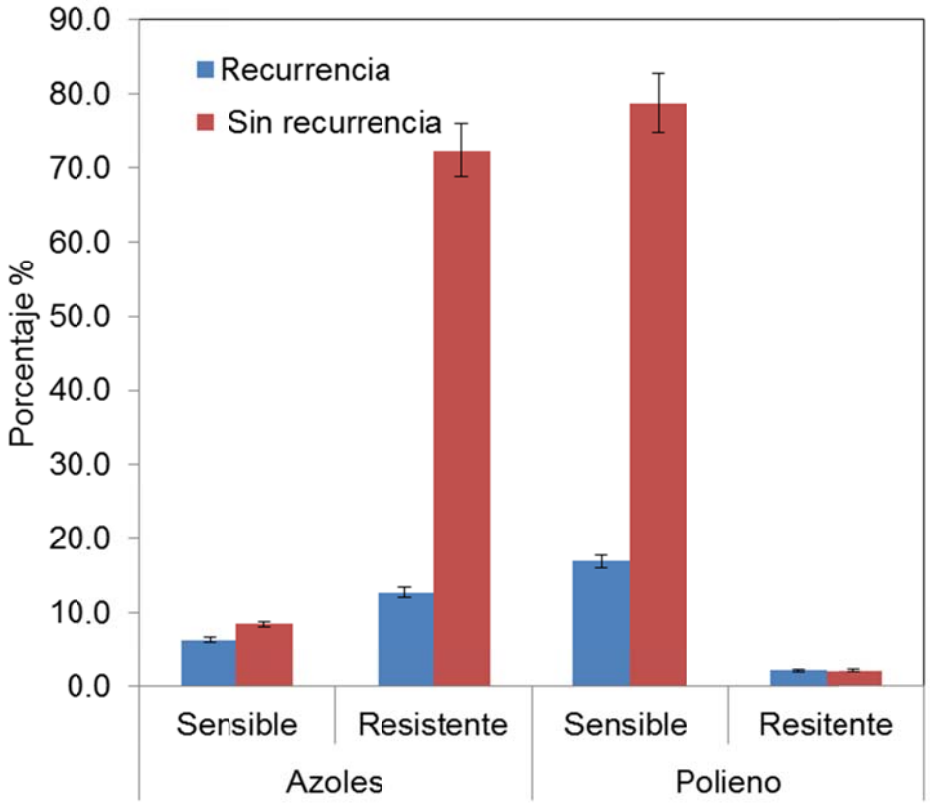

Figura 19. *Distribución de la respuesta a antifúngicos en relación la presentación de recurrencia de CV en pacientes gineco-obstétricas.*

Considerando individualmente cada fármaco evaluado, se encontró que entre el 10 y 20% de las cepas resistentes pertenecían a mujeres con CV recurrente, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$, X^2) entre las pacientes con recurrencia y la respuesta a ninguno de los antifúngicos (Figura 20).

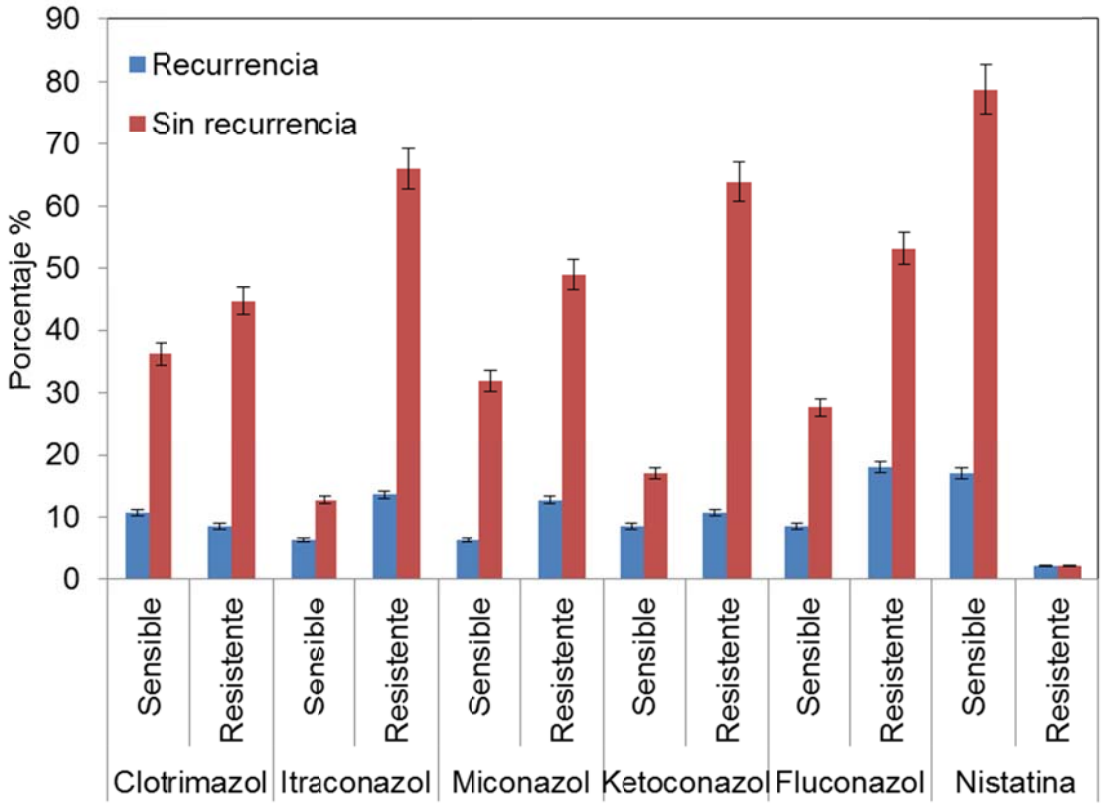

Figura 20. *Distribución de la respuesta a antifúngicos por fármaco probado en relación a la presentación de CV recurrente en pacientes gineco-obstétricas.*

VII.8 Micosis activa y resistencia a antifúngicos

Con lo que respecta a la presencia activa de micosis vaginal, se observó que sólo el 10% de las cepas resistentes provienen de pacientes con diagnóstico clínico de CV, y sólo una de las cepas aisladas fue resistente a la nistatina (Figura 21).

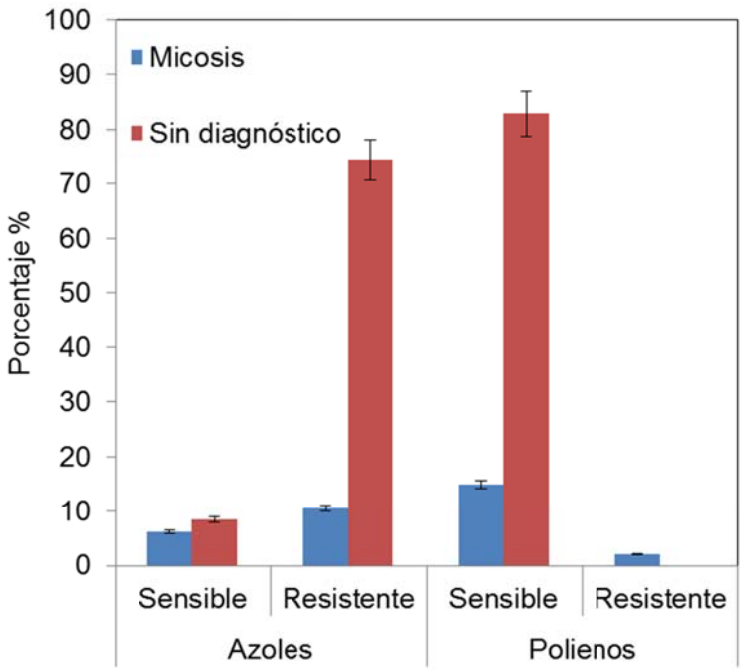

Figura 21. *Distribución de la respuesta a los antifúngicos azólicos y polienos, en relación con el diagnóstico clínico de CV.*

Se realizó el análisis del diagnóstico clínico y de la respuesta a cada uno de los antifúngicos azólicos, se observó que las cepas aisladas de pacientes con diagnóstico clínico de CV fueron en su mayoría resistentes al ketoconazol, observando una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$; X^2). Sin embargo, para el resto de los azoles las cepas que fueron resistentes al clotrimazol, itraconazol, miconazol, y fluconazol fueron de pacientes que no se diagnosticaron con CV (Figura 22).

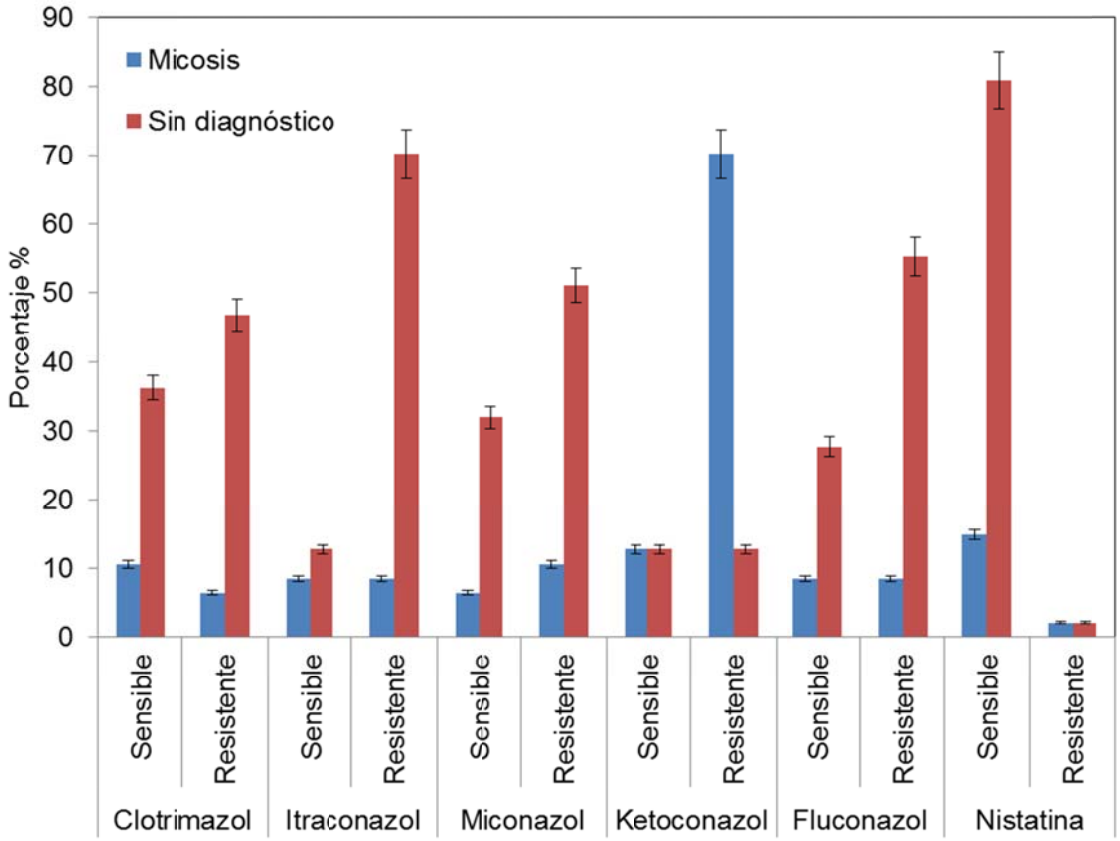

Figura 22. *Distribución del diagnóstico clínico de CV y la respuesta a cada uno de los antifúngicos y la relación con el de las pacientes gineco-obstétricas.*

VII.9 Especies de *Candida* y resistencia a antifúngicos

Por cada una de las especies, se encontró que el 42.6% de los aislados de *C. albicans,* el 34.0% de las cepas de *C. glabrata* y el 8.5% de *C. parapsilosis*, fueron resistentes a los azoles. La única especie que tuvo resistencia a la nistatina fue *C. albicans* (Figura 23). Al analizar la respuesta de las especies de *Candida* individualmente a cada uno de los antifúngicos, *C. glabrata* fue la especie que presentó un mayor porcentaje de cepas resistentes (58.8% a 94.1%) a todos los azoles probados. El mayor índice de resistencia se presentó para el ketoconazol e itraconazol y la menor al miconazol, aunque fue superior al 50%. En *C. albicans* se

observó un comportamiento similar, excepto que el de menor índice fue al clotrimazol (42.3%).

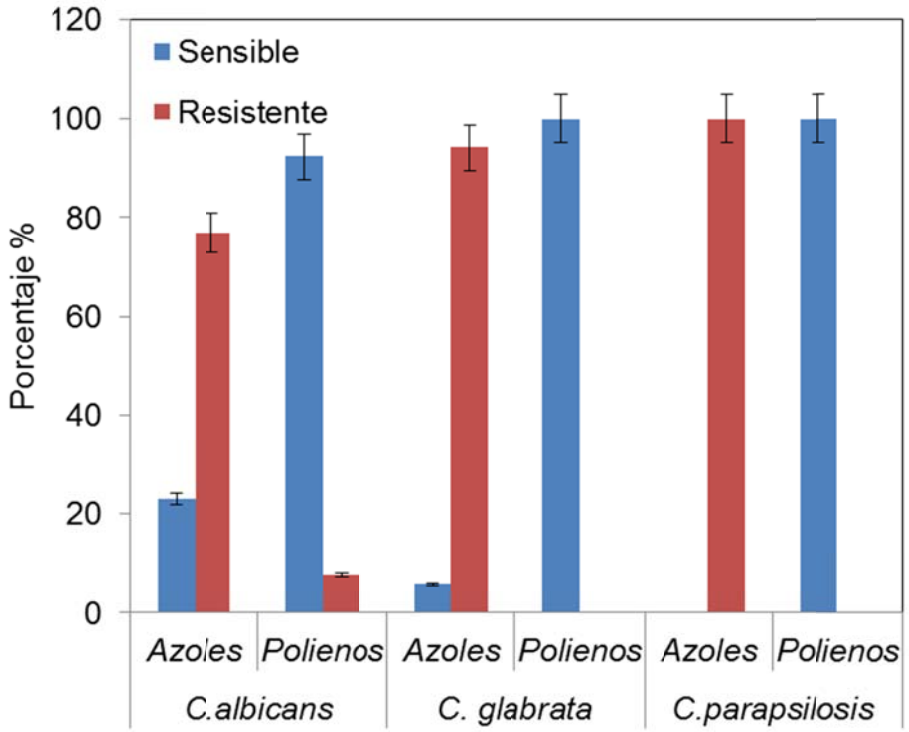

Figura 23. *Distribución de la respuesta a los dos tipos de antifúngicos probados en las diferentes especies de Candida aisladas de pacientes gineco-obstétricas.*

Además, *C. albicans* fue la única especie que mostró cepas resistentes a la nistatina. De las cuatro cepas de *C. parapsilosis,* el porcentaje mayor de resistentes fue al miconazol, aunque presento resistencia intermedia en todos los demás azoles (Figura 24A). También, se realizó un análisis de los casos en los que se tuvo resistencia completa a los antifúngicos en cada especie de *Candida* (Figura 24B). Estos datos mostraron resultados que *C. albicans* tiene mayor resistencia al ketoconazol (46%), y los demás azoles presentaron resistencias por debajo del 15%, las cepas de *C. glabrata* mostraron una resistencia importante al Itraconazol (65%), al ketoconazol (53%) y al fluconazol (24%). Por último, el 75% de las cepas de *C. parapsilosis* mostraron resistencia al miconazol.

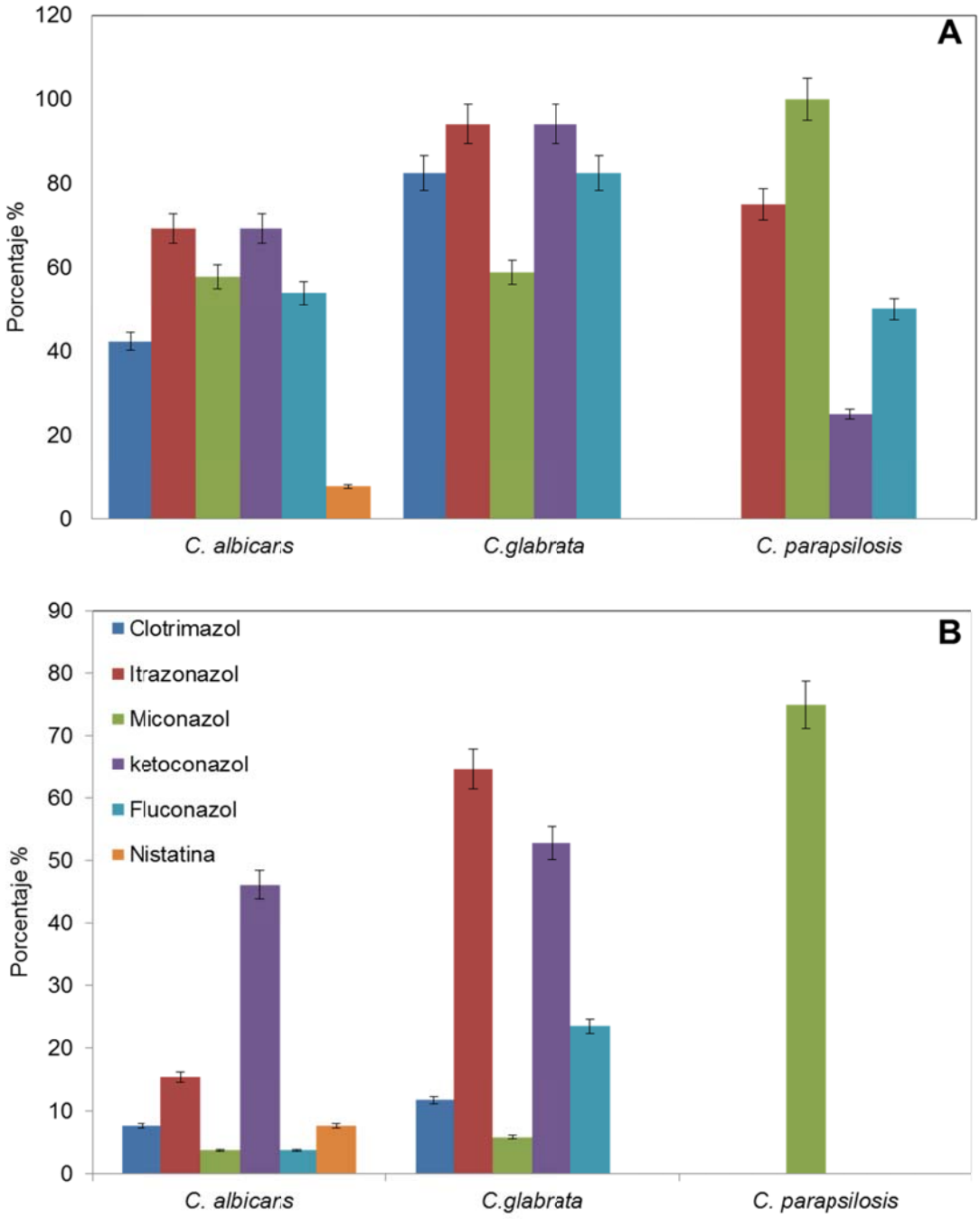

Figura 24. *Distribución de la resistencia a cada uno de los antifúngicos en relación con las especies de Candida aisladas de pacientes ginecológicas. A. Muestra los datos sumando resistentes e intermedios. B. Muestra exclusivamente los datos de los resistentes.*

VII.10 Diagnóstico de mutaciones en genes de *C. albicans*

VII.10.1 Diagnóstico de mutaciones en Upc2p

Las 26 cepas de *C. albicans* que se aislaron de las pacientes gineco-obstétricas fueron analizadas para diagnosticar la mutación G648D, ubicada en el factor de trascripción Upc2p y que esta reportada como una mutación que confiere a *C. albicans* la sobreexpresión constitutiva de ERG11, siendo este un mecanismo de adquisición de resistencia a antifúngicos (Figura 25). Esta mutación se presentó con una frecuencia del 69.8% en el total de cepas estudiadas. Al separar, cepas sensibles y resistentes en ambos grupos se presentó esta mutación y aunque el porcentaje fue ligeramente mayor en la cepas resistentes, no fue significativo ($p>0.05$; X^2) (Figura 26).

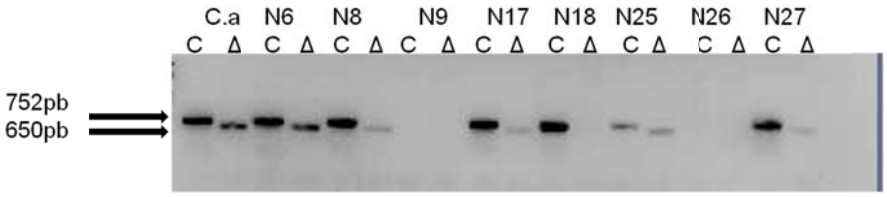

Figura 25. *Electroforesis de las amplificaciones que se utilizaron para el diagnóstico de la mutación G648D. En la parte superior se presentan los nombres de las cepas, la C es la amplificación de un fragmento de 752 pb del exón y se utiliza sólo como un control para corroborar la presencia de DNA, la columna indicada con Δ es la amplificación de un fragmento de 650 pb que amplifica solamente en el caso de que el gen presente la sustitución de las bases que confieran la mutación G648D.*

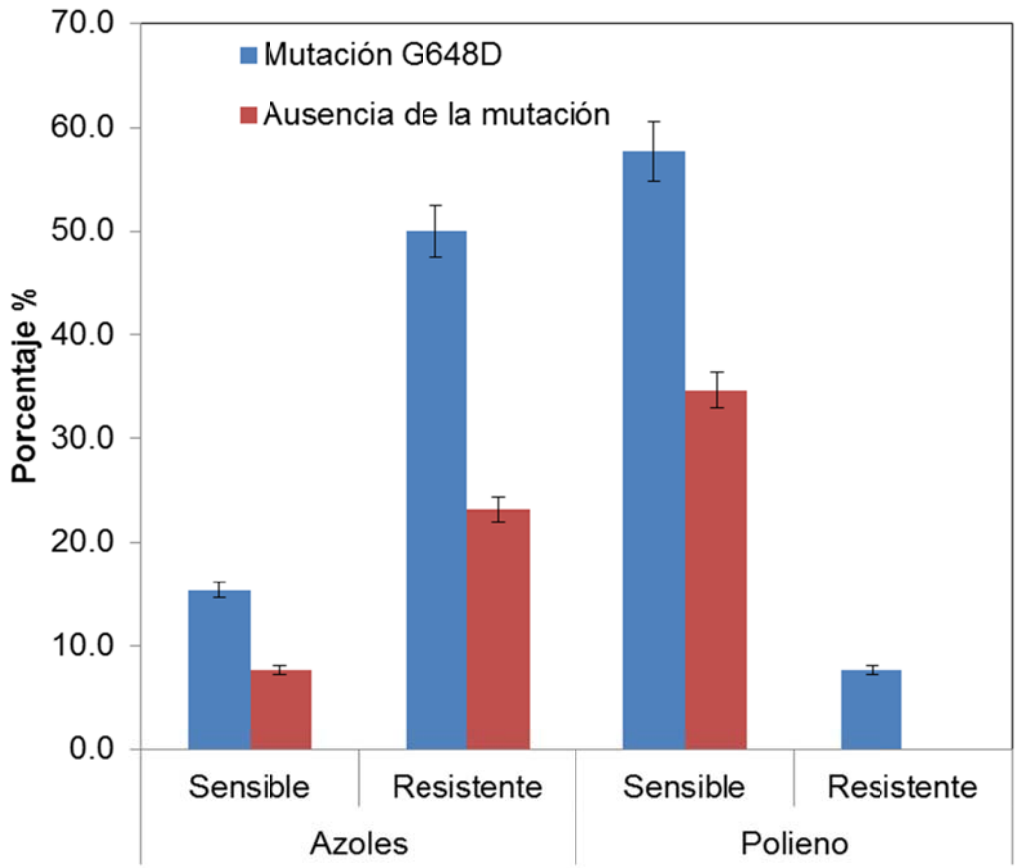

Figura 26. *Distribución de la sensibilidad a los dos diferentes antifúngicos en relación con el diagnóstico de la mutación G648D en las muestras aisladas de pacientes ginecológicas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de 650 pb.*

Con respecto a cada uno de los antifúngicos, el porcentaje de diagnóstico de la mutación es mayor en las cepas resistentes al itraconazol, miconazol, ketoconazol y fluconazol, sin embargo con lo que respecta al clotrimazol el diagnóstico de la mutación es más frecuente en las cepas sensibles que en las resistentes (Figura 27).

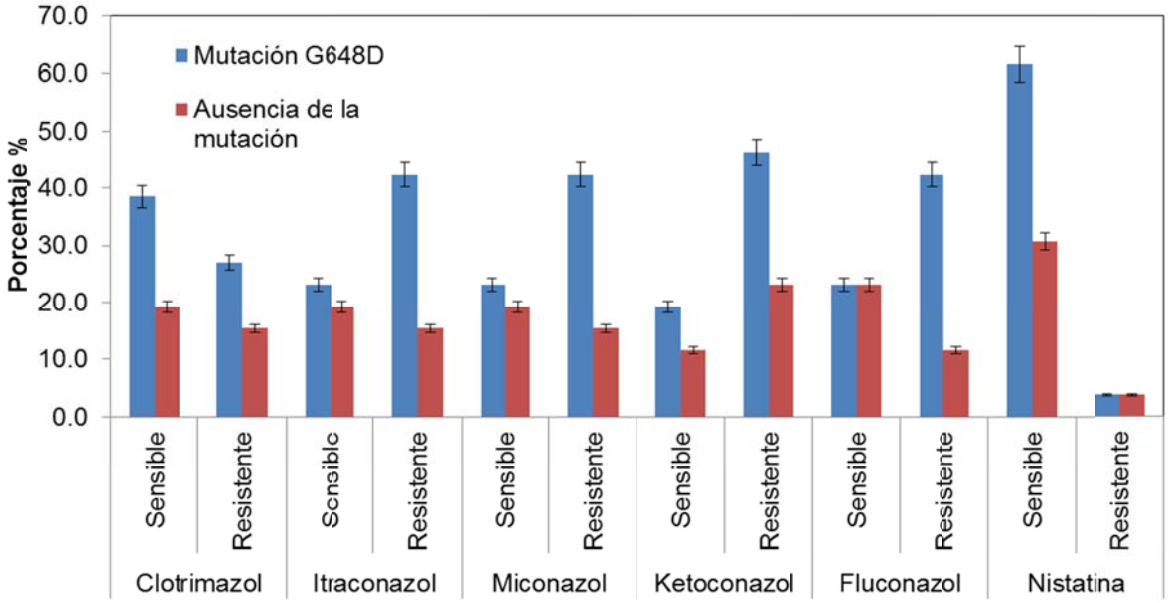

Figura 27. *Distribución de la sensibilidad a cada uno de los antifúngicos probados en relación con la detección de la mutación G648D en los aislados de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 650pb.*

VII.10.2 Diagnóstico de mutaciones en Tac1p

Otra de las mutaciones que se ha reportado que promueve la resistencia a antifúngicos en *C. albicans*, es N977D en Tac1p esté es un factor transcripcional que en presencia de esta mutación sobreexpresa constitutivamente los transportadores de fármacos dependientes de ATP (Cdr1 y Cdr2). La sobreexpresión de estos transportadores está determinada como uno de los factores que promueven la resistencia a antifúngicos (Figura 28).

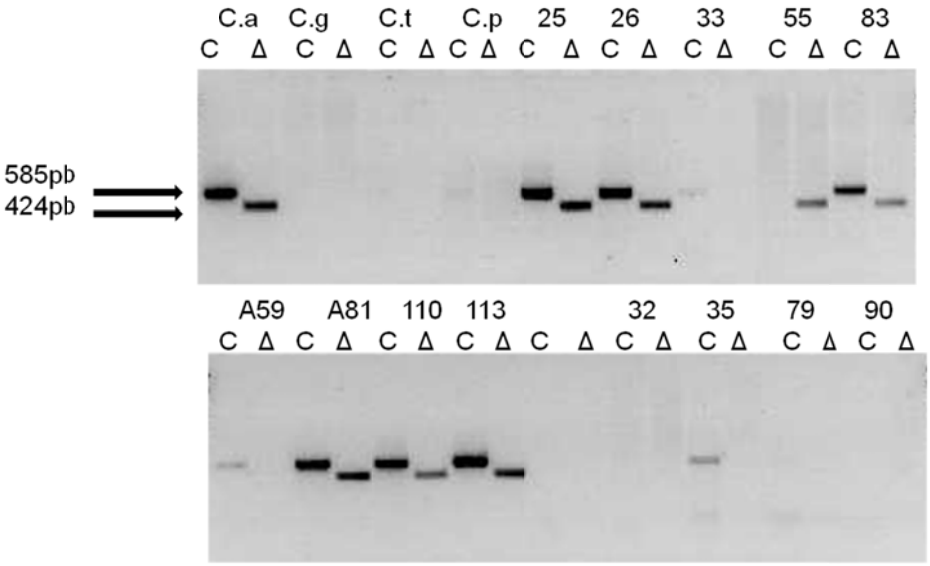

Figura 28. *Electroforesis de las amplificaciones que se utilizan para el diagnóstico de la mutación N977D en Tac1p. En la parte superior de las figuras se presentan los nombres de las cepas, la C representa la amplificación de un fragmento de 585 pb del exón y se utiliza sólo como un control, las columnas indicadas con Δ son la amplificación de un fragmento de 424 pb que amplifica en el caso de que el gen cuente con la sustitución de las bases que confieren la mutación.*

El diagnóstico de la mutación N977D es mayor en las cepas resistentes que en las sensibles ($p>0.05$; X^2). Con lo que respecta a la nistatina se diagnosticó la mutación en un aislado resistente, pero el porcentaje mayor se agrupo en las cepas sensibles (Figura 29).

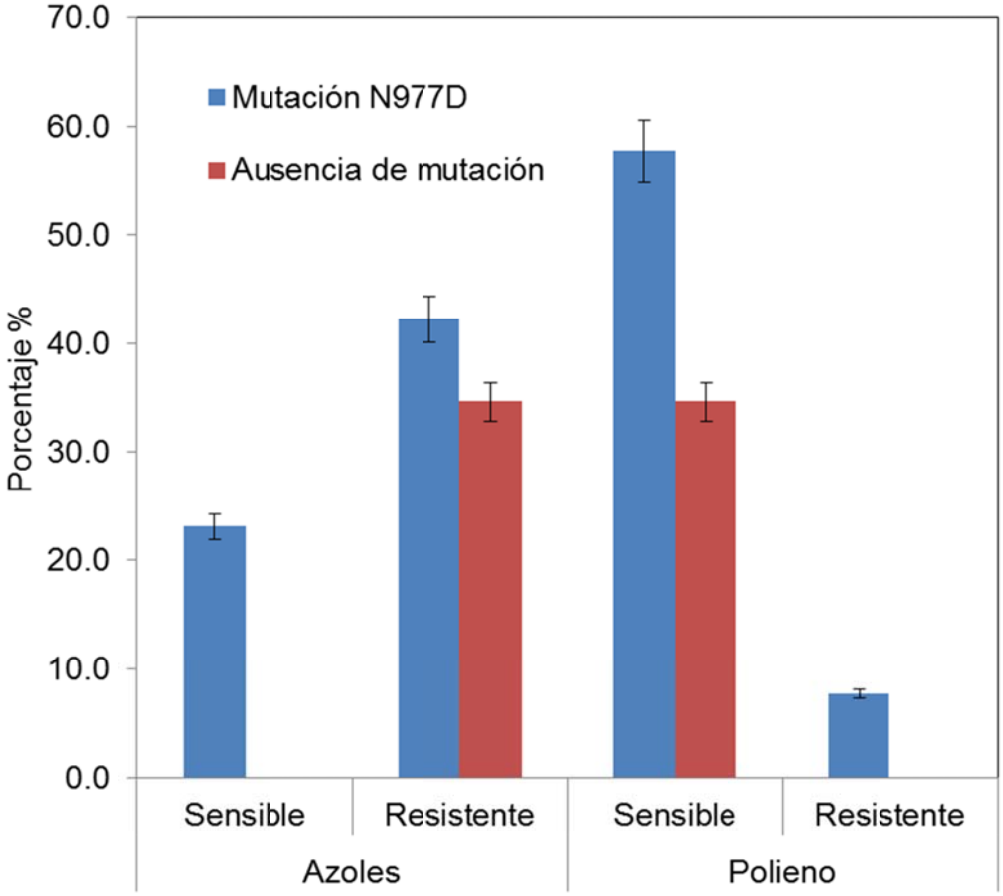

Figura 29. *Distribución de la sensibilidad en los dos diferentes tipos de antifúngicos utilizados en relación con el diagnóstico de la mutación N977D en Tac1p en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 650 pb.*

Al realizar el análisis de la respuesta a cada uno de los antifúngicos en relación con el diagnóstico de la mutación N977D en Tac1p, se observó que el diagnóstico de la mutación estuvo presente con más frecuencia en las cepas con resistencia al itraconazol, miconazol y ketoconazol, sin embargo las cepas sensibles al clotrimazol y fluconazol presentaron la mutación con un porcentaje mayor que las resistentes (Figura 30).

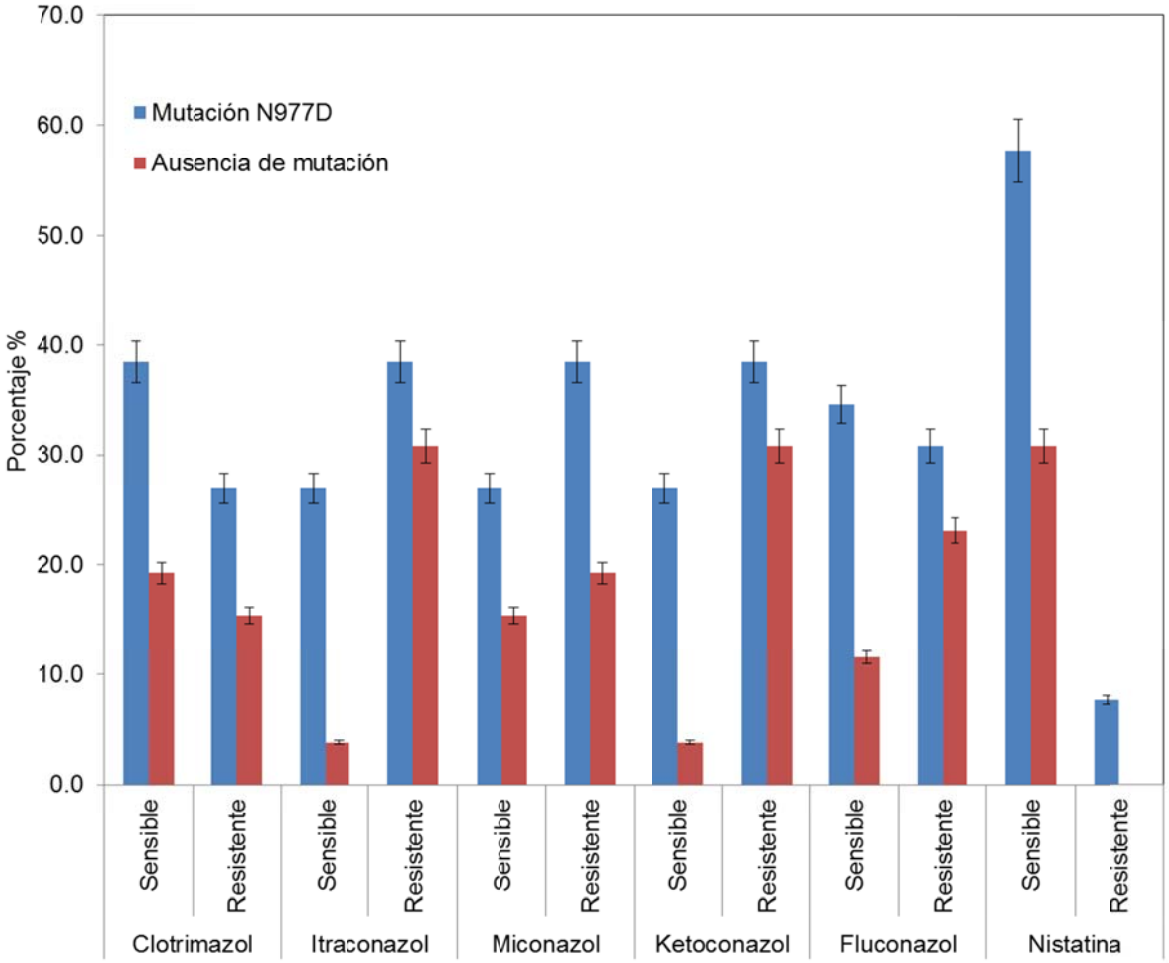

Figura 30. *Distribución de la sensibilidad en los diferentes antifúngicos probados en relación con el diagnóstico de la mutación N977D en Tac 1p en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 424 pb.*

VII.10.3 Diagnóstico de mutaciones en Mrr1p

Mrr1p es un factor transcripcional que actúa en el promotor del gen MDR1 este codifica a los transportadores de múltiples drogas Mdr1p. Cuando existe la mutación G977V en Mrr1p se asocia a una sobreexpresión constitutiva de los transportadores de múltiples fármacos que como resultado dan un incremento en

el transporte de los fármacos al exterior de la célula evitando que actúen (Figura 31).

Los oligonucleótidos diseñados para el diagnóstico de esta mutación, no amplificaron en ninguno de los aislados de *Candida albicans.*

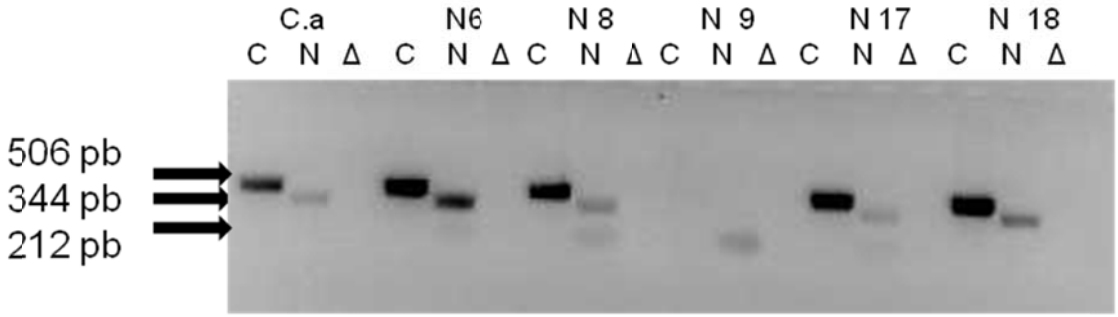

Figura 31. *Electroforesis que muestra las amplificaciones de los fragmentos de MDR1 llamados control (C) de 506 pb, normal de (N) 344 pb, y en el caso de presentar la mutación debería de haber amplificado una banda de (Δ) 212 pb. En la parte superior se encuentran los nombres de las cepas de las muestras obtenidas de las pacientes ginecológicas.*

VII.10.4 Diagnóstico de mutaciones en ERG3

ERG3 es el gen que codifica para una enzima (C5-6- desaturasa) que está involucrada en la cascada de la biosíntesis del ergosterol, Los azoles actúan inhibiendo a la enzima Erg11p ocasionando el acumulo de esteroles intermediarios en la biosíntesis del ergosterol, estos a su vez son metabolizado por la enzima Erg3p a esteroles tóxicos para la célula que pueden ocasionar la muerte de las levaduras. La mutación D19E está relacionada con la resistencia a antifúngicos, si se encuentra presente en Erg3p ocasiona que se acumule en la membrana celular otro esterol que no es tóxico para la célula, disminuyendo de esta manera la acción de los azoles (Figura 32).

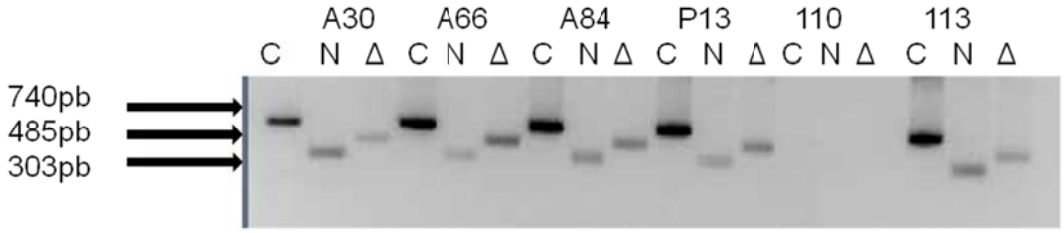

Figura 32. *Electroforesis que muestra los fragmentos de ERG3. La amplificación de la columna C representa un fragmento control, La columna N es la amplificación de un fragmento sin la mutación y la columna Δ es el fragmento que amplifica la mutación D19E. Los números de las columnas son los nombres de las cepas de las muestras obtenidas de las pacientes ginecológicas.*

Las cepas resistentes a los azoles presentaron una frecuencia mayor de la de la mutación D1 E en Erg3p que las cepas sensibles, mientras que en las cepas sensibles a la nistatina fue donde se diagnosticó la mutación con más frecuencia (Figura 33)

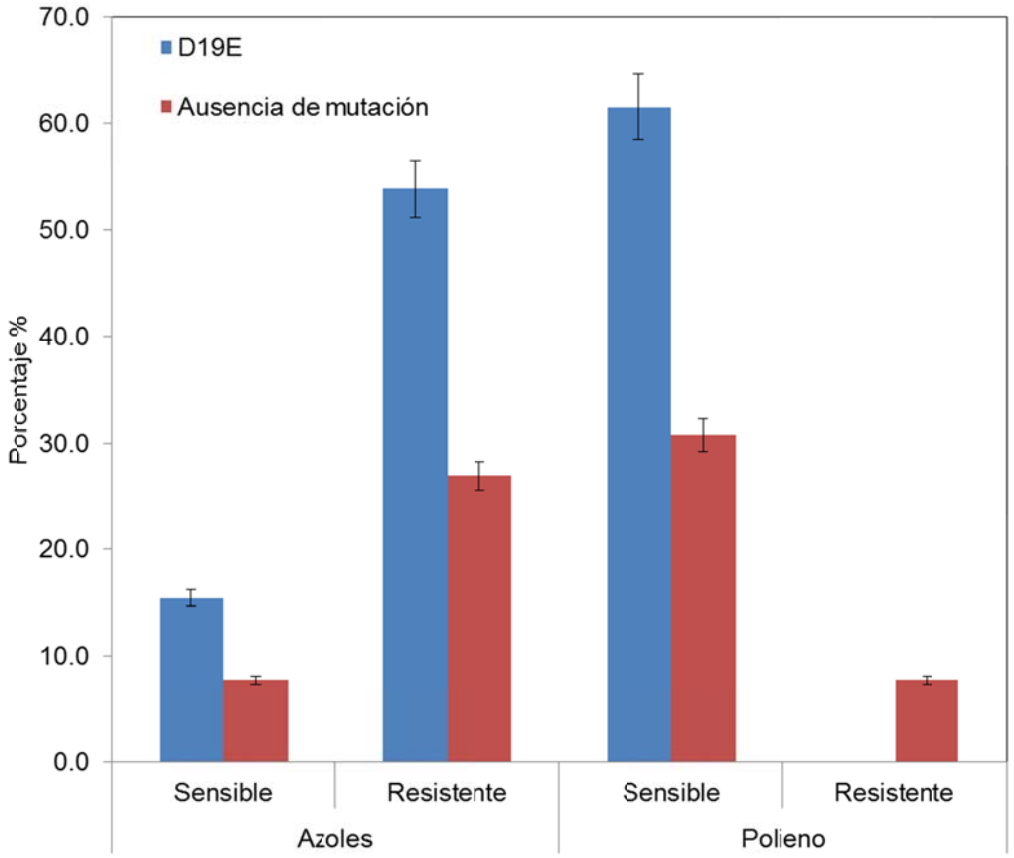

***Figura 33**. Distribución de la sensibilidad a los dos tipos diferentes de antifúngicos probados en relación con el diagnóstico de la mutación D19E en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 485 pb.*

Al realizar el análisis en cada uno de los antifúngicos observamos que las cepas resistentes al itraconazol y ketoconazol mostraron con más frecuencia la mutación, seguidas del miconazol y fluconazol, pero para el clotrimazol la mutación se presentó principalmente en los aislados sensibles al fármaco (Figura 34)

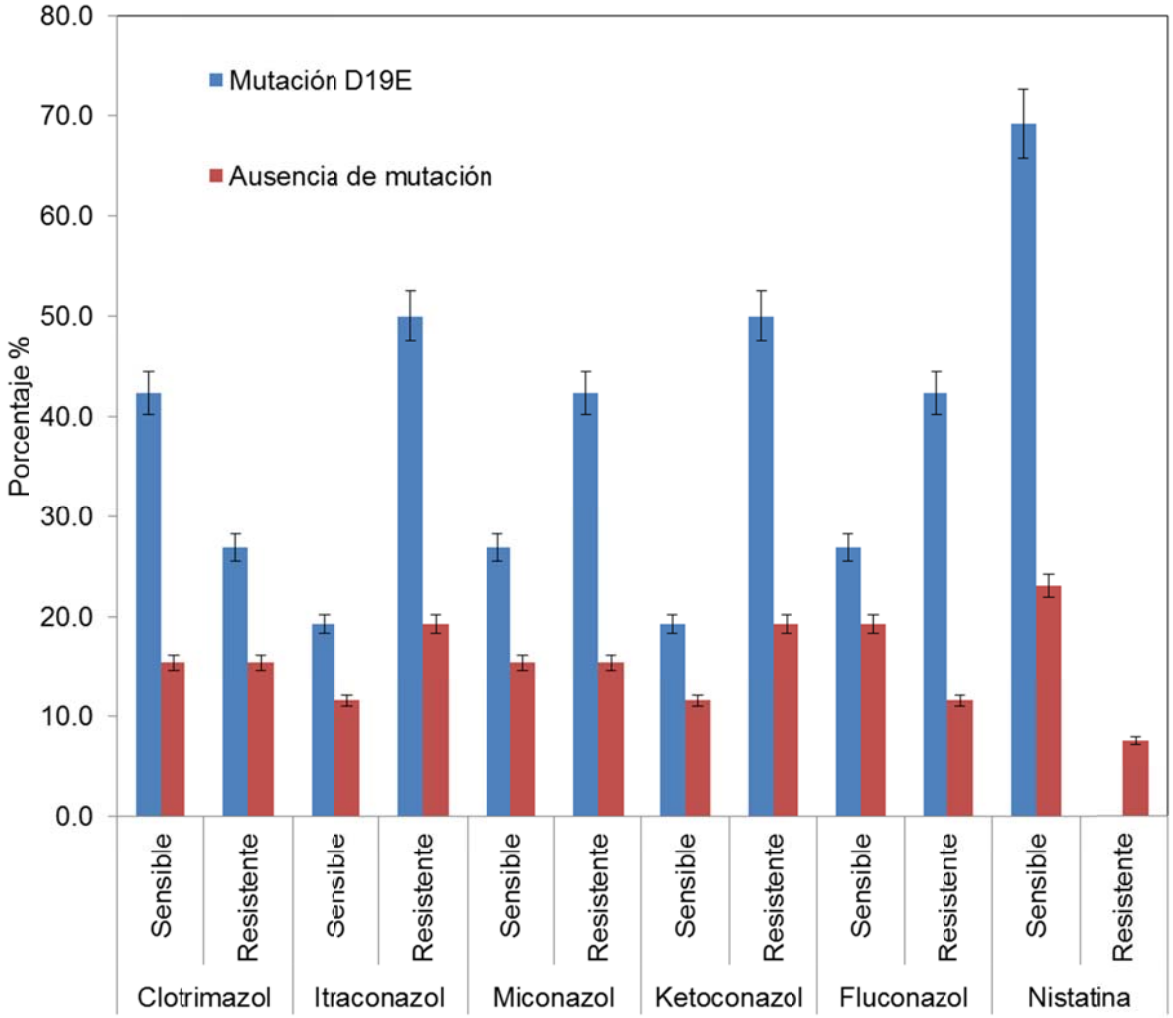

Figura 34. *Distribución de la sensibilidad a los diferentes antifúngicos probados en relación con el diagnóstico de la mutación D19E en Erg3p en las muestras aisladas de pacientes gineco-obstétricas. Se determinó ausencia de la mutación cuando el PCR no amplificó el fragmento de PCR de 485 pb.*

VIII. Discusión

En la actualidad en México los antifúngicos azólicos son el tratamiento de elección para la CV según la Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002. Esta norma indica que una vez identificada *C. albicans* por métodos microbiológicos o moleculares, el tratamiento a seguir es clotrimazol, itraconazol o fluconazol. No obstante, en las últimas décadas, se ha observado un desplazamiento de *C. albicans* como el principal agente involucrado, por cepas de la misma especie que han desarrollado resistencia o por especies de *Candida no albicans*, que son menos susceptibles a estos fármacos (Ventolini y Baggish, 2003, Sobel, 2007).

Tanto en este estudio como en uno previo realizados en la Ciudad de Ensenada, se encontró que *C. albicans* representa un poco más de la mitad de las especies encontradas en pacientes ginecológicas, seguido de *C. glabrata* con una frecuencia que va de entre el 30 y 40% y de manera curiosa, en este estudio no se encontró ninguna cepa de *C. tropicalis* que había ocupado el tercer lugar previamente (Arreola-Cruz, 2009), y en su lugar se asiló *C. parapsilosis*. La distribución de especies encontrada en este estudio y en el de Arreola-Cruz en el 2009, es similar a la de otros estudios como los realizados en la Ciudad de México, donde la distribución se encuentra en primer lugar *C. albicans,* en segundo lugar *C. glabrata*, y el tercer lugar corresponde a *C. tropicalis o C. parapsilosis* (González-Pedraza-Avilés *et al*., 1998, Rivera-Sánchez *et al*., 2006). Pero no concuerda con los datos reportados por Buitrón y colaboradores en México D.F. (2008), que mostraron a *C. albicans* como el principal agente causal de la CV, sin embargo en segundo lugar encontraron *a C. tropicalis*, en tercer lugar a *C. glabrata*, seguida de *C. krusei* y en último lugar de frecuencia

identificaron a *C. parapsilosis*. En otros países como Costa Rica (Gross *et al*., 2007) el principal agente etiológico aislado es *C. albicans* pero el segundo agente es *C. parapsilosis* seguido de *C. tropicalis* y por último *C. famata* y *C. glabrata*. Otro estudio realizado en el norte de la India (Mohanty *et al*., 2007) identificó a *C. glabrata* como la especie principal con un 50% de frecuencia, seguida de *C. albicans* con un 35% de frecuencia, *C. tropicalis* con un 10.8%, *C. krusei* con un 2.7% y *C. parapsilosis* con un 0.9% de frecuencia. En Iowa, USA dos años antes Richter y colaboradores (2005), había reportado a *C. albicans* como el primer agente causal de la CV, seguido por *C. glabrata, C. parapsilosis, C. krusei, Saccharomyces cerevisiae, C. tropicalis* en orden de frecuencia. Los hallazgos mencionados, hacen evidente el desplazamiento de *C. albicans* como el principal agente causal de la CV.

Por otro lado, la recomendación de la NOM sobre el uso de azoles para el tratamiento de la CV, resulta opuesta a los hallazgos de esta investigación, donde se observó una respuesta intermedia de 42% de las cepas y 42% de cepas con franca resistencia a los antifúngicos azólicos probados (clotrimazol, itraconazol, miconazol, ketoconazol, fluconazol y nistatina). Es importante resaltar, que los resultados intermedios son considerados como dosis-dependientes, por lo que para obtener una respuesta en las cepas probadas se tendría que incrementar la dosis del fármaco, esta situación es muy difícil de realizar en las pacientes ginecológicas debido a los efectos secundarios que estos medicamentos tiene principalmente a nivel hepático (Lumbreras *et al.,* 2003). Por lo que sumando ambos, resulta que sólo alrededor del 15% tienen posibilidades de responder adecuadamente al tratamiento con estos fármacos. Sin embargo, la respuesta a la nistatina fue contraria, sólo una de cada 20 es resistente al tratamiento.

El ketoconazol e itraconazol resultaron los menos eficaces para el control del crecimiento de las cepas de *Candida*. La sensibilidad a los antifúngicos azólicos se compara con la obtenida por Dalben y colaboradores en Brasil en el 2008, donde la prevalencia de cepas resistentes al ketoconazol estaba por arriba

del 40%, sin embargo la frecuencia de cepas con resistencia al itraconazol era más baja que la obtenida en este estudio. El mismo autor reportó cepas con sensibilidad intermedia o dosis dependiente a la nistatina, sin embargo en este estudio no encontramos cepas con sensibilidad intermedia a este fármaco, porque tan solo se aislaron dos cepas resistentes a este fármaco, esto puede ser debido a que el polieno es fungicida (mata a las levaduras antes que puedan adquirir resistencia) o por que conforme han pasado los años el uso de este antifúngico se ha sustituido por azoles. Richter y colaboradores (2005) encontraron que tanto las cepas de *Candida* que estudió, fueron resistentes en un 3.0% al fluconazol, el 16.2% presentó resistencia al itraconazol, pero del 94.3 al 98.0% fueron sensibles al ketoconazol, clotrimazol y miconazol, estos últimos datos no concuerdan con lo encontrado en la población de este estudio. En Costa Rica, se han reportado valores de sensibilidad a los azoles muy superiores a los este estudio, el 91% de los aislados vaginales fueron susceptibles al ketoconazol, el 96.5%, al fluconazol y 98% al itraconazol mientras que para el miconazol se obtuvo una susceptibilidad del 63%.

Al analizar la distribución de la resistencia por especies, se encontró que *C. glabrata* mostró una mayor resistencia a los antifúngicos en general. La alta resistencia de *C. glabrata* y *C. albicans* al ketoconazol, concuerda con lo descrito por Dalben y colaboradores (2008), en los aislamientos que evaluaron el antifúngico al que encontraron mayor resistencia, sin embargo, el itraconazol y el fluconazol mostraron índices de resistencia muy bajos (<10%) similar al caso de *C. albicans* en este estudio. Sin embargo en Brasil, Candido y colaboradores (1999) describieron de la misma manera un perfil de resistencia alto en las cepas de *C. albicans* tanto para el ketoconazol como para el itraconazol, pero determinaron que las cepas tenían mayor índice de resistencia al itraconazol que al ketoconazol y no encontraron cepas resistentes al fluconazol. De la misma manera, un estudio en Estados Unidos, donde se aislaron 401 cepas de *C. albicans* de pacientes con CV no se encontró ninguna resistente al fluconazol

(Sobel *et al*., 2003). Mathema y colaboradores (2001), observaron perfiles de resistencia por debajo de lo que encontramos con una prevalencia del 1.9% de cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol y una cepa con sensibilidad intermedia, nosotros aislamos aproximadamente un 5.0% de cepas resistentes al fluconazol y un 40.0% de cepas con sensibilidad intermedia. En lo referente a la nistatina, hay varios estudios que han reportado sensibilidad dosis dependiente a este fármaco en *C. albicans* (Consolaro *et al*., 2005; Richter *et al*., 2005; Dalben *et al*., 2008), a diferencia de este trabajo donde se observó un índice bajo de resistencia total pero ninguna cepa tuvo una respuesta intermedia, además que esta especie fue la única que mostro resistencia a este antifúngico.

En el caso de *C. glabrata* en la que encontramos que presenta más altos índices de resistencia y sensibilidad dosis dependiente (>40%) para los azoles, Buitrón y colaboradores (2009) en México y Ribeiro y colaboradores (2001) en Brasil observaron índices similares. Sin embargo, Ottero y colaboradores (1999) mostraron índices menores de resistencia al fluconazol en esta especie, que lo que se reporta en este estudio.

La respuesta a antifúngicos por las cepas de *C. parapsilosis* fue similar a lo reportado anteriormente ya que el miconazol es el fármaco del que mayor resistencia se ha obtenido, además en todos los reportes hay un acuerdo en que la sensibilidad al resto de azoles y la nistatina es alta (Richter *et al*., 2005; Gross *et al*., 2007).

Hay una gran discrepancia en los índices de resistencia a antifúngicos de acuerdo a la zona donde se evalúan, esto puede deberse a las políticas, normas y condiciones mediáticas que influyen en la decisión de cuales antifúngicos recetar en cada país, ciudad o institución, seguramente los antifúngicos mas recetados o los más vendidos son los que a la larga tendrán mayores índices de resistencia. A pesar de esta discrepancia geográfica, con los datos obtenidos en este trabajo se debe evaluar la conveniencia del uso del ketoconazol e itraconazol para el

tratamiento de las CV, así como también, considerar el retomar el uso de la nistatina, cuya sensibilidad sobrepasa por mucho la respuesta a los azoles, al menos en la población estudiada. Sin embargo, tendrá que probarse *in vivo* que los perfiles de resistencia y sensibilidad *in vitro* se mantienen.

Un hallazgo interesante fue que el promedio de edad de las pacientes portadoras de cepas resistentes fue más alto que el de las sensibles, aunque tan solo en el uso de dos fármacos fue significativo, esto probablemente tiene que ver con el tiempo de exposición a los antifúngicos, a mayor edad existe mayor probabilidad de haber tenido algún cuadro de CV y haber sido expuesta la paciente a algún tratamiento antifúngico lo que a su vez lleva a la selección de cepas resistente.

Algo inesperado fue el hecho de que las cepas de pacientes que utilizan anticonceptivos hormonales (debido a alteraciones hormonales y cambios en el pH que propicien el crecimiento de *Candida*) no tuvieron una resistencia significativa, Fosch y colaboradores en el 2006, encontraron que la mayoría de las pacientes con cepas resistentes utilizaban anticonceptivos hormonales. En un estudio llevado a cabo en Costa Rica (Gross *et al*., 2007), se encontraron resultados similares, los hormonales estaban entre los tres métodos más utilizados en pacientes con cepas resistentes. Sin embargo, el uso del condón y los métodos definitivos (asociados a edades mayores), también se encontraron en los primeros lugares, siendo estos métodos los que en este estudio se observaron con mayor frecuencia en las pacientes con cepas resistentes. El condón fue el reportado en primer lugar, tanto en nuestro estudio como en el de Gross y colaboradores (2007) y esto tiene que ver con las probabilidades de alterar las condiciones fisicoquímicas de la vagina utilizando métodos locales, que propician la presentación de infecciones y por consecuencia de tratamientos repetidos.

Alrededor de la mitad de las pacientes presentaron algún síntoma o signo de infección por *Candida*. Aunque se puede pensar que la magnitud de las

manifestaciones clínicas de un patógeno puede estar asociado a su respuesta al tratamiento, la presentación de síntomas, signos, el diagnóstico clínico de micosis y la presentación de recurrencias, no mostraron en este estudio ninguna relación significativa con la presentación de resistencia a los antifúngicos. La falta de relación de la CV recurrente con la resistencia, ya habían sido reportada con anterioridad (Fong *et al*., 1993; Richter *et al*., 2005) y se puede deber a alteraciones en la inmunidad celular local transitoria y no a la presentación de cepas especialmente virulentas y resistentes. Por otro lado, los aislados provenientes de pacientes sintomáticas en un 100% fueron resistentes y el 75% de las pacientes asintomáticas son portadoras de cepas resistentes, en otros estudios se reportan 21 a 32% de los casos de pacientes sintomáticas con cepas resistentes y 14% de pacientes asintomáticas portadoras de cepas resistentes (White *et al*., 1998). El signo más importante en las pacientes fue la leucorrea blanquecina, sin embargo no se relacionó con la resistencia a antifúngicos.

La resistencia a antifungicos se puede deber a mutaciones en el blanco de la droga, a la sobrexpresion del blanco de la dorga y también por una sobrerregulación de los transportadores que exportan la droga. Se ha descrito la importancia de los reguladores transcripcionales como Tac1p, Mrr1p, Upc2p en el desarrollo de la resistencia a antifúngicos, al descubrir mutaciónes que ocasionan la hiperactividad de estos y como consecuencia en el caso de UPC2 sobrexpresion del blanco de los azoles y de los genes ERG, TAC1 y MRR1 la sobrexpresion de transportadosres que exportan la droga del citoplasma (Oliver *et al*., 2007, Yan *et al*., 2008, Marie y White, 2009).

Al realizar el diagnóstico de la mutación G648D en UPC2 a través de técnicas moleculares, encontramos que se presentó en cepas resistentes y sensibles en proporciones similares. Debido a que *C. albicans* es diploide puede ser que esta mutación se encuentre presente en la mayoría de los aislados de *Candida* en uno de los alelos, pero cuando existe un consumo total de ergosterol causada por los azoles este alelo mutante será el que se exprese y producirá la

sobrexpresion constitutiva de ERG11, parecido a lo que indica Marie y White (2009), que la mutación se presenta durante la terapia antifungica. Otra de las mutaciones que se diagnosticaron, fue N977D en Tac1p, que está descrita por Yan y colaboradores (2008) como la responsable de la sobrexpresion de los transportadores de droga de union a ATP. Se identificó en el 65% de los aislados de *C. albicans*, pero no fue relevante con respecto a la resistencia a antifúngicos, debido a que también se identificó en aislados suceptibles a la droga. La mutación G977V en Mrr1p también se ha descrito como una mutación que promueve una sobrexpresión constitutiva de los transportadores principales de drogas, esta mutación no se diagnosticó en ninguno de los aisaldos de *C. albicans*, esto se puede deber a un error en el diseño de los cebadores o a que no es una mutación que se presente con frecuencia. Por otra parte se describió que la mutación D19E de ERG3 produce la inactivación de Erg3p y la acumulación de esteroles en la membrana que no son tóxicos para la célula al estar en contacto con antifúngicos azólicos (Yan *et al*., 2008). El diagnóstico de esta mutación se realizó en el 69.2% de las total de las cepas, el 53.8% de este diagnóstico provenian de cepas resistentes y el 15.4% de cepas sensibles. Si se toma a esta mutación como un factor que propicie la resistencia a antifúngico tal vez tenga que estar asociado con otros factores para que se pueda cambiar el fenotipo de la cepa a resistente.

La presencia de estas mutaciónes en las proteínas anteriormetne descritas, no predice la resistencia *in vitro* a los antifúngicos en este estudio. Puede ser que en conjunto estas mutaciones expresen un fenotipo de *C. albicans* resistente al tratamiento con antimicóticos o que las mutaciones esten en otros sitios que aun no han sido detectados, por lo que valdría la pena seguir en la búsqueda de mutaciones que esten presentes en las cepas de *C. albicans* aquí estudiadas. Cabe mencionar, que para poder encontrar estas mutaciones alternativas, se debe realizar la secuenciacion de los fragmetnos control obtenidos (Coste *et al*., 2006; Oliver *et al*., 2007; Morschhäuser *et al*., 2007; Znaidi *et al*., 2008, Schubert *et al*., 2008; Dunkel *et al*., 2008a; Dunkel *et al*., 2008b; Yan *et al*., 2008).

IX. Conclusiones

- *C. albicans* fue la especie aislada con más frecuencia, seguida de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en pacientes ginecológicas en Ensenada B. C.
- El 42% de los aislados de las pacientes gineco-obstétricas mostraron una sensibilidad dosis dependiente y otro 42% fueron resistentes a los antifúngicos azólicos.
- Se encontró que aproximadamente ~5% de *Candida* spp. mostraron resistencia a la nistatina.
- Los aislados de *Candida* spp. mostraron mayor resistencia al ketoconazol y al itraconazol.
- El 40% de los aislados fueron resistentes a todos los antimicóticos azólicos.
- Por especie, la *C. glabrata* mostró un índice de resistencia mayor, seguida de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
- La edad de las pacientes fue un factor que influyó en el índice de resistencia de los aislados de *Candida* spp a los antifúngicos.
- El uso del condón como método de planificación en las pacientes se asoció a portar cepas resistentes de *Candida*.
- Las mutaciones que se han descrito en los reguladores transcripcional Tac1p, Mrr1p, Upc2p, y en la enzima Erg3p no predijeron la resistencia a antifúngicos en la población estudiada.

X. Bibliografía

Arenas, R. 2008. Micología Médica Ilustrada. México: Mc Graw Hill. 425 pp.

Arreola-Cruz, A. A. 2009. Epidemiología molecular de *Candida* spp. en pacientes gineco-obstétricas. (Maestría en Ciencias-Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada). México.

Buitrón García, R., Bonifaz, A., Amancio Chassin, O., Basurto Kuba, E., Araiza, J., y Romero Cabello, R. 2007. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. Ginecología y Obstetricia de México. 75:68-72.

Buitrón García-Figueroa, R., Araiza-Santibañez, J., Basurto-Kuba, E., y Bonifaz-Trujillo, A. 2009. *Candida glabrata*: un oportunista emergente en vulvovaginitis. Cirugía y Cirujanos. 77:455-460.

Calvo, M. C. 2001. Micosis más frecuentes en nuestro medio. Revista Iberoamericana de Micología. 2:1-15.

Candido, R. C., Torqueti Toloi, M. R., Franceschini, S. A., Ramos G. F, y Manini Minto, E. C. 1999. *In vitro* activity of antimycotic agents determined by E-test method against vaginal *Candida* species. Mycopathologia. 144:15-20.

Carrillo-Muñoz A. J. y Tur-Tur C. 1997. *Candida* spp y micosis superficiales. Actualidad Dermatológica. 6:463-472.

Ciudad-Reynaud, A. 2007. Infecciones vaginales por *Candida*: Diagnóstico y Tratamiento. Revista de Perinatología y Gineco-obstetricia. 53:159-166.

Consolaro, M. E. L., Albertoni, T. A., Svidzinski, A. E., Peralta, R. M. y Svidzinki, T. I. E. 2005. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. Mycopathologia.159:501–507.

Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M.-E. y dÉnfert, C. 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. Eukaryotic Cell. 6(10):1889-1904.

Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhäuser, J., Forche, A. y Selmecki, A. 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is

coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. Genetics. 172:2139-2156.

Cowen, L. E. 2008. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. Nature Review. 6:187-198.

Dalben, D. K. F., Suemi, S. C., Patussi, E. V., Lopes, C. M. E. y Estivalet, S. T. I. 2008. Susceptibilidad de levaduras vaginales a los antifúngicos más utilizados en Maringá, Paraná, Brasil. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 42(4):461-6.

Dunkel, N., Blab, J., Rogers, P. D. y Morschhäuser, J. 2008. Mutation in the multidrug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. Molecular Microbiology. 69(4):827-840.

Dunkel, N., T.Liu, T., S. Barker, K., Homayouni, R., Morschhäuser, J. y Rogers, P. D. 2008. A Gain-of-funtion mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of the Ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. Eukaryotic Cell. 7(7):1180-1190.

Faro, S., Apuzzio, J., Bohannon, N., Elliott, K., Martens, M. G., Mou, S. S., Phillips-Smith, L. E., Soper, D., Strayer, A. y Young, R. L. 1997. Treatment considerations in vulvovaginal candidiasis. The Female Patient. 22:1-17.

Favre, B., Didmon, M. y Ryder, N. S. 1999. Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α-demetylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. Microbiology. 145:2715-2725.

Fernández Alonso, R., González García, E., Fernández García, J. y Cepeda Piorno, F. J. 2005. Fármacos antifúngicos. Situación actual y pautas para su administración. Clinical and Translational Oncología. 7(9):377-388.

Fidel, P.L. Jr. y Sobel J.D. 1996. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clinical Microbiology Reviews. 9:335–348.

Fidel, P. L., Vazquez, J. A. y Sobel, J. 1999. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. Clinical Microbiology Reviews. 12(1):80-96.

Flores-Paz, R., Rivera-Sánchez, R., García-Jiménez, E. y Arriaga-Alba, M. 2003. Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. Salud Pública de México. 5:694-697.

Fong, I. W., Bannatyne, R. M. y Wong, P. 1993. Lack of *in vitro* resistance of *Candida* albicans to ketoconazole, itraconazole and clotrimazole in woman treated for recurrent vaginal candidiasis. Genitourinary Medicine. 69:44-46.

Fosch, S., Fogolín, N., Azzaroni, E., Pairetti, N., Minacori, D., Tita, I., Redona, M. y Gribaudo, G. 2006. Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, aspectos clínicos y estudios microbiológicos. Revista Argentina de Microbiología. 38:202-205.

García Heredia, M., García, S. D., Copolillo, E., Cora Eliseth, M., Barata, A., Vay, C., de Torres, R. A., Tiraboschi, N. y Famiglietti, M. R. 2006. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. Revista Argentina de Microbiología. 38:9-12.

García, R. B. 2007. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. Ginecología y Obstetricia de México. 75:68-72.

González-Pedraza-Avilés, A., Ortiz Zaragoza, C., Inzunza Montiel, A. E. y Ponce-Rosas, E. R. 1998. Candidiasis vaginal: diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención médica. Atención Primaria. 21:395-8.

Gross, N. T., Arias, M., Moraga, M., Baddasarow, Y. y Jarstrand, C. 2007. Species Distribution and susceptibility to Azoles of Vaginal Yeasts Isolated Prostitutes. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2007:1-5.

Guevara, J., Bejar, V., Cáceres, A. y Valencia, E. 2000. Variedades de *Candida* en mujeres con flujo vaginal anormal. Anales de la Facultad de Medicina. 61 (1):51-54.

Harry, J. B., Oliver, B. G., Song, J. L., Silver, P. M., Little, J. T., Choiniere, J. y White, T. 2005. Drug- Induced regulation of the MDR1 promoter in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49 (7):2785-2792.

Holt, R. J., y Azmi, A. 1978. Miconazole-resistant *Candida*. Lancet 311(8054):50–51.

Hurley, R. y Louvois, J., 1979. *Candida* vaginitis. Postgraduate Medical Journal. 55:645-647.

James. T., Kauff. F., Schoch. C., Matheny. P.,Hofstetter, V., Cox, C., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsc, H., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A., Amtoft, A., Stajich, J., Hosaka, K., Sung, G., Johnson, D., Rouke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J., Slot, J., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P., Powell, M., Taylor Wang, Z., Wilson, A., Schübler, A., Longcore, J., O´Donell, K., Taylor, J., White, M., Griffth, G., Davies, D., Humber, R., Morton, J., Sugiyama, J., Rossman, A., Roger, J., Pfister, D.,

Hewitt, D., Hansen, K., Hambelton, S., Shomaker, R., Serdani, M., Crous, P., Hughes, K., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G.,Untereiner, W., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibett, D., Lutzoni, F., Mclaughlin, D., Spatafora, J. y Vilgalys, R. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 443: 818-822.

Jackson, S. T., Mulling, A. M., Rainford, L., y Miller, A., 2005. The epidemiology of mycotic vulvovaginitis and the use of antifungal agents in suspected mycotic vulvovaginitis and its implication for clinical practice. Western Indian medical Journal. 54:192-195.

López-Martínez, R., Ruiz- Sánchez, D., y Vértiz-Chávez, E., 1984. Vaginal candidosis. Mycopathologia. 85:167-170.

Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. y Kelly, S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends in Molecular Medicine. 2(2):76-81.

Lumbreras, C., Lizasoain, M. y Aguado, J. M. 2003. Antifúngicos de uso sistémico. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 21(7):366-80.

Marie, C. y White, T. C. 2009. Genetic Basis of Antifungal Drug Resistance. Genomics and Pathogenesis. 3:163-169.

Martínez-Ojeda, M., Saldaña-Gonzalez, J. y Sánchez-Hernández, M. A. 2007. Criterios para el diagnóstico de cervicovaginitis aplicados en el primer nivel de atención. Correlación con la norma oficial mexicana. Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social. 45(3):249-254.

Mathema, B., Cross, E., Dun, E., Park, S., Bedell, J., Slade, B., Williams, M., Rikey, L., Chaturvedi, V., y Perlin, D. S. 2001. Prevalence of vaginal colonization by Drug-Resistance *Candida* species in college-age women with previous exposure to Over-the-counter azole antifungal. Clinical Infection Disease. 33:23-27.

Mohanty, S., Xess, I., Hassan, F., Kapil, A., Mittal, S. y Tolosa, J. E. 2007. Prevalence y Susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. Indian Journal of Medical Research. 126:216-219.

Morschhäuser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., Blab-Warmuth, J., Homauouni, R. y Rogers, P. D. 2007. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 eflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. Pathogens 3(11):1603-1616.

Nabham, D. A. 2006. Vulvovaginal Candidiasis. Ain Shams Journal of Obstetrics and Gynecology. 3:73-78.

Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M. y Andes, D. 2007. Putative Role of β-1,3 Glucans in *Candida albicans* biofilms resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51 (2):510-520.

Newton, C. R., Graham, A., Heptmstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C. y Markham, A. F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res. 17:2503-2516.

Noriega-Irondo, M. F., Vázquez-Elizondo, G. y Carrillo-Esper, R. 2008. El espectro de la candidiasis en la unidad de terapia intensiva. Revista de Investigación Médica Sur de México. 15:200-208.

Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002. Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/039ssa202.html

Oliver, B. G., Song, J. L., Choiniere, J. H. y White, T. 2007. Cis-Actings Elements within the *Candida* albicans ERG11 promoter mediate the azole response through Transcription factor Upc2p. Eukaryotic Cell. 6(12):2231-2239.

Otero, L., Fleites, A., Méndez, F.J., Palacio, V., y Vázquez, F. 1999. Susceptibility of *Candida species* isolated from female prostitutes with vulvovaginitis to antifungal agents and boric acid. European Journal of Microbiology and infectious Disease. 18: 59-61.

Perlin, D. S. 2009. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward?. Current Opinion in Infectious Diseases. 22:568-573.

Pimentel-Sarzuri, D. B. y Reynolds-M, D. E. 2007. Candidiasis Vaginal. Revista Paceña de Medicina Familiar. 4:121-127.

Ramírez, J. F. y de la Torre, A. 2008. Evaluación de los cebadores ITS3 e ITS4 para la detección de infecciones por *Candida* spp. en muestras de flujo vaginal y humor acuoso. Asociación Colombiana de Infectología. 12(2):332-339.

Ribeiro, M. A., Dietze, R., Paula, C. R., Matta, D. A. y Colombo, A. L. 2000. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. Mycopathologia. 151:5-10.

Richter, S., Galask, R. P., Messer, S. A., Hollis, R. J., Diekema, D. J. y Pfaller, M. A. 2005. Antifungal Susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. Journal of Clinical Microbiology. 43 (5):2155-2162.

Rivera-Sánchez, R., Flores-Paz, R. y Arriaga-Alba, M. 2006. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 24(10):634-636.

Robledo-Leal, E. R. 2009. Análisis de expresión genética en cepas de *Candida albicans* con diferente susceptibilidad al fluconazol.(Maestría en ciencias-Universidad Autónoma de Nuevo León). 1- 75.

Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D. y Bille, J. 2003. *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47:2404-2412.

Sanglard, D. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 20:225-34.

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J. L., Monod, M. y Bille, J. 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39 (11):2378-2386.

Schubert, S., Rogers, P.D. y Morschhäuser, J. 2008. Gain-of-function mutation in the transcription factor MRR1 are responsible for overexpression of the efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dublinensis* strain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52(12):4274-4280.

Sobel, J. 1997. Vaginitis. New England Journal of Medicine. 337:1896-1903.

Sobel, J. 1999. Vulvovaginitis and Healthy women. Comprehensive Therapy Journal. 25:335-46.

Sobel, J. D., Zervos, M., Reed, B.D., Hooton, T., Soper, D., Nyirjesy, P., Heine, M., Willems, J. y Panzer, H. 2003. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 47(1):34-38.

Sobel, J. D. 2007. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 369:1961–1971.

Sterling, T.R. y Merz, W.G., 1998. Resistance to amphotericin B: emerging clinical and microbiological patterns. Drug Resistence Update. 1:161–165.

Tortorano, A. M., Pirigitano, A., Biraghi, E. y Viviani, M. A. 2005. The European confederation of medical mycology survey of candidiemia in Italy: *in vitro* susceptibility of 375 *Candida* albicans isolates and biofilm production. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56:777-779.

Vanden Bossche, H. 1997. Mechanisms of antifungal resistance. Revista Iberoamericana de Micología. 14:44-49.

Vargas-Montiel, D. H. 2004. Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. Dermatología Venezolana. 42:4-18.

Ventolini, G. y Baggish, M., 2003. Recurrent fungal vulvovaginitis and its association with bacterial colonization. Journal of gynecologic surgery. 19:154-156.

Vermitsky, H. P. 2008. Survey of Vaginal-Flora *Candida* Species Isolated from Women of Different Age Groups by Use of Species-Specific PCR Detection. Journal of Clinical Microbiology. 46:1501-1503.

Villanueva-Reyes, J. y Arenas, R. 2003. Candidiasis mucocutánea. Revista Mexicana de Micología. 25:91-104.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M. A., Innis, Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., y White, T. J. (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York. 315-322 pp.

White, T. C., Marr, K. A. y Bowden, R. A. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical Microbiology. 11(2):382-402.

Yan, L., Zhang, J., Li, M., Cao, Y., Xu, Z., Cao, Y., Gao, P., Wang, Y., y Jiang, Y., 2008. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida* albicans strain. Acta Biochimestry Biophysics Sin. 40(12):1048-1060.

Znaidi, S., Weber, S., Al-Abdin, O. Z., Bomme, P., Saidane, S., Drouin, S., Lemieux, S. y De Deken, X. 2008. Genomewide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. Eukaryotic Cell. 7(5):836-847.