

TESIS DEFENDIDA POR
ROSA ANGELINA LÓPEZ CARRASCO
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Miembro del Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
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**

**Comparación de dos métodos moleculares para la
identificación rápida de especies del género *Candida* en muestras
vaginales**

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ROSA ANGELINA LÓPEZ CARRASCO

Ensenada, Baja California, México, noviembre de 2010.

RESUMEN de la tesis de **Rosa Angelina López Carrasco**, 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.

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA* DE MUESTRAS VAGINALES

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Director de Tesis

La candidiasis vulvovaginal es una infección común, que afecta a una gran proporción de mujeres, causada por especies oportunistas de *Candida*, típicamente *Candida albicans*. En las últimas dos décadas, se ha observado un cambio en las especies de *Candida*. Con la introducción de azoles de segunda generación, el porcentaje de estas especies aumento al 40-60% de las reportadas en casos de enfermedad masiva. La posibilidad de tener diferentes especies de *Candida* responsables de las infecciones y que además tienen respuestas diferentes al tratamiento con antimicóticos, ha promovido que desde los 90's, se hayan desarrollado varios métodos moleculares de diagnóstico, que detectan secuencias genómicas especie-específicas de *Candida spp*. En este trabajo se estandarizó un método de PCR múltiple para la identificación de especies del género *Candida* en aislamientos procedentes de pacientes ginecológicas de la Ciudad de Ensenada. Para este PCR múltiple se probaron y diseñaron oligonucleótidos generales y específicos para diferenciar las cuatro especies más frecuentes de *Candida* en infecciones vaginales. Se realizaron distintos tipos de pruebas con la mezcla de oligonucleótidos para estandarizar el método de PCR. Después de completadas las pruebas se utilizó para identificar especies de *Candida* provenientes de pacientes ginecológicas. Este método identifico que 66% corresponden a *C. albicans*, 26.4% a *C. glabrata* y 7.5% a *C. parapsilosis*. Comparando este método con el PCR-RFLP se obtuvo una coincidencia en el diagnóstico de especie en el 92.4% de los casos. El método de PCR múltiple proporcionó resultados en un tiempo menor (5 horas) que el PCR-RFLP (9 horas). Además el costo del PCR múltiple es menor.

Palabras Clave: *Candida*, Candidiasis vaginal, PCR múltiple

ABSTRACT of the thesis presented by **Rosa Angelina López Carrasco** as a partial requirement to obtain the MASTER IN SCIENCE degree in LIFE SCIENCES with orientation in MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California, November 2010.

COMPARISON OF TWO MOLECULAR METHODS FOR THE RAPID IDENTIFICATION OF *CANDIDA* SPECIES FROM VAGINAL ISOLATES

Vulvovaginal candidiasis is a common infection, which affects a large proportion of healthy women, caused by opportunistic species of *Candida*, typically *Candida albicans*. In the past two decades, there has been a change in the *Candida* species causing invasive disease. With the introduction of second-generation azole, the percentage of this species increased to 40-60% of reported cases of massive disease. The possibility of different species of *Candida* responsible for infection and also have different responses to treatment with antifungal, has promoted since the 90's, the developed several molecular diagnostic methods that detect genomic sequences species-specific *Candida spp* in order to obtain a diagnosis feasible, fast and secure. The PCR-based methods show a clearer sensitivity on identification that in cultures. In this work we standardized a PCR multiplex method for identification of *Candida* species isolates from gynecological patients in Ensenada. For this method, general and specific primer sets for *Candida* were designed and tested. This method identified that 66% belong to *C. albicans*, 26.4% to *C. glabrata*, and 7.5% to *C. parapsilosis*. The comparison of PCR multiplex and PCR-RFLP showed a coincidence of 92.4% in the species identified, nevertheless the PCR multiplex gave the result faster and at a lower cost. We conclude that the method evaluated is a feasible, reliable and quick identification method of *Candida* at level species.

Keywords: *Candida*, vaginal Candidiasis, PCR multiplex

DEDICATORIAS

“La familia proporciona unos valores que quedan para toda tu vida.
Una familia unida y llena de amor es un lujo difícil de conseguir”

Daryl Hannah

A mis padres: Armida y Clemente

A mis hermanos: Alonso, Leonardo, Carlos, Fabiola y Marisol

A mis hermosas: Dharma y Dhyana

LOS AMO ❤️

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por proporcionarme la beca durante estos dos años para la realización de la tesis.

Al CICESE por aceptarme, por prestarme sus instalaciones para la realización de este trabajo y por la prórroga de beca para los últimos meses.

A mi directora de tesis, la Dra. Rosa R. Mouriño Pérez por aceptarme para ser una ardilla en su grupo, por las asesorías brindadas para este trabajo, por su ayuda para resolver los problemas que se presentaron y por todos sus consejos tanto profesionales como personales.

Al Dr. José Juan Godínez Montaña por el apoyo en la toma de muestras que se usaron en este trabajo.

A mis sinodales: La Dra. Rufina Hernández y el Dr. Ernesto García, por sus valiosas aportaciones a este trabajo, las observaciones para mejorarlo y el empeño brindado en las revisiones.

A la M. en C. Olga Callejas por todas las asesorías, ayuda y consejos para que este trabajo terminara lo mejor posible. Gracias por dejarme dormir en tu casa a las 2 de la mañana y el sándwich de la mañana.

A mis padres Armida y Clemente que SIEMPRE me han apoyado en TODOS los sentidos, a veces muy a su pesar, porque me imagino que es difícil

ver como un hijo se va de casa, pero estoy casi segura que el vacío que se forma se llena plenamente de orgullo por los éxitos que se obtienen.

A mis hermanos Alonso, Leonardo, Carlos, Fabiola y Marisol y aquí incluyo a mi cuñada Karina. Por toda la comprensión que esto necesita, por todo el apoyo que me brindan, las palabras de aliento y el ánimo. Claro que también por sus bromas, reclamos y celos porque me hacen reír mucho.

A mis sobrinas Dharma y Dhyana que me sacan canas verdes, pero que desde el día que cada una de ellas nació me han causado una felicidad enorme cada vez que estoy con ellas. Convivir con la inocencia que solo tienes cuando eres niño es un enorme don del cual puedo disfrutar.

A mis tíos Gloria y Efraín y a sus dos retoños Erika y Efraín que me brindaron las puertas de su casa desde hace 8 años, me apoyaron y me animaron en cada uno de mis proyectos.

A Pepe por contagiarme de ese goce que es aprender algo nuevo todos los días, por introducirme al micromundo micológico y todo su apoyo y cariño incondicional. A mi tía Lupita por su cariño, su apoyo y sus consejos, por estar ahí.

A todos mis tíos, tías, primos, primas que de alguna u otra manera preguntan por las cosas que estoy haciendo y que envían sus buenos deseos para que todo salga bien.

A la Sra. Jenny, el Sr. Yaki y Erica, que me apoyaron y echaron porras por muchos años, me hicieron sentir parte de su familia y lo aprecio mucho. Gracias porque todavía sigo sintiendo ese apoyo y ese cariño.

A todos mis amigos, los verdaderos amigos, que siempre tienen palabras de ánimo, de aliento, de apoyo, que me han ayudado de diferentes maneras a salir adelante, que ofrecen su mano cuando estoy cayendo u ofrecen su hombro para algún consuelo. Incluso ofrecen su casa para ayudarme. A mis antiguos amigos de

biología, a los nuevos amigos que hice y a esos que la amistad se hizo más fuerte, los cuales me han ayudado desde traducir una palabra hasta acompañarme toda la noche para que una exposición salga excelente. A todos ellos: Rosita, Oscar, Liss, Ariana, Caro, Cesar, Plata, Osmin, Ananda, Haydee, Dante, Fernanda, Sergio, Aimee, Diego, Jovis, Ramón, Mario, Jando, Isadora, Nacho, Carmen, Puebla, Karla, Oscar J, Javo, Mata, Ale, Flor, Claudia, Ana, Lisandro y Naidy. Gracias por todo. Por todas las risas, los abrazos de oso, las conbebencias, las porras, TODO.

A mis compañeros de laboratorio Roxy, Adriana, Leonora, Lili, Lolis, Luis, Ofelia, Eddy, que les pregunte algo en algún momento, me contestaron, que si no sabía usar algo, me enseñaron (aunque solo fuera un: pícale aquí), que si pedí salir a bailar para desestresarme, salimos.

A mis amigos de Mexicali Alex, Luz, Salvador, Dareli, Lorena, Roge, José Luis, Julia, Everth, Betty, Laura, Vita, Claudia, Mónica, Emir, Elisa, que siempre envían buenas vibras y deseos, que la distancia no es nada para la amistad.

A la secretaria Adriana Mejía que está llena de paciencia para tanta duda. No sé pero yo pienso que era mucha pregunta, pero siempre contesto muy amablemente.

Al técnico Guillermo González que también respondió muchas preguntas y dudas cuando recién llegue y por aguantar que a veces no me pusiera la bata.

A esa persona que está leyendo y que quizá se sintió mal porque no vio su nombre, no te preocupes: GRACIAS! (listo).

“La única persona que permito decirme que no puedo hacer algo, soy yo”

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 El género <i>Candida</i>	5
II.2 Las especies de <i>Candida</i>	8
II.3 Candidiasis	10
II.4 Epidemiología de la candidiasis	12
II.5 Métodos de identificación convencionales y moleculares	13
III. JUSTIFICACION	22
IV. OBJETIVOS	24
IV.1 OBJETIVO GENERAL	24
IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24

CONTENIDO (continuación)

V. MATERIALES Y METODOS	25
V.1 Diseño Metodológico.....	25
V.2 Cepas y condiciones de cultivo	26
V.3 Oligonucleótidos.....	26
V.4 Condiciones de reacción para PCR	26
V.5 PCR para cepas de referencia.....	27
V.6 Análisis de fragmentos por electroforesis	29
V.7 Pruebas de estandarización de PCR múltiple.....	29
V.8 Toma de muestras	30
V.9 Procesamiento de muestras.....	30
V.10 Extracción DNA.....	31
V.11 Técnica de PCR-RFLP	31
VI. RESULTADOS	34
VI.1 Estandarización de PCR múltiple.....	34
VI.2 PCR múltiple para muestras ambientales	43
VI.3 PCR-RFLP a muestras ambientales	44
VI.4 Comparación de resultados de PCR múltiple y PCR-RFLP	46
VII.5 Costo y tiempo	48
VII. DISCUSION	50
VIII. CONCLUSIONES	54
IX. REFERENCIAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Blastoconidias de C. tropicalis MYA-3404. A) Únicas, B) en cadenas, C) en grupos.</i>	7
2	<i>Diferencias morfológicas de las colonias y las células de las cepas de referencia de Candida utilizadas para este estudio, A-B) C. albicans, C-D) C. tropicalis, E-F) C. parapsilosis y G-H) C. glabrata. (cepario del laboratorio de la Dra. Rosa Mouriño del Departamento de Microbiología). Escala = 5 µm.</i>	10
3	<i>Regiones del operón DNA ribosomal, con los oligonucleótidos universales de amplificación. Modificado de Liguori, 2007</i>	18
4	<i>Secuencia de la región 18s-ITS1-5.8s-ITS2-28s de C. albicans IFM 49030 con los oligonucleótidos Ralb 1 en rojo (oligonucleótido sentido) y Ralb2 en azul (oligonucleótido antisentido)</i>	29
5	<i>Gradientes de los oligonucleótidos estudiados. A, ITS1-ITS2, B, ITS1-ITS4, C, CTR1-CTR2, D, Ralb1-Ralb2). Se utilizó la cepa de C. albicans SC5314 para A, B y D y la de C. tropicalis MYA-3404 para C. M es el marcador de peso molecular.</i>	35
6	<i>Gradiente del PCR múltiple (ITS1-ITS2, ITS1-ITS4, CA3-CA4, CTR1-CTR2) de la cepa de referencia C. albicans SC5413.</i>	36

LISTA DE FIGURAS (continuación)

7	<i>Fragmentos del producto PCR de los pares de oligonucleótidos. Ca: C. albicans, Cg: C. glabrata, Ct: C. tropicalis y Cp: C. parapsilosis. M es el marcador de peso molecular.</i>	36
8	<i>Patrón de bandas como resultado del PCR múltiple con los oligonucleótidos ITS1-ITS2, ITS1-ITS4, CTR1-CTR2, de las cepas de referencia. Ca (C. albicans) Cg (C. glabrata) Ct (C. tropicalis) y Cp (C. parapsilosis). M es el marcador de peso molecular.</i>	37
9	<i>Productos de PCR con el par de oligonucleótidos CA3-CA4 realizado en todas las cepas de referencia. Ca (C. albicans) Cg (C. glabrata) Ct (C. tropicalis) y Cp (C. parapsilosis). M es marcador de peso molecular.</i>	38
10	<i>Fragmento de amplificación con el par de oligonucleótidos Ralb1 y Ralb2. Ca (C. albicans) Cg (C. glabrata) Ct (C. tropicalis) y Cp (C. parapsilosis). M es marcador de peso molecular.</i>	39
11	<i>PCR múltiple de las cepas de referencia. Ca (C. albicans) Cg (C. glabrata) Ct (C. tropicalis) y Cp (C. parapsilosis). La flecha roja indica el tamaño 500pb.</i>	40
12	<i>Diferentes concentraciones de los oligonucleótidos Ralb1-Ralb2 amplificados en la cepa C. albicans SC5413. Los números indican las concentraciones en μM. M es marcador de peso molecular.</i>	41
13	<i>Gradiente de $MgCl_2$ realizados en la cepa de referencia C. albicans SC5413. Los números indican las concentraciones en mM. M es marcador de peso molecular.</i>	42
14	<i>PCR múltiple de las muestras colectadas del Hospital General de Ensenada. Los números indican el código de registro de las pacientes.</i>	43
15	<i>Porcentaje de las especies de Candida identificadas por el método de PCR múltiple.</i>	44

LISTA DE FIGURAS (continuación)

16	<i>PCR-RFLP de las muestras colectadas a pacientes ginecológicas del Hospital General de Ensenada.</i>	45
17	<i>Porcentaje de las especies identificadas por el método de PCR-RFLP de las muestras colectadas en el Hospital General de Ensenada.</i>	46
18	<i>Porcentaje de diagnósticos de especies que coinciden y no coinciden entre el PCR-RFLP y el PCR múltiple.</i>	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	<i>Principales características diferenciales entre C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis y C. parapsilosis</i>	9
II	<i>Descripción de los oligonucleótidos seleccionados para el PCR-múltiple</i>	26
III	<i>Tamaños amplificados esperados de acuerdo a los pares de oligonucleótidos utilizados</i>	28
IV	<i>Mezcla utilizada para la digestión enzimática de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.</i>	32
V	<i>Tamaños esperados después de la digestión enzimática con MspI</i>	33
VI	<i>Tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR con los pares de oligonucleótidos en las cepas de referencia.</i>	37
VII	<i>Fórmula final para la reacción de PCR múltiple</i>	42
VIII	<i>Comparación de las especies identificadas por los dos métodos moleculares utilizados en este trabajo</i>	48

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por hongos oportunistas se dan en hospederos con diversos grados de inmunodeficiencias, o cuando se presentan cambios ambientales que las favorecen. Pueden ser producidas por un gran número de géneros, entre los que se encuentran los hongos de la biota normal de la piel o las mucosas. Un microorganismo que es parte de la biota normal en humanos y que puede convertirse en patógeno es el género *Candida*. Este organismo causa tanto candidiasis superficiales como invasivas.

La candidiasis es una micosis primaria o secundaria de distribución mundial, ocasionada por levaduras oportunistas endógenas, exógenas, o ambas. Puede afectar la piel y mucosas, diseminarse a los órganos internos y llegar a producir septicemias (Martínez *et al.*, 2008). El papel patogénico del género *Candida* depende de la pérdida del equilibrio entre el hospedero, la levadura y el microambiente. Por lo tanto, se tienen que considerar cuatro factores principales para que *Candida* pase de un estado comensal a parásito:

1) los factores de virulencia de la levadura, que le confieren la capacidad de adhesión y de crecimiento,

2) los factores predisponentes del hospedero, incluyendo las alteraciones de la barrera fisiológica, alteraciones hormonales y de la respuesta inmune,

3) la influencia de otros microorganismos sobre la población de *Candida* y

4) Otros factores externos que también podrían jugar un papel determinante son el pH y la temperatura. (Stine, 2008).

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección común que afecta a una gran proporción de mujeres sanas. Es causada por especies oportunistas de *Candida*, típicamente *Candida albicans* (Cassone *et al.*, 2007; Domino *et al.*, 2009). Esta especie presenta resistencia a los antifúngicos como los azoles, especialmente fluconazol e itraconazol, lo que hace que los tratamientos para la candidiasis vaginal no sean del todo exitosos y por consecuencia aumente la probabilidad de alguna recidiva (Liu *et al.*, 2009). En las últimas dos décadas se ha observado un cambio en las especies de *Candida* causantes de enfermedades invasivas. Anteriormente las especies *no-albicans* representaban un 20% de los hongos aislados en sangre (Chang-Chang *et al.*, 2001). Con la introducción de azoles de segunda generación, el porcentaje de estas especies aumentó hasta un 40 a 60% de las reportadas en casos de enfermedad masiva.

En el estudio realizado por Arreola-Cruz (2009) en pacientes ginecológicas de la Ciudad de Ensenada, B.C. se reportó que el 42.1% de las pacientes evaluadas fueron portadoras de alguna especie de *Candida*. De estas, la más frecuente fue *C. albicans*, seguida por *Candida glabrata* y finalmente por *Candida tropicalis*. Además, en el 15.2% de las portadoras se aisló DNA de dos tipos de levaduras con asociación *C. albicans-C. glabrata* y *C. glabrata-C. tropicalis*.

La posibilidad de tener diferentes especies de *Candida* responsables de las infecciones y que además tienen respuestas diferentes al tratamiento con antimicóticos, ha ocasionado que desde los 90's, se hayan desarrollado varios métodos moleculares de diagnóstico, que detectan secuencias genómicas específicas para diferentes especies de *Candida* con el objetivo de obtener un diagnóstico factible, rápido y seguro. Los métodos basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-*Polymerase Chain Reaction* por sus siglas en inglés) muestran una sensibilidad más clara de identificación que los cultivos.

Varios protocolos de PCR llevan a la detección e identificación de especies de *Candida* en menos de 24 h (Méndez *et al.*, 2007).

Ante la necesidad de contar con un método rápido y confiable para la identificación de especies del genero *Candida* se llevó a cabo un estudio para desarrollar un método molecular basado en PCR múltiple y compararlo con un método molecular ya validado de PCR-RFLP para ser utilizado en muestras de exudado vaginal de pacientes ginecológicas.

II. ANTECEDENTES

Los hongos tienen una distribución mundial y crecen en una gran variedad de hábitats, incluyendo los ambientes extremos. Se han descrito alrededor de 100,000 especies de hongos, pero la biodiversidad del reino fungi aún no es totalmente conocida (Muller, 2007). Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas que incluyen a las levaduras, los mohos, así como las setas (macromicetos) (Bial, 2002). Son productores de esporas, aclorofilos, cuya reproducción es sexual y/o asexual. Sus estructuras somáticas, que son usualmente filamentosas y ramificadas, están rodeadas por una pared celular que contiene celulosa o quitina, o ambas (Alexopoulos, 1977). Estos microorganismos obtienen sus nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimoheterótrofo, esto es que, obtienen su energía y el carbono de compuestos orgánicos que fueron sintetizados por otros organismos (Bial, 2002). La filogenia de este reino, la cual está basada en el estudio de la secuenciación de seis genes, los cuales son 18S rRNA, 28S rRNA, 5.8S rRNA, EF1 α (Elongation factor 1 α por sus siglas en inglés) y las subunidades RPB1 y RPB2 de la RNA polimerasa, muestra cinco Phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota y Glomeromycota (James *et al.*, 2006). Estos microorganismos tienen muchos usos y aplicaciones importantes, desde los procesos de descomposición en los suelos hasta procesos biotecnológicos (Bial, 2002; Muller, 2006).

Los hongos presentan dos morfologías: filamentosas que es multicelular y levaduriforme que es unicelular. Los hongos filamentosos son aerobios, mientras

que los levaduriformes son anaerobios facultativos y sus requerimientos de temperatura son entre 10 y 40°C y de pH de 2 a 9 (Bial, 2002).

Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme por lo general dan lugar a colonias lisas en medios de cultivo sólido, las cuales son agregados de células individuales que se les denomina levaduras (Bial, 2002). Existen alrededor de 1,500 especies de levaduras descritas. La mayoría se reproduce asexualmente por gemación, sin embargo, algunas lo hacen por fisión binaria. Aunque son microorganismos unicelulares, algunas especies pueden ser multicelulares a través de la formación de pseudohifa. El tamaño de la levadura varía entre especies, típicamente miden entre 3 y 4 μm de diámetro, pero puede haber algunas especies que alcancen los 40 μm . La morfología de las levaduras, (pseudohifas, hifas verdaderas y/o clamidosporas), la forma y arreglo de las blastoconidias, así como las características de la colonia (coloración, textura, etc.) son utilizadas y complementadas con ensayos bioquímicos para identificarlas a nivel de género y especie (Larone, 2002).

II.1 El género *Candida*

La clasificación taxonómica de *Candida* es la siguiente:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*

Estas especies forman células levaduriformes por gemación, llamadas blastoconidias (3-6 μm de diámetro). Las células se presentan en forma aislada, en cadenas o en pequeños grupos (Figura 1), crecen en medios de cultivo rutinarios en los laboratorios clínicos, los cuales son: siembra de la muestra

colectada en medios como el Sabouraud, agar papa dextrosa, con posteriores pruebas como inducción de tubo germinativo, inducción de clamidoconidias o pruebas bioquímicas como asimilación o fermentación de azúcares (Rivero *et al.*, 2003).

El género *Candida* consiste en un grupo heterogéneo de especies de levaduras, que presentan dimorfismo, es decir, pueden formar pseudohifas e hifas verdaderas. *Candida* es el único hongo en el que la fase patógena es su etapa micelial, con la excepción de *C. glabrata* en la que no se ha observado formación de hifas. Los principales factores de virulencia asociados con *Candida* se relacionan con el dimorfismo, la secreción de enzimas, los cambios de fenotipo, la expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, la síntesis de adhesinas y la capacidad de formar biopelículas. Por distintos estudios de microscopía electrónica, se ha observado que existen diferencias en la organización y composición de la pared celular en las dos diferentes formas morfogénicas de esta levadura (Villanueva-Reyes y Arenas, 2007)



Figura 1. Blastoconidias de *C. tropicalis* MYA-3404. A) Únicas, B) en cadenas, C) en grupos.

Este género incluye cerca de 154 especies, de las que una decena son causantes de infecciones en el humano, seis son las aisladas más a menudo de infecciones humanas y son 3 ó 4 especies ocasionan más del 90 % de las candidiasis. Mientras *C. albicans* es la más prevalente, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y en menor frecuencia *C. krusei* y *C. lusitaniae* (Rivero *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Iglesias-Benavides *et al.*, 2007). Todas las levaduras patógenas de este género tienen características macro y microscópicas muy semejantes, por lo que se requiere de procedimientos de laboratorio especiales para su identificación.

II.2 Las especies de *Candida*

Candida albicans es el agente causal más común de candidiasis. Es una levadura de redonda a oval (3.5-7 X 4-8 μm) que forma pseudohifas e hifas verdaderas, además de clamidoconidias y tubo germinativo. Las colonias son blancas cremosas con un crecimiento de aproximadamente 3 d en medio Sabouraud a 37°C. Por otra parte, *C. glabrata*, es la levadura aislada con mayor frecuencia de candidiasis vaginal, después de *C. albicans*. Es la causante de infecciones usualmente en el torrente sanguíneo o en el tracto urogenital. En los últimos 10 años se ha considerado a esta levadura como un patógeno emergente, que presenta resistencia a la Anfotericina B y al fluconazol. Estas células ovals miden 2-3 X 4-5 μm y no se han observado pseudohifas. Las colonias son de color blanco a crema, pastosas y lisas con un crecimiento de 3 a 5 días en medio Sabouraud a 37°C. *Candida tropicalis* es causante de infecciones en pacientes inmunocomprometidos, y es particularmente virulenta en pacientes con leucemia o enfermedades similares. Son levaduras redondas de 3.5-7 X 5.5-10 μm , que pueden formar blastoconidias únicas o en pequeños grupos y pseudohifas largas en medios especiales. Raramente produce clamidosporas en forma de gota y las colonias son cremosas con bordes que pueden ser rugosos o tener una franja micelial ligera (Larone, 2002). *Candida parapsilosis* se asocia a infecciones en pacientes con debilidad del sistema inmune y con relativa frecuencia es causante de endocarditis por *Candida*. Son levaduras ovals de 3 X 8 μm y forman colonias cremosas que en ocasiones desarrollan un aspecto rugoso. *C. albicans* ha sido considerado el agente oportunista más importante de la CVV y continúa aislándose con más frecuencia. Sin embargo, estudios de los últimos 10 años demuestran un incremento en la incidencia de otras especies del género *Candida*, entre las que destacan *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Mendoza *et al.*, 1999; García-Heredia *et al.*, 2006; Buitrón-García *et al.*, 2009). De aislamientos vaginales, se encontró que *C. albicans* era resistente al fluconazol y exhibía una

elevada resistencia al itraconazol. En general, las especies de *Candida* presentan mayor resistencia a los azoles que a otros antimicóticos (Liu *et al.*, 2009).

Las especies patógenas de *Candida* comparten varias características microscópicas y fenotípicas que las hacen similares entre sí, con lo que se puede llegar a una identificación presuntiva de la levadura. Sin embargo también presentan ciertas particularidades, principalmente a nivel molecular, que facilitan su identificación a nivel de especie. (Tabla I y Figura 2).

Tabla I. Principales características diferenciales entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*

Característica	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Blastoconidios (µm)	3-7 X 3-14	2.5-4.5 X 4-6	3.5-7 X 5.5-10	3-4 X 5-8
Pseudohifas	+	-	+	+
Clamidoconidias	+	-	+/-	+
Número de cromosomas	7-9, diploide	11, haploide	5-6, diploide	14, diploide
Asimilación de azúcares	G,S,M,T,GA L	G,T,A	M,T,GAL	M,T,GAL
Color en medios cromogénicos				
CHROMagar®	verde	Lila-purpura	azul	Rosa pálido
<i>Candida</i> ID®	azul	blanco	rosa	blanco
Crecimiento en ciclohexamida 0.1%	+/-	-	-	-
Virulencia experimental	+++	+	++	+
Resistencia triazoles	+	+++		

G=glucosa, S=sacarosa, M=maltosa, T=trehalosa, GAL= galactosa, A= arabinosa; + positive, - negativo, +/- ocasional. Modificado de Buitrón-García *et al.*, 2009.

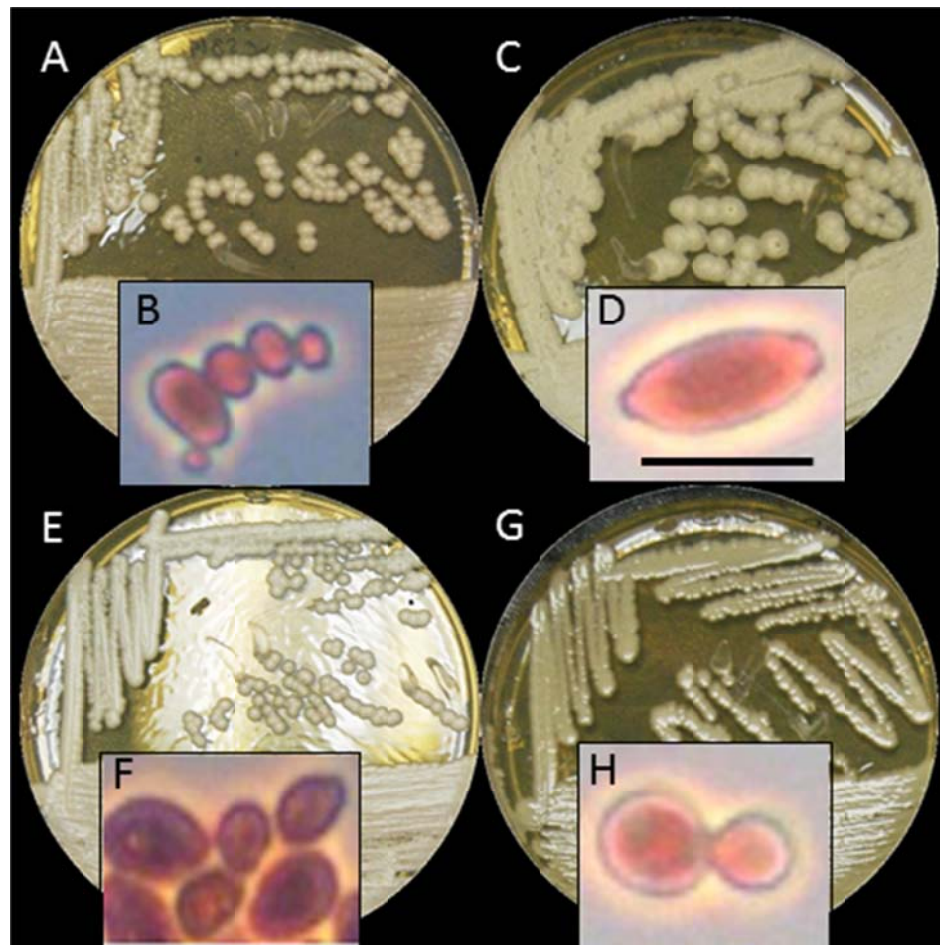


Figura 2. Diferencias morfológicas de las colonias y las células de las cepas de referencia de *Candida* utilizadas para este estudio, A-B) *C. albicans*, C-D) *C. tropicalis*, E-F) *C. parapsilosis* y G-H) *C. glabrata*. (cepario del laboratorio de la Dra. Rosa Mouriño del Departamento de Microbiología). Escala = 5 μ m.

II.3 Candidiasis

La candidiasis es una infección producida por especies de levaduras que pertenecen al género *Candida*. Estas especies colonizan superficies mucosas de las cavidades oral y vaginal y del tracto digestivo, además puede causar una variedad de infecciones, dependiendo de la naturaleza de los defectos del hospedero (Molero *et al.*, 1998).

Esta enfermedad puede tener un desarrollo agudo o crónico y puede clasificarse, de acuerdo a su localización en: candidiasis mucocutáneas la cual es una infección de las membranas mucosas, de la piel y las uñas, candidiasis sistémica o invasora que es una afección generalizada de órganos profundos y el síndrome de candidiasis diseminada (Villanueva-Reyes y Arenas, 2007). Por lo general, es necesario que ocurran alteraciones de los mecanismos de defensa y factores predisponentes que comprometan la integridad de los tegumentos o que alteren la biota normal del huésped para el desarrollo de candidiasis. La candidiasis mucosa afecta los epitelios mucosos, como los del tracto gastrointestinal y genital.

La CVV es una enfermedad inflamatoria de la vagina, producida por diferentes especies de *Candida*. En los Estados Unidos la CVV es la segunda causa de infección vaginal ya que, el 75% de las mujeres han presentado un episodio durante su etapa fértil y entre un 40-50% han cursado un segundo episodio (Sobel, 2007). Este tipo de candidiasis se manifiesta con una incidencia del 14% del total de candidiasis. Ya que *Candida* es parte de la biota vaginal, y que en ciertas circunstancias produce patología, la CVV se clasifica como una infección endógena del tracto genital inferior femenino (Pimentel-Sarzuri y Reynolds, 2007).

Ocasionalmente, debido a procesos multifactoriales, ocurren alteraciones en el equilibrio entre el hospedero y el comensal lo que propicia la enfermedad (Mendoza *et al.*, 1999). Aproximadamente un 15% de las mujeres están colonizadas por *C. albicans*, y generalmente no presentan síntomas. Sin embargo, diferentes especies de *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, que también forman parte de la biota normal de la vagina, pueden producir enfermedad cuando existe alguna deficiencia inmunológica local (Rivero *et al.*, 2003). Dependiendo del grado de las especies involucradas y el grado de la enfermedad la CVV se clasifica en no complicada y complicada (Villanueva Reyes y Arenas, 2007). Cuando la CVV es esporádica o poco frecuente, con síntomas

leves a moderados se dice que es no complicada. En este caso *C. albicans* es más probable que sea la especie responsable y no existe inmunosupresión ni se relaciona con embarazo. Por otra parte, la CVV complicada, es la que presenta recurrencia y es una infección más severa, se relaciona a especies no-*albicans*, y se asocia a inmunodepresión, diabetes y embarazo.

Se habla de una candidiasis recurrente cuando los episodios son más de 4 en un año. En la mayoría de estos episodios (2 a 3) la recurrencia se relaciona a la resistencia de *Candida* al tratamiento, la presencia de otras especies de *Candida*, el tipo de medicamento y la terapia antibiótica frecuente, entre otros.

Son varios los factores de riesgo para el desarrollo de CVV, como uso de estrógeno, embarazo, uso de anticonceptivos orales, diabetes no controlada, uso de antimicrobianos de amplio espectro, inmunodepresión, terapia de reemplazo hormonal, estrés, corticoterapia, VIH positivo y factores ambientales como el uso de ropa ajustada, duchas vaginales, ropa interior de fibra sintética, incremento de la humedad, vivir en clima tropical o subtropical, dietas ricas en carbohidratos y frutas (Pimentel-Sarzuri y Reynolds, 2007; Villanueva-Reyes y Arenas, 2007)

II.4 Epidemiología de la candidiasis

La candidiasis es una enfermedad que afecta a la población mundial sin discriminación de raza, posición económica, etc. (Colombo *et al.*, 2006), los factores geográficos (clima, humedad, lluvia) juegan un papel muy importante en su aparición y en las especies que las producen. En Estados Unidos las especies de *Candida* varían en cada región geográfica, por ejemplo un 30.2% de incidencia de *C. albicans* se presenta en el Suroeste y 54.5% en el noreste de ese país (Edmond *et al.*, 1999). Rivera-Sanchez *et al.* (2006), identificaron las especies de *Candida* en pacientes con vaginitis de la Ciudad de México. Encontraron que de los 631 cultivos de *Candida spp* analizados, 512 correspondían a pacientes con sintomatología de candidiasis y 119 a pacientes asintomáticas. Las especies más frecuentes fueron *C. albicans* (39.0%), *C. glabrata* (35.9%) y *C. tropicalis* (16.2%)

de las pacientes sintomáticas y *C. albicans* (42.01%) y *C. glabrata* (40.33%) dentro de las pacientes asintomáticas.

En 2009, Buitrón-García y colaboradores, realizaron un estudio en pacientes ginecológicas que asistían a tres diferentes centros de referencia de la ciudad de México: Hospital General, Hospital de la Mujer e ISSSTE. La identificación de especies se realizó por medio de examen directo, así como la inducción de la producción de tubos germinativos en suero humano a 37°C durante 3 h; la formación de pseudohifas y clamidoconidias en medios harina de maíz + tween 80 y por elaboración de zimogramas en medio comercial de API-yeast-20. Del total de los 468 casos, 143 resultaron negativos y el 70% positivos.

En el estudio realizado por Arreola-Cruz (2009) en pacientes ginecológicas de la ciudad de Ensenada, B.C. se obtuvo que el 42.1% de las pacientes evaluadas fueron portadoras de alguna especie de *Candida*, la más frecuente fue *C. albicans* seguida de *C. glabrata* y finalmente *C. tropicalis*. Además en el 15.2% de las portadoras se aisló DNA de dos tipos de levaduras con asociación *C. albicans-C. glabrata* y *C. glabrata-C. tropicalis*.

II.5 Métodos de identificación convencionales y moleculares

Los métodos de diagnóstico microbiológico se pueden clasificar de la siguiente manera:

- 1) Observación microscópica;
- 2) Métodos basados en cultivo (morfológicos);
- 3) Métodos independientes de cultivo:
 - a) Detección de antígeno o anticuerpos,
 - b) Detección de metabolitos,

c) Detección de otros componentes estructurales (bioquímicos e inmunológicos) y

4) Moleculares (Linares-Sicilia y Solis-Cuesta, 2001; Castro-Méndez y Martin-Mazuelos, 2005).

Debido a la gran diversidad de especies de *Candida* involucradas en la Candidiasis, es importante identificar las levaduras de relevancia clínica a nivel de especie (Rivera *et al.*, 2006). El diagnóstico de la candidiasis se basa en diversas técnicas de laboratorio entre las que se encuentran: el examen directo con KOH, la tinción de Gram, el aislamiento en medios de Sabouraud o micobiótico, la inducción de filamentación en suero (tubos germinales), inducción de la producción de clamidoconidias, complementado con pruebas bioquímicas y fisiológicas como el auxonograma, zimograma y la producción de ureasa (Martínez *et al.*, 2008) entre otras.

a) Observación microscópica

Lo primero es una observación directa de la muestra para identificar las levaduras, que por tamaño, se puede diferenciar fácilmente de las bacterias. Los reactivos que se utilizan para realizar este procedimiento son principalmente: el KOH (10-30%), que es utilizado como un clarificador que disuelve los elementos celulares manteniendo intacta la pared celular fúngica y el blanco de calcoflúor que se une específicamente a la quitina de las células fúngicas, provocando una emisión de fluorescencia. Otro método microscópico para la identificación inicial, son las tinciones, como la de Gram, donde las levaduras aparecen como Gram positivas, con las cuales se puede visualizar más rápidamente algunas estructuras específicas de los hongos. Las ventajas que presentan las tinciones son que el procedimiento es rápido, fiable y de bajo costo y permite diferenciar algunos hongos por su morfología (Castro-Mendez y Martin-Mazueloz, 2005).

b) Métodos basados en cultivo

El cultivo es elemental para establecer la etiología y efectuar pruebas complementarias para la identificación de la especie (sensibilidad a los antifúngicos, estudio de tipificación molecular, entre otros). La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.). El agar glucosado de Sabouraud (SDA Sabouraud Dextrose Agar por sus siglas en inglés), con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento utilizado principalmente para la identificación de levaduras (Linares-Sicilia y Solis-Cuesta., 2001; Castro-Méndez y Martín-Mazuelos, 2005). Después de 24 a 48 h, a una temperatura de 37°C, se pueden observar las colonias características color blanco o crema, de consistencia opaca, elevadas, lisas, brillantes o mates y con un diámetro de 1 a 3 mm. La observación de blastoconidias, pseudohifas, clamidosporas, artrosporas, tubo germinal, por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras, pueden ser obtenidas en distintos medios como agar harina de maíz, agar Wolin-Bevis, agar arroz o agar papa-zanahoria (Castro-Méndez y Marín-Mazuelos, 2005)

Otros medios de cultivo son los cromogénicos, cuyo fundamento se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales. El medio CHROMagar se utiliza para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*. Este medio permite diferenciar colonias de *C. albicans* (lisas y de color verde esmeralda), *C. dublinensis* (colonia lisa, verde oscuro y no crece a 45°C), *C. tropicalis* (lisa, azul oscuro con un halo

púrpura-marrón en el agar que la rodea), *C. krusei* (colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco) y *C. glabrata* (colonias brillantes y cremosas de color violeta). Cromogen Albicans (Biomedics), *Candida* ID® (bioMérieux), Albicans ID2® (bioMérieux), CandiSelect®, son ejemplos de medios cromogénicos comerciales para la identificación de las distintas especies patógenas de *Candida*. Dependiendo del Kit utilizado, será la coloración de la especie que se aíse. Por ejemplo con el Kit Cromogen Albicans las colonias de *C. albicans* adquieren un color azul verdoso que depende del periodo de incubación y la temperatura, con formas redondeadas, lisas y ligeramente elevadas, en este caso las otras especies de levaduras aparecen de color blanco cremoso y necesitan una identificación bioquímica posterior. (Castro-Méndez y Marín-Mazuelos, 2005)

Las principales pruebas fisiológicas utilizadas en la identificación de levaduras son las de fermentación/asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencia a ciclohexamida y termotolerancia (Orberá-Ratón, 2004). El auxonograma convencional aplica por separado diferentes nutrientes sobre un medio sintético, para apreciar el crecimiento de la levadura que se está estudiando. Lo que se observa es la utilización de los distintos nutrientes a los que se expone la levadura, ya sean carbohidratos (azúcares o alcoholes) o compuestos nitrogenados (peptona, asparagina, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio, etc.) por lo que la identificación se realiza dependiendo del requerimiento nutricional. Auxacolor (Bio Rad), Uni-Yeast Tek (Remel), API 20 C AUX (bioMérieux), La galería ID 32 C (bioMérieux) son algunos ejemplos de métodos basados en asimilación de nutrientes (Castro-Méndez y Martin-Mazuelos, 2005)

Todos los métodos anteriores, son de gran utilidad para la identificación de especies, sin embargo todos requieren de la realización de aislamientos primarios y secundarios y de cultivos posteriores para la identificación de aprovechamiento de sustratos, lo cual lleva tiempo y también puede tener fallas diagnósticas.

c) Métodos independientes de cultivo

Desde los años 80s se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas independientes de cultivo, que tienen la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo para llegar a un resultado, los cuales se basan en la identificación por medio de la detección en sangre de a) antígenos o anticuerpo, b) de metabolitos y c) de otros componentes fúngicos. Platelia *Candida* Ag® (BioRad) es un ELISA que detecta al antígeno manano en suero, mediante el anticuerpo monoclonal EBCA 1, que reconoce residuos β -1,5 del manano. Las especies con resultado positivo son: *C. albicans*, *C. dublinensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*. La desventaja de esta prueba es que proporciona reacciones cruzadas con *Aspergillus* y *Cryptococcus*. El porcentaje de sensibilidad es de 40% y de especificidad es de 53% (Castro-Méndez y Marín-Mazuelos, 2005)

Los métodos mencionados anteriormente pueden dar una aproximación de las especies provenientes de los aislamientos clínicos, ya que estos métodos producen ambigüedad y resultados incorrectos, debido a que la morfología de las colonias o las características fisiológicas dependen de las condiciones de cultivo y que método comercial se esté utilizando (Castro-Méndez y Marín-Mazuelos, 2005).

Con la introducción de los métodos moleculares desde los 80's, las técnicas para identificación de especies patógenas se han enfocado en la utilización de estos métodos como una herramienta más rápida de detección. (Alcoba *et al.*, 2007). Los métodos basados en PCR muestran mayor sensibilidad que los cultivos y una comparable eficiencia, además de rapidez. Esta técnica ha sido implementada con algunas variantes: PCR con oligonucleótidos especie-específicos, PCR múltiple, amplificación por PCR con Southern blot, PCR y análisis de restricción de amplicones, PCR anidado, PCR en tiempo real. Con respecto a la detección de hongos como agentes causales de infección en

distintas muestras clínicas, los blancos más estudiados son el gen que codifica el 18S rRNA y el ITS espaciador transcrito interno (*Internal transcribed sequence* por sus siglas en inglés), secuencias incluidas en el operón RNA ribosomal. Este operón tiene regiones altamente conservadas, que identifica a los hongos a un nivel de género y también incluye regiones hipervariables, lo que ayuda a realizar una identificación a nivel de especie (Figura 3).

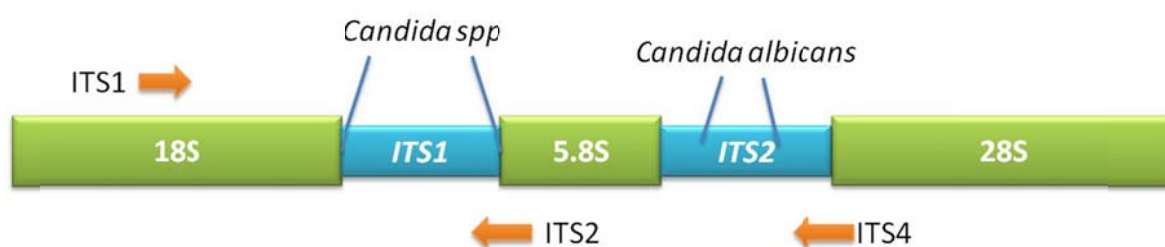


Figura 3. Regiones del operón DNA ribosomal, con los oligonucleótidos universales de amplificación. Modificado de Liguori, 2007

Otro método molecular muy utilizado para identificación es el Polimorfismo de Longitud en los Fragmentos de Restricción del rDNA/rRNA (RFLP por sus siglas en inglés), que consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de corte que se generan en sitios específicos del genoma, cuando es reconocido por enzimas de restricción. En el PCR-RFLP, se amplifican fragmentos específicos de DNA por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis (Orberá-Ratón, 2004).

En 2001 Chang-Chang y colaboradores emplearon un método de PCR Múltiple para la identificación de las levaduras más importantes clínicamente en cultivos aislados en sangre. El método consistía en la amplificación de la región

ITS1 entre los genes rRNA 18S y 5.8S por los oligonucleótidos ITS1 e ITS2, además de un par de oligonucleótidos específicos para *C. albicans* (CA3 y CA4). El resultado que se obtuvo fue que se pudo diferenciar entre *C. albicans*, por la amplificación de dos bandas, con el resto de las especies que solo amplificaron una banda. La sensibilidad del método fue de 96.9% y la identificación de las especies pudo realizarse en ~8 h.

En 2005, López y colaboradores, compararon tres diferentes métodos de identificación de especies de *Candida*, utilizando técnicas fenotípicas tradicionales, métodos comerciales y por PCR huella genética (fingerprinting en inglés). Estos métodos fueron evaluados en términos de la factibilidad del protocolo, la reproducibilidad de los resultados, el costo y el tiempo requeridos por cada uno de ellos. Después de 7 d de desarrollo a 28°C en el medio SDA se observaron las características macro y micro morfológicas de las colonias aisladas que crecieron a partir de las muestras que se colectaron. Con lo observado solo obtuvieron una identificación preliminar sobre la especie probable, pero no llegaron a la identificación exacta de las levaduras debido a la semejanza, en algunos casos, de las características microscópicas. De las 44 cepas aisladas, 27 produjeron tubos germinativos y clamidoconidias, lo que les permitió identificar a estos aislamientos como correspondientes a *C. albicans*, sin embargo no pudieron identificar los demás aislamientos (38%) dado que *C. dublinensis* también desarrolla clamidoconidias. Utilizando el sistema comercial API 20C, 43 de los 44 (98%) aislamientos clínicos estudiados pudieron ser identificados conforme al perfil proporcionado por el proveedor. Con el medio CHROMagar dio como resultado una coloración de las colonias en 27 de los asilamientos. Esta coloración la desarrolla tanto *C. albicans* como *C. dublinensis*. Los patrones de *fingerprint* se mantuvieron estables aun cuando el DNA de una cepa (*C. albicans* ATCC 64548) fue extraído a partir de diferentes subcultivos de la misma. El análisis de los patrones de *fingerprint* les permitió clasificar no sólo taxonómicamente a las especies de *Candida* estudiadas, sino también filogenéticamente, ya que, la

técnica de PCR *fingerprinting* y el posterior análisis de los patrones de bandas permitió agrupar 9 especies de *Candida* en linajes, que reflejan las distancias genéticas entre dichas especies.

Mirhendi y colaboradores en 2006 publicaron un trabajo de identificación de seis especies de *Candida* medicamente importantes, por medio de PCR-RFLP, en donde identificaron 137 aislamientos clínicos. El patrón de RFLP producido por cada especie de *Candida* fue completamente específico por lo que ninguna de las especies examinadas puede ser identificada erróneamente.

En el siguiente año, Ayatollahi y colaboradores (2007) reportaron la utilización de la PCR con el uso de los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 y la enzima *MspI* como enzima de restricción para la digestión de esta región para identificar las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Las muestras que colectaron provenían de aislamientos clínicos de pacientes con vaginitis. De las 27 muestras examinadas, 22 fueron identificadas como *C. albicans*, *C. glabrata* (2/27 7.4%), *C. guilliermondii* (2/27 7.4%) y *C. tropicalis* (1/27 3.7%). Concluyeron que la enzima *MspI*, es una enzima de restricción confiable y de gran uso para delimitación de la mayoría de las especies de *Candida*.

También Liguori y colaboradores, en 2007, emplearon un método de PCR múltiple para la identificación de especies de *Candida* de pacientes con candidiasis oral. Además, hicieron, una comparación con métodos rutinarios de identificación de *Candida*. En este trabajo utilizaron los oligonucleótidos ITS1e ITS2 adicionalmente usaron los oligonucleótidos CA3 y CA4 que son específicos para la identificación de *C. albicans* y diseñaron los oligonucleótidos para *C. famata* (ITS1F), *C. kefyr* (ITS1K) y *C. dublinensis* (ITS2D). El PCR múltiple identificó todas las muestras que en el cultivo resultaron positivas, especies únicas o especies mixtas, además de las que en los medios fenotípicos rutinarios dieron un resultado negativo.

En 2009, Weissenbacher y colaboradores publicaron un estudio donde compararon el diagnóstico clínico de CVV recurrente y la detección de especies de *Candida* por cultivo y PCR. Estudiaron un total de 104 pacientes diagnosticadas con CVV recurrente, inocularon las muestras en medio SDA y posteriormente extrajeron DNA para la realización de la PCR. Del total de pacientes, 29.8% dieron positivo a especies de *Candida*, *C. albicans* en 25 de ellas, seguida por *C. glabrata*. Sin embargo, cuando se analizaron las muestras por PCR 42.3% de las pacientes dieron positivas a especies de *Candida*. Resultados similares se obtuvieron en el estudio realizado en Ensenada B. C., donde por cultivo 40% de los casos presentan falsos negativos.

III. JUSTIFICACION

El aumento de frecuencia de especies en aislamientos clínicos, donde se observan *C. albicans* y otras especies *no-albicans* son cada vez más comunes. Algunas de las especies *no-albicans* emergentes son resistentes a los azoles, lo que hace difícil su tratamiento. La mayoría de las mujeres presentan en alguna etapa de su vida, algún episodio de candidiasis, y en muchas de ellas esta enfermedad es recurrente. La causa de la enfermedad se adjudica generalmente a *C. albicans*. Cuando se hace un examen micológico para observar la levadura, si se observa que no tiene filamentos, se reporta a la paciente como sana. Sin embargo *C. glabrata* no forma filamentos, su morfología es la misma ya sea como comensal o como patógena. Es necesario llegar a una identificación de especie de estos aislamientos no solo basándose en los métodos convencionales, ya que son poco certeros, tediosos y solo ayudan a la identificación del patógeno a nivel de género. Asimismo, el costo de estos métodos es más elevado, en comparación de métodos moleculares ya que hay que estar realizando medios de cultivo constantemente y para cada muestra que se procese, lo que lleva a un mayor desecho de materiales, etc.

Los métodos clásicos basados en el cultivo de muestras tienen una sensibilidad estimada del 50% y se necesitan al menos 48 h para poder dar un diagnóstico. Con el uso de métodos moleculares para identificación de especies los resultados que se obtienen son más confiables y rápidos. Los métodos moleculares proporcionan un resultado más factible y confiable de identificación, además de que el resultado puede ser observado en menos de 24 h.

Hay pocos estudios realizados en México donde utilicen a los métodos moleculares como herramientas para identificación de especies que puedan ser realizados en un laboratorio clínico. Los estudios con los que se cuenta hasta el momento son con resultados que están basados en la identificación por medio del uso de métodos convencionales. La introducción de técnicas moleculares que puedan ser utilizadas de manera rutinarias para identificar especies de *Candida* es muy importante, ya que para el médico es esencial conocer qué organismo está causando la infección para tomar decisiones terapéuticas.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y estandarizar un método de PCR múltiple para la identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ginecológicas y compararlo con un método de PCR-RFLP ya validado.

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el método de PCR múltiple para la identificación de las cuatro principales especies de *Candida* colectadas de pacientes ginecológicas.
- Identificar las especies aisladas por el método de PCR-RFLP y PCR múltiple.
- Comparar los dos métodos moleculares para la identificación de especie, para valorar su sensibilidad y especificidad y la relación costo-eficiencia.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1 Diseño Metodológico

Se desarrolló y probó un método de identificación de las cuatro especies del género *Candida* más comunes en aislamientos clínicos en muestras vaginales. Este método se basó en la técnica de PCR-múltiple, que contiene un juego de oligonucleótidos que amplifican regiones de tamaño variable según la especie y proporciona un patrón de bandas específico.

En primer lugar se buscaron los oligonucleótidos candidatos para realizar la identificación, cada uno de ellos fue probado con cepas de control, con una PCR con gradiente de temperatura para establecer las condiciones idóneas de reacción. Posteriormente se corroboró con cepas control, que las bandas tanto generales como específicas aparecieran exclusivamente en la especie determinada y finalmente se llevó a cabo la prueba con la mezcla de oligonucleótidos, realizando también una PCR con gradiente de temperatura y buscando las condiciones idóneas.

Una vez establecida la reproducibilidad del método, se tomaron muestras de exudado vaginal para la identificación de especies de *Candida*. Se realizaron cultivos de estas muestras y de los cultivos se extrajo el DNA y se realizó en primer lugar el procedimiento de PCR-RFLP como método estándar. Posteriormente, se utilizó en las mismas muestras la técnica de PCR-múltiple desarrollada para comparar los resultados y establecer su validez y eficiencia.

V.2 Cepas y condiciones de cultivo

Se trabajó con cepas que se tienen en el cepario del Departamento de Microbiología del CICESE y también con las cepas *C. albicans* SC5314, *C. glabrata* ATCC2001, *C. tropicalis* MYA-3404 y *C. parapsilosis* ATCC96143. Asimismo se trabajó con muestras ambientales que se colectaron en el Hospital General de Ensenada. Todas las cepas se sembraron en cajas de Petri con medio YPD con extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2% y agar 2%. Para observar el crecimiento de levadura, las cepas se incubaron a 37°C por 48 h.

V.3 Oligonucleótidos

Se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la tabla II

Tabla II. Descripción de los oligonucleótidos seleccionados para el PCR-múltiple

Oligonucleótido	5'-3'	Referencia
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT CG	Liguori <i>et al.</i> , 2007
ITS2D	GAG AAC CAA GAG ATC CGT TGT T	Liguori <i>et al.</i> , 2007
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Mirhendi <i>et al.</i> , 2007
ITS1K	ATC GTC TGA ACA AGG CCT GC	Liguori <i>et al.</i> , 2007
ITS1F	CCA GCG CTT AAT TGC G	Liguori <i>et al.</i> , 2007
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	Mirhendi <i>et al.</i> , 2007
CA3	GGT TTG GAA AGA CGG TAG	Liguori <i>et al.</i> , 2007
CA4	AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G	Chang <i>et al.</i> , 2001
CA3 NF	GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG	Chang <i>et al.</i> , 2001
CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	Luo y Mitchell, 2002
CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	Luo y Mitchell, 2002
Ralb1	CGG TAG TGG TAA GGC GGG	Este trabajo
Ralb2	ATA CGT GGT AGA CGT TAC C	Este trabajo

V.4 Condiciones de reacción para PCR

Para cada par de oligonucleótidos, se realizaron pruebas de gradiente de temperatura en el termociclador Apollo Instrumentation ATC 401, con la cepa de referencia de *C. albicans* SC5314 en el caso de los oligonucleótidos ITS1, ITS2,

ITS4, CA3, CA4, Ralb1 y Ralb2. La cepa *C. tropicalis* MYA-3404 para los oligonucleótidos CTR1 y CTR2. La prueba consistió en someter la PCR a las temperaturas de alineamiento de 48.1, 48.5, 49.3, 50.6, 52, 53.1, 54.3, 55.4, 56.8, 58.1, 58.9 y 59.9°C. La mezcla utilizada fue de 8.75 µl de agua grado HPLC, 5 µl green color buffer (Promega®), 2.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl dNTPs 1 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido 10 µM, 0.25 µl de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 5 µl de DNA para llevar la reacción a un volumen final de 25 µl. Las condiciones de corrido fueron: un ciclo a 94°C durante 5 min, 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 s, temperaturas de gradiente: 48.1, 48.5, 49.3, 50.6, 52, 53.1, 54.3, 55.4, 56.8, 58.1, 58.9 y 59.9°C y 72°C durante 1 min para extensión. La extensión final se llevó a una temperatura de 72°C durante 10 min y el paso final de 4°C.

V.5 PCR para cepas de referencia

Para corroborar que los tamaños de amplificación esperados por especie correspondieran a los tamaños citados en la bibliografía, se utilizaron seis cepas, una de *C. albicans*, una de *C. glabrata*, una de *C. tropicalis*, una de *C. parapsilosis*, una de *Saccharomyces cerevisiae* y una de *Escherichia coli*. Estas dos últimas como controles. Tomando en cuenta las temperaturas ideales resultado de la prueba de gradiente, se procedió a realizar una PCR en las cepas mencionadas, de la siguiente manera: se realizó una mezcla con de 8.75 µl de agua grado HPLC, 5 µl green color buffer (Promega®), 2.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl dNTPs 1 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido 10 µM, 0.25 µl de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 5 µl de DNA y se llevó a un volumen final de 25 µl. Las condiciones para la PCR fueron 94°C durante 5 min, 94°C por 30 s, 55°C por un min, 72°C por un min durante 35 ciclos, seguido de una extensión final de 72°C por 10 min, terminando con 4°C.

Los oligonucleótidos se eligieron para que por pares amplificaran distintos fragmentos que se presentan en la tabla III.

Tabla III. Tamaños amplificados esperados de acuerdo a los pares de oligonucleótidos utilizados

Par de oligonucleótidos	Producto esperado (pb)			
	C. <i>albicans</i>	C. <i>glabrata</i>	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>parapsilosis</i>
ITS1-ITS2	219	483	218	229
ITS1-ITS4	535	871	524	520
CA3-CA4	110			
CTR1-CTR2			357	
Ralb1-Ralb2	84			

A pesar de que los oligonucleótidos CA3, CA3NF y CA4 se habían reportado como específicos para *C. albicans*, en todas las pruebas realizadas se obtuvieron amplificaciones en todas las especies. Se alinearon las secuencias conocidas de las cuatro especies mediante el DNASTAR MegAlign por el método de Clustal V y se buscaron regiones de *C. albicans* que no fueran compartidas con otras especies del género *Candida* para obtener una banda que solo amplifique en este organismo. En la figura 4 se muestra la región 18s-ITS1-5.8s-ITS2-28s de *C. albicans* IFM 49030 y se indica el par de oligonucleótidos Ralb1 y Ralb2 diseñados para diferenciar esta especie de *C. parapsilosis* ya que comparten secuencias muy parecidas de esta región.

```

1 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attactgatt
61 tgcttaattg caccacatgt gttttcttt gaaacaaact tgcttggcg gggggcccag
121 cctgccgcca gaggtctaaa ctacaacca atttttatt aactgtcac accagattat
181 tactaaatag tcaaaacttt caacaacgga tctctgggtt ctgcatcga tgaagaacgc
241 agcgaaatgc gatacgaat atgaattgca gatattcgtg aatcatcgaa tctttgaacg
301 cacattgcbc cctctggtat tccggagggc atgctgttt gagcgtcgtt tctccctcaa
361 accgctgggt ttggtgtga gcaatacgac ttgggttgc ttgaaaga cggtagtggtaa
421 ggcgggatcg cttgacaat ggcttagtgc taacaaaaa cattgcttgc ggc ggtaacg
481 tctaccacgt atatctcaa actttgacct caaatcaggt aggactaccc gctgaactta
541 agcatatcaa taagcggagg a

```

Figura 4. Secuencia de la región 18s-ITS1-5.8s-ITS2-28s de *C. albicans* IFM 49030 con los oligonucleótidos Ralb 1 en rojo (oligonucleótido sentido) y Ralb2 en azul (oligonucleótido antisentido).

V.6 Análisis de fragmentos por electroforesis

Tanto los productos de la PCR de los gradientes como de los pares de oligonucleótidos en las diferentes cepas de referencias, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio 0.1% durante 50 minutos a 70 V con fuentes de poder Biorad ® Power Pac basic. Una vez separadas las bandas, los geles fueron observados con iluminación de luz UV en un transiluminador BioRad® Universal Hood II con el programa Quantity One.

V.7 Pruebas de estandarización de PCR múltiple

Una vez que se logró corroborar el funcionamiento de los oligonucleótidos por separado, se llevaron a cabo las pruebas con la mezcla de los pares seleccionados que fueron ITS1, ITS2, ITS4, CTR1, CTR2, Ralb1 y Ralb2. Se realizó una mezcla con 5 µl green color buffer (Promega ®), 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl dNTPs 1 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido 10µM, 0.25 µl de Taq polimerasa Go taq® Flexi DNA Polymerase (Promega®) y 2 µl de DNA y se llevó a un volumen final de 25 µl. Las condiciones para la PCR fueron 94°C durante 5 min,

94°C por 30 s, 55°C por un min, 72°C por un min durante 35 ciclos, seguido de una extensión final de 72°C por 10 min, terminando con 4°C. Posteriormente se realizó una PCR con gradiente de temperatura con la cepa de *C. albicans* para ajustar las condiciones.

V.8 Toma de muestras

Se colectaron un total de 123 muestras de exudado vaginal obtenidas de pacientes de la Clínica de Displasias del Hospital General de Ensenada y de un consultorio privado de la misma entidad, tomadas por el médico ginecólogo encargado. Las muestras fueron tomadas durante los meses de septiembre a noviembre de 2009. Además se incluyeron 21 muestras positivas del cepario del laboratorio del Departamento de Microbiología, haciendo un total de 144 muestras.

El ginecólogo tomó la muestra con un hisopo estéril del fondo de saco posterior. El hisopo se estrió en una caja de Petri con YPD, la cual fue llevada al laboratorio y se incubó a 37°C por 24 h. Después de estriar, el hisopo se guardó en un vial de polipropileno de 5.0 ml con tapa redonda conteniendo medio YPD líquido y se guardó a -20°C, los tubos fueron rotulados con el número correspondiente a cada paciente.

V.9 Procesamiento de muestras

Las placas inoculadas inmediatamente después de tomar la muestra se incubaron por varios días a 37°C, una vez que se desarrollaron las colonias, se almacenaron a 4°C. De las muestras que resultaron positivas a levaduras, se tomaron colonias individuales para inocular tubos de cultivo con 10 ml de YPD líquido y se incubaron durante toda la noche a 37°C bajo agitación constante (~200 rpm), para proceder a la extracción de DNA.

V.10 Extracción DNA

La extracción de DNA se realizó por el método de aislamiento rápido de DNA cromosómico de levaduras de la siguiente manera: se tomó 1 ml del cultivo y se pasó a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Se centrifugó 2 min a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 500 μ l de agua destilada y esterilizada, homogenizando con un vortex, posterior a esto se centrifugó 5 min a 14,000 rpm. Después de decantar, la pastilla fue resuspendida en 200 μ l de buffer de lisis (2% (v/v) Tritón X100, 1%(v/v) SDS , 100 mM NaCl, 10mM tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), se agregaron 200 μ l de perlitas de vidrio y 200 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1). Se homogenizó con un vortex vigorosamente por aproximadamente 3 min. A esta mezcla se agregaron 200 μ l de TE (10Mm Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA pH 8) se mezcló y centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. Transcurrido el tiempo, la capa acuosa se transfirió a otro tubo de microcentrifuga de 1.5 ml (~300 μ l), se agregó 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión. Se centrifugó 3 min a 14,000 rpm y el sobrenadante se decantó. La pastilla fue resuspendida en 400 μ l de TE en donde se agregó 1.5 μ l de RNasa A (Quiagen ® 20 μ g ml⁻¹) y se incubó 5 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 μ l de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol 100% (en este paso se utilizó alcohol isopropílico) se mezcló por inversión y se incubó 5 min a -21°C para precipitar el DNA, se centrifugó 3 min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar por aproximadamente 15 min. Se resuspendió en 50 μ l de TE y se guardó a -20°C hasta su posterior uso. El DNA extraído se cuantificó en nanodrop Nano Vue GE®. Todas las muestras se dejaron a una concentración de 50 μ g μ l⁻¹.

V.11 Técnica de PCR-RFLP

Para identificar las especies del género *Candida* y tener un punto de referencia para evaluar el método propuesto se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP, que fue descrita en el apartado de antecedentes. Se utilizaron los

oligonucleótidos ITS1 e ITS4 en una mezcla de PCR de volumen final de 50 μ l y que consistió en 22.75 μ l de H₂O grado HPLC, 10 μ l de 5X colorless Go taq® Flexi Buffer, 5 μ l MgCl₂ 10 mM, 5 μ l dNTPs 1 mM, 1 μ l ITS1 10 μ M, 1 μ l ITS4 10 μ M, 0.25 μ l Taq polimerasa Go taq® Flexi DNA Polymerase (Promega®) y 5 μ l DNA. Se corroboró la amplificación del fragmento mediante electroforesis de acuerdo al procedimiento ya descrito y se procedió a la purificación del producto de la PCR por precipitación del DNA.

Al volumen final del producto de PCR se adicionaron 50 μ l de H₂O grado HPLC, posteriormente se agregó 1/10 volúmenes (~10 μ l) de AcNa 3M pH 5, después se añadieron 2 volúmenes (~200 μ l) de etanol absoluto y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó a -20°C por 40 min. Transcurrido el tiempo, esta se centrifugó 10 min a 14,000 rpm. Se decantó y agregaron 500 μ l de etanol al 80%, posteriormente se centrifugó 3 min a 14,000 rpm, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por aproximadamente 20 min y finalmente se resuspendió en 40 μ l de TE.

Con el DNA precipitado, se procedió a la digestión enzimática, utilizando la endonucleasa *MspI* (Tabla IV). La digestión se realizó por 2 h. Una vez realizada la restricción enzimática, se efectuó una electroforesis para identificar el tamaño de los fragmentos. Los tamaños esperados según la especie se presentan en la tabla V.

Tabla IV. Mezcla utilizada para la digestión enzimática de los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Mezcla	1x (μ l)
H ₂ O grado HPLC	0.1
Buffer B 10x	4
BSA	0.4
Enzima de restricción <i>MspI</i>	0.5
Producto de PCR	35
Volumen final	40

Tabla V. *Tamaños esperados después de la digestión enzimática con MspI*

Especie	Fragmentos esperados
<i>C. albicans</i>	297, 238
<i>C. glabrata</i>	557, 314
<i>C. tropicalis</i>	340, 184
<i>C. parapsilosis</i>	520

VI. RESULTADOS

VI.1 Estandarización de PCR múltiple

a) Condiciones de reacción para PCR

Se realizaron pruebas de gradientes de temperaturas de alineamiento para los oligonucleótidos ITS1, ITS2, ITS4, CA3, CA4, CTR1, CTR2, Ralb1 y Ralb2, la prueba se realizó por pares individuales (ITS1-ITS2, ITS1-ITS4, CA3-CA4, CTR1-CTR2, Ralb1-Ralb2) con el fin de observar cuál era la temperatura óptima para la amplificación de los fragmentos deseados. Como se observa en la figura 5, los oligonucleótidos amplifican en todas las temperaturas de alineamiento a las que fueron probados, aunque con mayor eficiencia a partir de 54°C. Los resultados de CA3, CA3N y CA4 no se muestran debido a que estos oligonucleótidos amplificaron en todas las especies y no fueron específicos para *C. albicans*.

Posteriormente, se mezclaron todos los oligonucleótidos en una reacción de PCR múltiple y se realizó un gradiente para esta mezcla, y se observó que no hubo diferencias en las temperaturas de alineamiento probadas en la cepa de referencia de *C. albicans* (Figura 6).

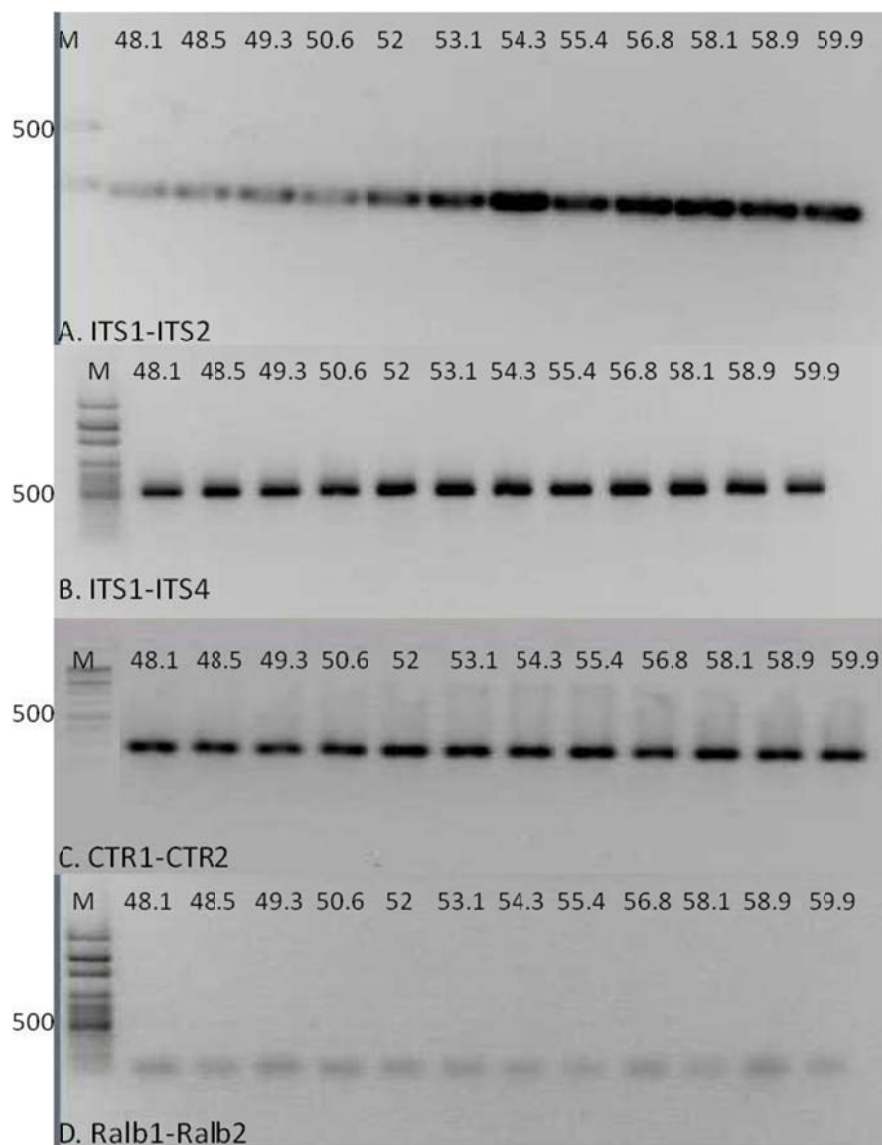


Figura 5. Gradientes de los oligonucleótidos estudiados. A, ITS1-ITS2, B, ITS1-ITS4, C, CTR1-CTR2, D, Ralb1-Ralb2). Se utilizó la cepa de *C. albicans* SC5314 para A, B y D y la de *C. tropicalis* MYA-3404 para C. M es el marcador de peso molecular.

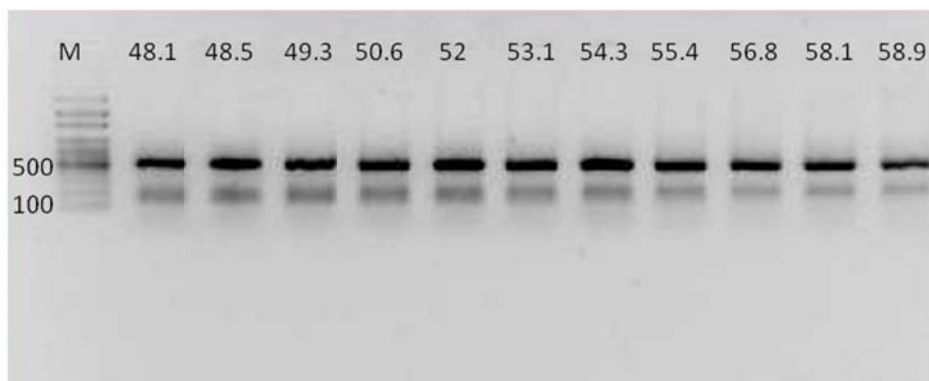


Figura 6. Gradiente del PCR múltiple (ITS1-ITS2, ITS1-ITS4, CA3-CA4, CTR1-CTR2) de la cepa de referencia *C. albicans* SC5413.

b) Pares de oligonucleótidos

En la figura 7, se observan los tamaños de los fragmentos de los productos PCR de los pares de oligonucleótidos, los tamaños aproximados se muestran en la tabla VI.

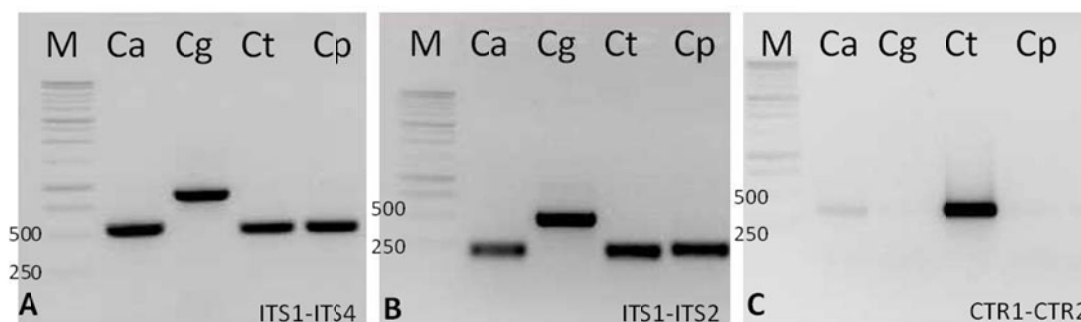


Figura 7. Fragmentos del producto PCR de los pares de oligonucleótidos. Ca: *C. albicans*, Cg: *C. glabrata*, Ct: *C. tropicalis* y Cp: *C. parapsilosis*. M es el marcador de peso molecular.

Tabla VI. Tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR con los pares de oligonucleótidos en las cepas de referencia.

Cepa	ITS1-ITS2	ITS1-ITS4	CTR1-CTR2
<i>C. albicans</i>	~250	~500	
<i>C. glabrata</i>	~500	~800	
<i>C. tropicalis</i>	~250	~500	~300
<i>C. parapsilosis</i>	~250	~500	

Una vez observados los tamaños esperados para cada par de oligonucleótido, se realizó el PCR múltiple con la mezcla de oligonucleótidos (ITS1-ITS2, ITS1-ITS4, CTR1-CTR2) en todas las cepas de referencia. Se observó un patrón diferente de bandas para cada una de las especie. Sin embargo, las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* mostraron un patrón de bandas muy similar (Figura 8). Los tamaños del producto de amplificación que se observaron para el PCR múltiple para cada especie:

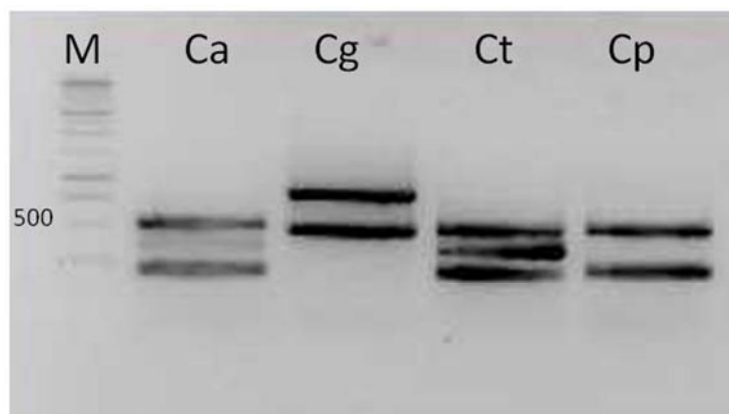


Figura 8. Patrón de bandas como resultado del PCR múltiple con los oligonucleótidos ITS1-ITS2, ITS1-ITS4, CTR1-CTR2, de las cepas de referencia. Ca (*C. albicans*) Cg (*C. glabrata*) Ct (*C. tropicalis*) y Cp (*C. parapsilosis*). M es el marcador de peso molecular.

En *C. albicans* se observaron dos bandas, una de ~ 500 pb y otra de ~200 pb, en *C. glabrata* una de ~800 pb y otra de ~400 pb, en *C. tropicalis* se observaron tres bandas de ~500, ~400 y ~300 pb respectivamente y para *C. parapsilosis* dos bandas de ~500 y ~200 pb.

Debido a la similitud de patrones entre *C. albicans* y *C. parapsilosis* se integró al PCR múltiple, un par de oligonucleótidos especie-específicos que diferenciaran a estas especies más fácilmente. Los oligonucleótidos CA3-CA4 son reportados en la literatura como específicos para amplificar una porción de la región ITS2 de la especie *C. albicans*. Sin embargo, en repetidas observaciones, este par de oligonucleótidos amplificaron en todas las cepas de referencia de *Candida* (Figura 9)

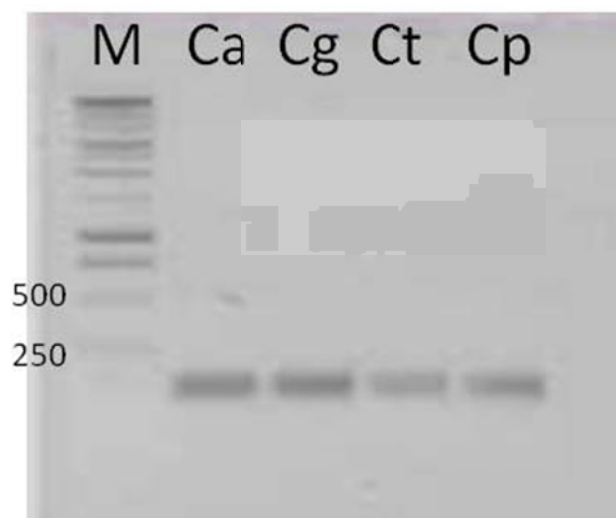


Figura 9. Productos de PCR con el par de oligonucleótidos CA3-CA4 realizado en todas las cepas de referencia. Ca (*C. albicans*) Cg (*C. glabrata*) Ct (*C. tropicalis*) y Cp (*C. parapsilosis*). M es marcador de peso molecular.

Debido a este resultado, se diseñaron los oligonucleótidos Ralb1 (oligonucleótido sentido) y Ralb2 (oligonucleótido antisentido) que son específicos

para *C. albicans* y obtener un patrón diferencial entre esta especie y *C. parapsilosis*.

Se verificó que este par de oligonucleótidos amplificaran solo en la especie *C. albicans* y cuyo producto fuera un fragmento de 84 pb. En la figura 10 se observa que este par de oligonucleótidos amplificó solo en *C. albicans*.

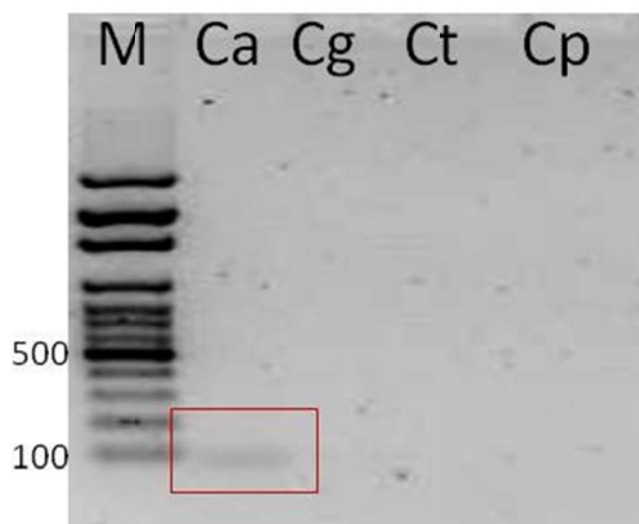


Figura 10. Fragmento de amplificación con el par de oligonucleótidos *Ralb1* y *Ralb2*. *Ca* (*C. albicans*) *Cg* (*C. glabrata*) *Ct* (*C. tropicalis*) y *Cp* (*C. parapsilosis*). *M* es marcador de peso molecular.

Una vez que se observaron los tamaños esperados y que los oligonucleótidos especie-específicos (CTR1 y CTR2 y *Ralb1* y 2) solo amplificaban las regiones de las especies respectivas, se procedió a la realización del PCR múltiple con los pares de oligonucleótidos (Figura 11).

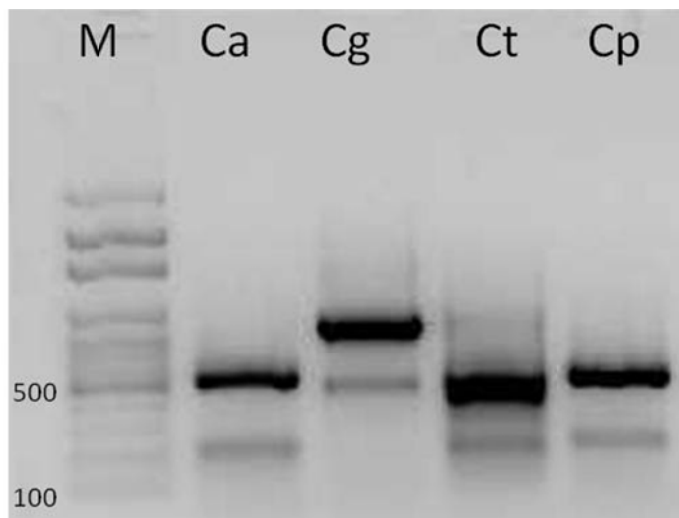


Figura 11. PCR múltiple de las cepas de referencia. Ca (*C. albicans*) Cg (*C. glabrata*) Ct (*C. tropicalis*) y Cp (*C. parapsilosis*). La flecha roja indica el tamaño 500pb.

En el PCR múltiple con los pares de oligonucleótidos especie-específicos se observó que en *C. albicans* no amplificó el producto de 84 pb de PCR del par de oligonucleótidos Ralb1-Ralb2. Por lo que se hicieron pruebas para la amplificación de este producto. Estos oligonucleótidos si amplifican individualmente, pero cuando se mezclaron con los otros oligonucleótidos, no se observó la amplificación.

c) Condiciones especiales

Se realizó un gradiente de concentración de oligonucleótidos (Ralb1-Ralb2) agregado a la mezcla de PCR, el gradiente de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 μM de cada oligonucleótido. Se observó que en la mayor concentración (1.2 μM) se obtuvo el amplicón más intenso (Figura 12).

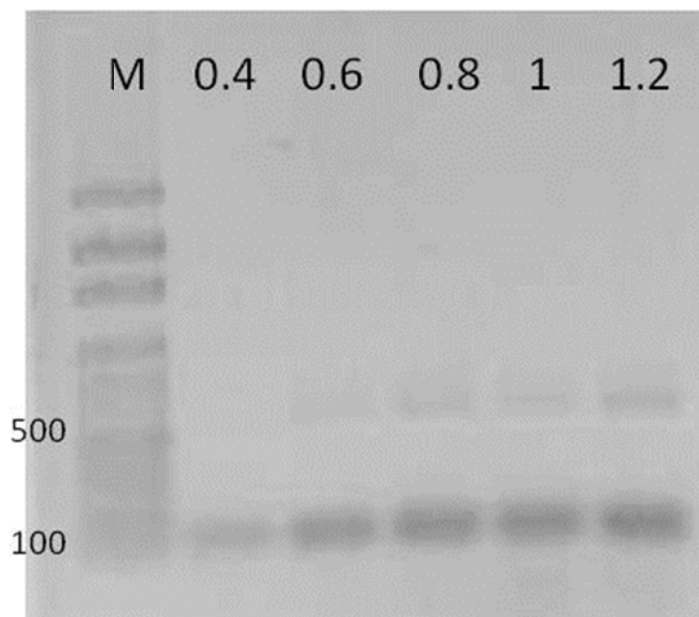


Figura 12. Diferentes concentraciones de los oligonucleótidos *Ralb1-Ralb2* amplificados en la cepa *C. albicans* SC5413. Los números indican las concentraciones en μM . M es marcador de peso molecular.

Aun cuando se aumentó la concentración de los oligonucleótidos, cuando éstos se agregaron a la mezcla para el PCR múltiple, no se visualizó el fragmento para *C. albicans*. Por lo que se aumentó la concentración de los oligonucleótidos a $2 \mu\text{M}$ y se disminuyó la temperatura de alineación de 55°C a 50°C . Pero con estas modificaciones tampoco se observó un patrón característico en ninguna de las cepas.

Finalmente, se realizó un gradiente de las concentraciones de MgCl_2 25mM . Las concentraciones fueron de: 3, 4, 5 y 6mM (Figura 13).

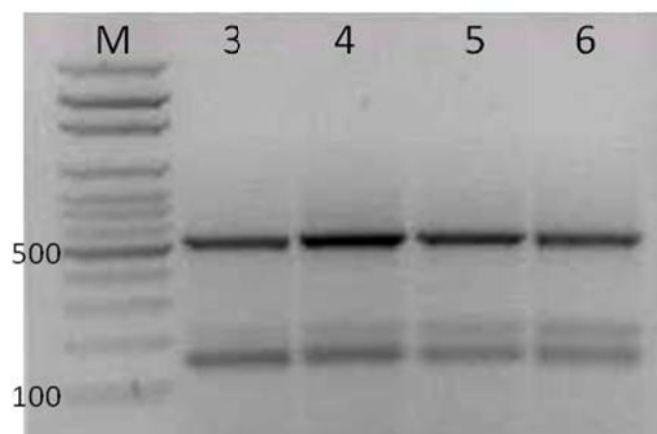


Figura 13. Gradiente de $MgCl_2$ realizados en la cepa de referencia *C. albicans* SC5413. Los números indican las concentraciones en mM. M es marcador de peso molecular.

En la tabla VII se muestran las concentraciones de cada uno de los elementos de la PCR a la que se llegó con todas las pruebas realizadas.

Tabla VII. Fórmula final para la reacción de PCR múltiple

Reactivo	Volumen final (μ l)	Concentración Final
Green color buffer 5x	5	1x
$MgCl_2$ 25mM	6	6mM
dNTPs 1 μ M	2.5	0.1 μ M
ITS1 10 μ M	0.5	0.2 μ M
ITS2 10 μ M	0.5	0.2 μ M
ITS4 10 μ M	0.5	0.2 μ M
CTR1 10 μ M	0.5	0.2 μ M
CTR2 10 μ M	0.5	0.2 μ M
Ralb1 10 μ M	2.5	1 μ M
Ralb2 10 μ M	2.5	1 μ M
Polimerasa	0.25	1.25u
DNA	2	
Volumen final	25μl	

VI.2 PCR múltiple para muestras ambientales

Como resultado de todas las pruebas anteriores, se estableció el protocolo para la PCR múltiple (ver Materiales y Métodos) y se realizó la prueba a todos los aislados de las muestras que se colectaron en el Hospital General de Ensenada. En la figura 14 se muestran los patrones de bandas de cada una de las muestras procesadas. Se analizaron 53 muestras positivas a *Candida*. Con el método de PCR múltiple se logró identificar que el 66% (33/53) corresponden a *C. albicans*, el 26.4%(16/53) a *C. glabrata*, y el 7.5% (4/53) a *C. parapsilosis* como se muestra en la figura 15.

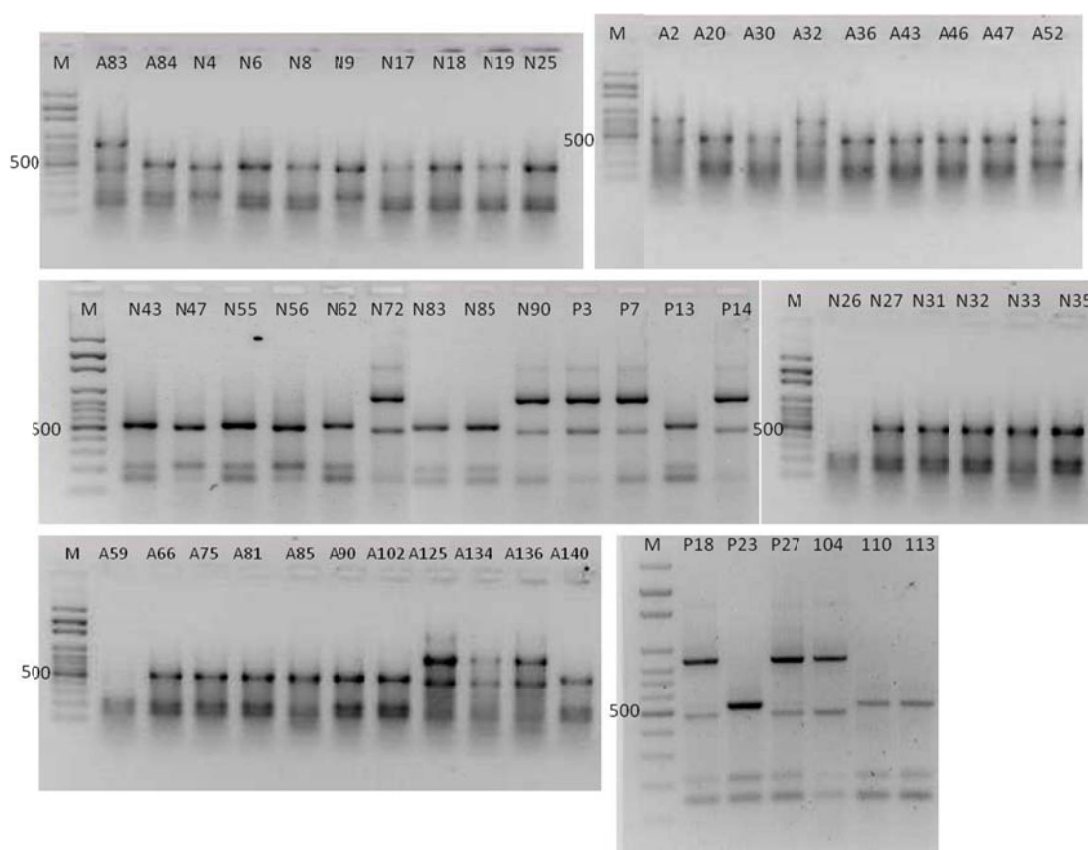


Figura 14. PCR múltiple de las muestras colectadas del Hospital General de Ensenada. Los números indican el código de registro de las pacientes.

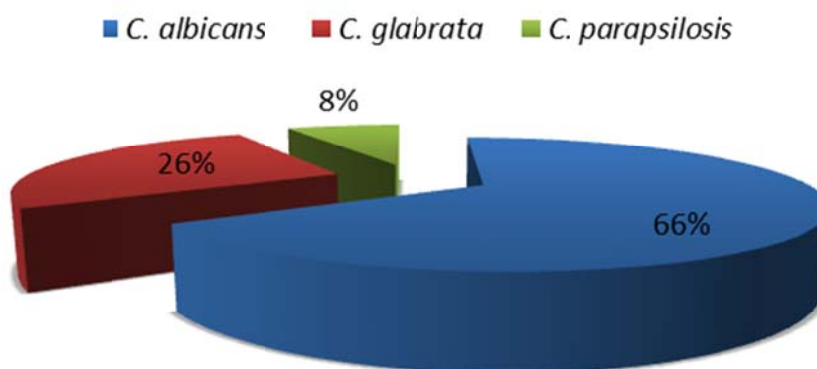


Figura 15. Porcentaje de las especies de *Candida* identificadas por el método de PCR múltiple.

VI.3 PCR-RFLP a muestras ambientales

A las 55 muestras positivas, se les aplicó el método de PCR-RFLP como estándar para comparar el método propuesto en este trabajo. La figura 16 muestra los patrones de bandas posteriores a la digestión con *MspI* la amplificación de ITS1-ITS4. Con éste método se determinó que el 62.3% (33/53) pertenecen a la especie *C. albicans*, el 30.2% (16/53) corresponden a *C. glabrata* y el 7.5% (4/53) corresponden a *C. parapsilosis*, como se muestra en la figura 17.

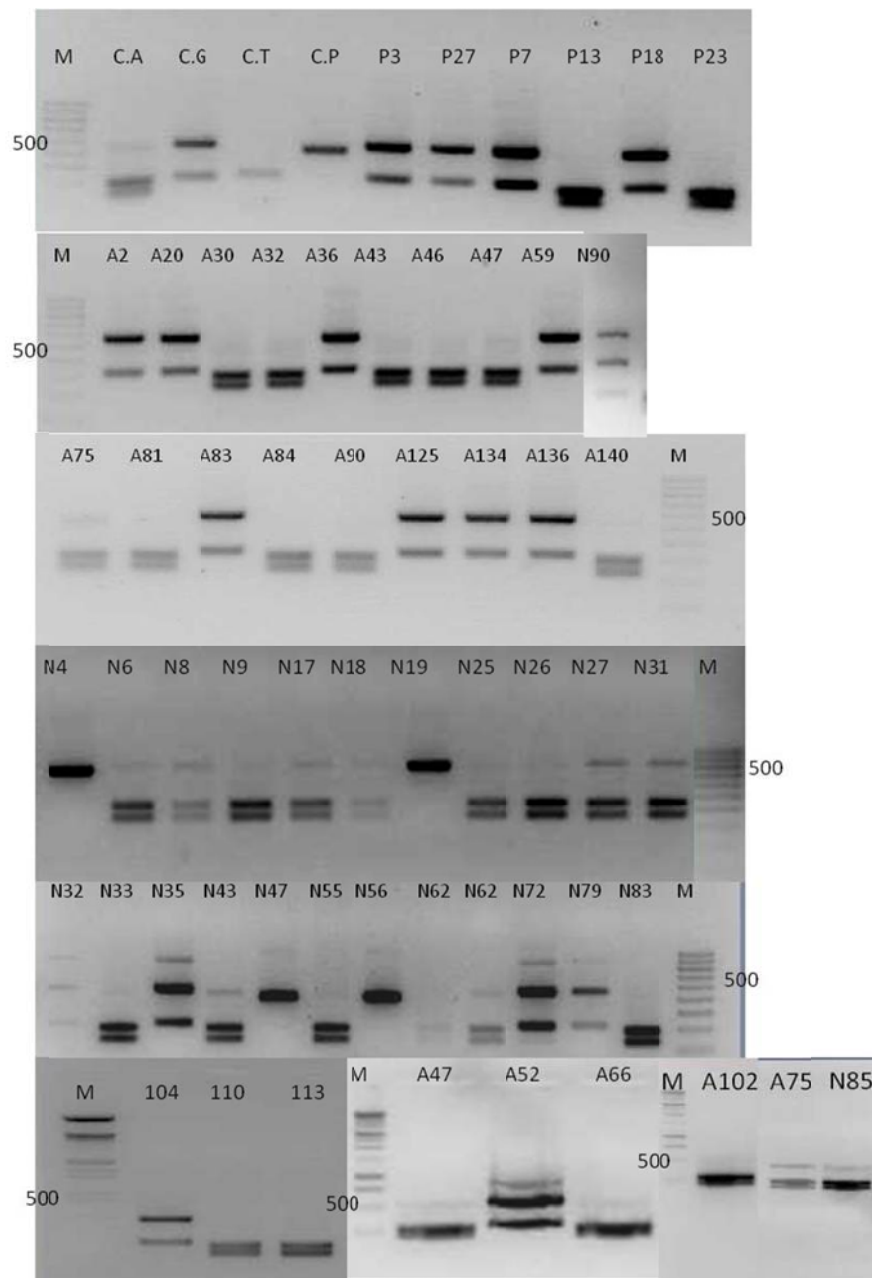


Figura 16. PCR-RFLP de las muestras colectadas a pacientes ginecológicas del Hospital General de Ensenada.

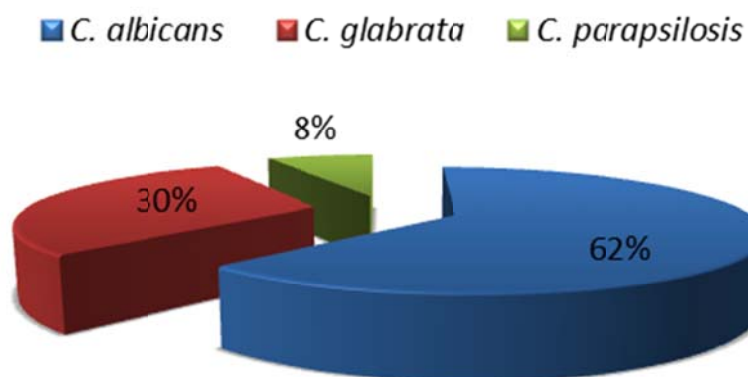


Figura 17. Porcentaje de las especies identificadas por el método de PCR-RFLP de las muestras colectadas en el Hospital General de Ensenada.

VI.4 Comparación de resultados de PCR múltiple y PCR-RFLP

La tabla VIII muestra los resultados de cada una de las pruebas realizadas en cada muestra. El diagnóstico de especie en ambas pruebas tuvieron una gran similitud con una correlación de Spearman de 0.8 con una significancia de $p < 0.05$. Se observó coincidencia en el diagnóstico de especie en el 92.4% de los casos y solo 7.6% no coincidieron (Figura 18). Dos muestras no coincidieron entre *C. parapsilosis* y *C. albicans* y otras dos entre *C. glabrata* y *C. albicans*.

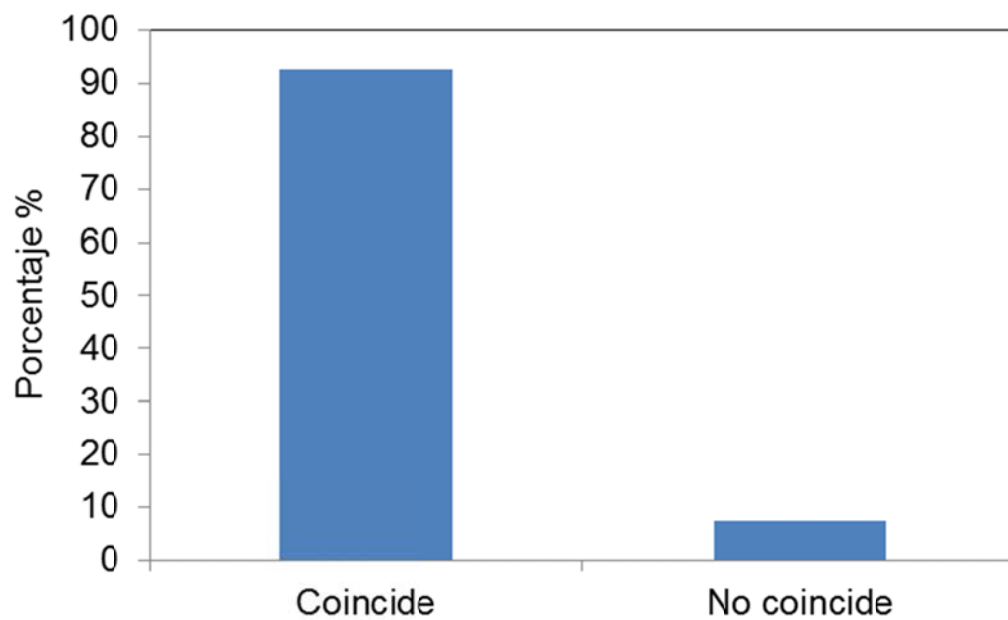


Figura 18. *Porcentaje de diagnósticos de especies que coinciden y no coinciden entre el PCR-RFLP y el PCR múltiple.*

Tabla VIII. Comparación de las especies identificadas por los dos métodos moleculares utilizados en este trabajo.

Cepa	PCR-RFLP	PCR múltiple	Cepa	PCR-RFLP	PCR múltiple
A2	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	N18	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A20	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N19	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
A30	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A32	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	N26	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A36	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N27	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A43	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N31	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A46	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N32	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
A47	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N33	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A52	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	N35	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
A59	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N43	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A66	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N47	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
A75	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N55	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A81	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N56	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
A83	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	N62	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A84	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N72	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
A90	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N83	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A102	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	N85	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
A125	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	N90	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
A134	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	P3	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
A136	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	P7	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
A140	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	P13	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
N4	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	P18	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
N6	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	P23	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
N8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	P27	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
N9	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	104	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
N17	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	110	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
			113	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

VII.5 Costo y tiempo

En cuanto a tiempo y costo el método de PCR múltiple, se obtuvo un resultado en ~5 h, mientras que el PCR-RFLP lo hizo en ~9 horas. El costo de materiales para la realización del PCR múltiple es de aproximadamente 250 dólares. Mientras que con PCR-RFLP es de aproximadamente 400 dólares. Estos

valores incluyen el precio de la GoTaq® DNA Polymerase y la enzima de restricción MspI Promega®.

VII. DISCUSION

Una situación a la que se enfrentan los médicos clínicos es el hecho de tener que dar una respuesta terapéutica inmediata ante un problema de salud, en el caso de las infecciones, en ocasiones tienen que prescribir un fármaco sin conocer el agente etiológico. En muchos casos esto no tiene importancia, sin embargo en las candidiasis se ha visto que si hay una respuesta diferencial al tratamiento dependiendo de qué especie es la que está involucrada, por lo que el conocimiento rápido del agente etiológico sería de gran apoyo para los clínicos. En este sentido, los métodos convencionales para la identificación de especies de *Candida* de importancia clínica, si bien son una herramienta útil como aislamiento primario, no proporcionan un resultado rápido y confiable para proveer un diagnóstico seguro sobre la especie causante de la infección. Desde los 90's, varios métodos de diagnóstico moleculares se han desarrollado tratando de detectar secuencias genómicas específicas de *Candida* con el fin de tener un método factible, rápido, eficiente y sensible para el diagnóstico de la candidiasis. Diferentes aislamientos pertenecientes a la misma especie se distinguen por biotipificación o serotipificación. Actualmente, utilizando métodos de caracterización molecular, va más allá de una identificación primaria, siendo incluso posible identificar si los diferentes aislamientos pertenecen a la misma cepa (Alcoba *et al.*, 2007).

El PCR múltiple es un método que ha sido utilizado por varios investigadores para la identificación de *Candida* en muestras clínicas (Chang-Chang *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2001; Luo y Mitchell, 2002; Liguori *et al.*, 2007;

Innings *et al.*, 2007) es un método confiable ya que da información de varios oligonucleótidos en una sola reacción, donde además en estos oligonucleótidos se pueden incluir pares especie-específicos. El método proporciona la confiabilidad de ser un método molecular que garantiza la identificación a nivel de especie en cuestión de horas. En este trabajo se desarrolló un método de PCR múltiple para la identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ginecológicas, considerando las cuatro especies que se presentan con mayor frecuencia (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*). Este método fue estandarizado para su uso y posteriormente comparado con el método ya validado de PCR-RFLP (Mirhendi *et al.*, 2006). Los oligonucleótidos que se utilizaron para el PCR múltiple fueron: ITS1, ITS2, ITS4 (oligonucleótidos universales) CTR1, CTR2, Ralb1 y Ralb2 (oligonucleótidos especie-específicos).

Los oligonucleótidos seleccionados fueron aquellos que demostraron mayor eficiencia en trabajos previos. Sin embargo, a pesar de que se ha reportado que los pares de oligonucleótidos CA3-CA4 (Chang-Chang *et al.*, 2001, Liguori *et al.*, 2007) eran específicos para amplificar un segmento de la región ITS2 de *C. albicans*, en este trabajo se demostró que este par de oligonucleótidos amplificó en todas las cepas de referencia estudiadas, por lo que no es útil para la discriminación de cepas de *C. albicans*. En el estudio de Chang-Chang *et al.* (2001) las muestras analizadas eran sanguíneas y en el estudio de Liguori *et al.* (2007) eran enjuagues de la cavidad oral de pacientes con VIH. Sin embargo, el origen de las muestras no debería ser un obstáculo para que un par de oligonucleótidos diseñados para amplificar exclusivamente en una especie lo hagan en todas. Para establecer más a fondo este punto se alinearon los oligonucleótidos con cada una de las secuencias de la región ITS de las diferentes especies y se encontró que en todos había una homología de más de 16 pb por lo que se recomienda discontinuar el uso de estas secuencias para la identificación de *C. albicans*.

Además de los reportados en la literatura, en este trabajo se utilizaron nuevos oligonucleótidos diseñados específicamente (Ralb1 y Ralb2) para *C. albicans*, que amplifican una porción de la región 18s-ITS1-5.8s-ITS2-28s. Este par de oligonucleótidos resulta en un amplicón de 84 pb que es un fragmento pequeño, que solo apareció en las cepas *C. albicans*. Aunque hubo algunos problemas para que se amplificara este fragmento cuando se mezclaron con los demás oligonucleótidos, esto fue probablemente por la necesidad de mayor concentración de los mismos y por la necesidad de mayor concentración de $MgCl_2$, además de todos los reactivos de la PCR. Al realizar los ajustes pertinentes, no hubo ningún problema en la amplificación de este fragmento que es muy importante para diferenciar las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Posterior a todo el proceso de estandarización, se logró obtener un método de PCR múltiple altamente confiable, que identificó el 92.4% de las especies de *Candida*. Solo en cuatro muestras no hubo coincidencia del diagnóstico de especie con el método de PCR-RFLP, en dos se identificó *C. albicans* como *C. parapsilosis* y en las otras dos se identificó como *C. glabrata* por *C. albicans*. Cabe señalar que en el segundo caso muy probablemente sea un error del PCR-RFLP y no del PCR múltiple debido a que el tamaño de ambas bandas amplificadas son un sello característico de *C. glabrata*.

Aunque el PCR-RFLP es un método estandarizado y utilizado para identificación de diferentes especies, es un método que requiere además de la amplificación de fragmentos por PCR, la digestión enzimática, que lleva más tiempo, y costos adicionales. La digestión enzimática por si misma puede tener algunos inconvenientes ya que la eficiencia de la enzima se ve afectada con el tiempo de uso o las condiciones de la reacción. Como por ejemplo el tiempo de digestión que cuando es corto, no hay la reacción deseada y no se generan los fragmentos y por el contrario cuando es prolongada se hacen cortes de más.

Tanto el método de PCR-RFLP como el PCR múltiple son métodos confiables para la identificación a nivel de especie (López *et al.*, 2005, Weissenbacher *et al.*, 2009, Liguori *et al.*, 2010). En este trabajo se observó que el PCR múltiple proporciona una eficiencia similar que el PCR-RFLP con la ventaja de dar un resultado en menor tiempo y menor costo.

VIII. CONCLUSIONES

- El método de PCR múltiple desarrollado en este trabajo demostró ser fácil de aplicar, altamente confiable y muy útil para la identificación de las cuatro especies más importantes de *Candida* en aislamientos vaginales.
- El método de PCR múltiple es de relativo bajo costo y puede tener el resultado de la especie aislada en menos de 24 horas.
- El porcentaje de concordancia de los dos métodos es del 92.4%.
- Los oligonucleótidos CA3 y CA4 amplifican en todas las especies y no exclusivamente en *C. albicans*.
- Los oligonucleótidos Ralb1 y Ralb2 diseñados en este trabajo amplificaron es específico para *C. albicans*.
- El método PCR múltiple identificó 66% como *C. albicans*, el 26.4% como *C. glabrata* y el 7.5% como *C. parapsilosis*.

IX. REFERENCIAS

- Alcoba, J., J. Alcoba-Flórez, M. del P. Arévalo-Morales, E. Perez-Roth, F. Laich, B. Rivero Pérez y S. Méndez-Álvarez. 2007. Yeast molecular identification and typing. *Communicating Current Research and Educational Topics in Applied Microbiology*. 535-546.
- Alexopoulos, C. J. 1977. *Introducción a la Micología*. Eudeba. 1ra Ed. Argentina. 660 pp.
- Arreola-Cruz, A. 2009. *Epidemiología molecular de Candida spp en pacientes gineco- obstétricas*. Tesis de maestría. CICESE. Ensenada, B.C. 73 pp.
- Ayatollahi, M., S. A., E. Khaledi, B. Shahidi, S. Aghighi, F. Sharifi y F. Aram. 2007. Rapid Molecular Diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Biotechnology*. 6(4):583-587.
- Bial, A. 2002. El reino de los hongos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19:1-4.
- Buitrón-García, R., J. Araiza-Santibañez, E. Basurto-Kuba y A. Bonifaz-Trujillo. 2009. *Candida glabrata*: un oportunista emergente en vulvovaginitis. *Cirugía y Cirujanos*; 77(6):455-460.
- Cassone, A., F. De Bernardis y G. Santoni. 2007. AntiCandidal Immunity and Vaginitis: Novel Opportunities for Immune Intervention. *Infection and immunity*. 75(10):4675-4686.
- Castro-Méndez, C. y E. Martín-Mazuelos. 2005. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dublinensis*. *Control de Calidad SEIMC*.1-10.

- Chang-Chang H., S. Ning Leaw, A. Huey Huang, T. Lan Wu y T. Chang Chang. 2001. Rapid identification of yeast in positive blood cultures by a Multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(10):3466-3471.
- Colombo L. A., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouér, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. Warnock y J. Morgan. 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in eleven Medical Centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(8):2816-2823.
- Domino S., E. Hurd, K. Thomsson, D. M. Karnak, J. M. Holmén-Larsson, E. Thomsson, M. Bäckström y G. C. Hansson. 2009. Cervical mucins carry α (1,2) fucosylated glycans that partly protect from experimental vaginal candidiasis. *Glycoconjugate Journal*. 26(9):1125-34.
- Edmond M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. Jones y R. P. Wenzel. 1999. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A three-year Analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 29(2):239-244.
- Fujita, S., Y. Senda, S. Nakaguchi y T. Hashimoto. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for Rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(10): 3617-3622.
- García-Heredia, M., S. D. García, E. F. Copolillo, M. Cora Eliseth, A. D. Barata, C. A. Vay, R. A. de Torres, N. Tiroboschi y A. M. R. Famiglietti. 2006. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Argentina de Microbiología*. 38:9-12.
- Iglesias-Benavides, J. L., D. Saldívar-Rodríguez, R. Tijerina-Menchaca, G. González-González, E. Garza-González, y E. Rosales-Tristán. 2007. Especies de *Candida* no albicans en la consulta de ginecología. *Medicina Universitaria*. 9(37):161-5.
- Innings, A., M. Ullberg, A. Johansson, C. Johan Rubin, N. Noreus, M. Isaksson y B. Herrmann. 2007. Multiplex Real-time PCR targeting the RNase P RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(3):874-880 p.
- James T. Y., F. Kauff, C. L. Schoch, P. B. Matheny, V. Hofstetter, C. J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H. T. Lumbsch, A. Rauhut, V.

- Reeb, A. E. Arnold, A. Amtoft, J. E. Stajich, K. Hosaka, G.H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J. M. Curtis, J. C. Slot, Z. Wang, A. W. Wilson, A. Schüßler, J. E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P. M. Letcher, M. J. Powell, J. W. Taylor, M. M. White, G. W. Griffith, D. R. Davies, R. A. Humber, J. B. Morton, J. Sugiyama, A. Y. Rossman, J. D. Rogers, D. H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R. A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkmann-Kohlmeyer, R. A. Spotts, M. Serdani, P. W. Crous, K. W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W. A. Untereiner, R. Lücking, B. Büdel, D. M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D. S. Hibbett, F. Lutzoni, D. J. McLaughlin, J. W. Spatafora y R. Vilgalys. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443(19):818-820.
- Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupanic y B. P. Cormack. 2005. A yeast by other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current opinion in microbiology*. 8:378-348.
- Larone, D. H. 2002. Medically important fungi. U.S.A ASM PRESS. 54:109-132.
- Liguori, G., A. Lucariello, G. Colella, A. De Luca y P. Marinell. 2007. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *Journal of Clinical Pathology*. 60:1035-1039.
- Liguori, G., F. Gallé, A. Lucariello, V. Di Onofrio, L. Albano, G. Mazzearella, M. D'Amora y F. Rossano. 2010. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. Identification. *New Micribiologica*. 33:63-67.
- Linares-Sicilia, M. y F. Solis-Cuesta. 2001. Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*. ISBN: 84-607-3050-6.
- Liu X., S. Fan, F. Bai, J. Li y K. P. Liao. 2009. Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. 52(1):24-28.
- López C., L. Giro, L. Ramos, S. Ramadán y L. Bulacio. 2005. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*. 37:16-21.
- Luo, G. y T. G. Mitchell. 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(8):2860-2865.

- Martínez, E., J. Eslava-García, M. Gaitán-Calvo, R. López-Carrasco, F. Gómez-Padilla, Z. Cabuto-López, J. Mayorga y R. Arenas. 2008. Candidiasis cutánea: utilidad del CHROMagar Candida en la identificación de especies. *Dermatología Revista Mexicana*. 52(3):121-6.
- Méndez, L., M. R. López y H. F. Hernández. 2008. Actualidades en Micología Médica. UNAM. 4ta Ed. México, D.F. 440.
- Mendoza, M., I. González, E. J. Bellorin, W. Salazar, L. Mendoza, E. A. Zambrano y M. C. de Albornoz. 1999. Aislamiento, identificación y serotipificación de levaduras obtenidas del flujo vaginal en pacientes con clínica de vaginitis. *Investigación Clínica*. 40(1):25-36.
- Mirhendi H., K. Makimura, M. Khoramizadeh y H. Yamaguchi. 2006. A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of six medically important *Candida* species. *Japan Journal of Medical Mycology*. 47:225-229.
- Molero, G., R. Díez-Orejas, F. Navarro-García, L. Monteoliva L, J. Pla, C. Gil, M. Sánchez-Pérez y C. Nombela. 1998. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiology*. 1:95-106.
- Muller, G. M. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and Conservation*. 16:1-5.
- Orberá-Ratón, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 15-19.
- Pimentel Sarzuri, B. y E. Reynolds. 2007. Candidiasis Vaginal. *Revista Paceyña de Medicina Familiar*. 4(6):121-127.
- 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 y Microbiología Clínica*. 24(10):634-636.
- Rivero, M., J. Díaz y S. Centeno. 2003. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 23(2):148-152.
- Sobel, J. D. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 369:1961-1971.
- Stine, G. 2008. AIDS update 2008. McGraw-Hill. 17ma Ed. 528 pp.

Villanueva-Reyes, J. y R. Arenas. 2007. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. *Revista Mexicana de Micología*. 25:91-104.

Weissenbacher T., S. Witkin, W. Ledger, V. Tolbert, A. Gingelmaier, C. Scholz, E. R. Weissenbacher, K. Friese y I. Mylonas. 2009. Relationship between clinical diagnosis or recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 279:125-129.