



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“ANALISIS MOLECULAR DE DIFERENTES  
AISLADOS DE Candida albicans USANDO ANALISIS  
DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS  
FRAGMENTOS DE RESTRICCION ( RFLP ) Y  
AMPLIFICACION AL AZAR DE DNA POLIMORFICO  
( RAPD )”.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
HILDA ALICIA VALDEZ SALAZAR

DIRECTORES: DR. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO  
Q.F.B. MARIA ESTHER REVUELTA MIRANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
AVENIDA DE LAS FUENTES  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Análisis Molecular de diferentes aislados de Candida albicans usando análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RELP) y amplificación al azar de DNA polimorfo (RAPD).

que presenta la pasante: Hilda Alicia Valdez Salazar.  
con número de cuentas: 8958043-1 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Biológica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 10 de Abril de 1990

PRESIDENTE Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

VOCAL M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO Q. Arcadia Hernández Beltrán

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Carolina Moreno Ramos

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Carolina Segundo Zaragoza

## **DEDICATORIA.**

Por concederme la dicha de contar con una familia maravillosa.  
Por tener la oportunidad de vivir y alcanzar mis metas.  
Por darme fe, esperanza y amor.  
Por ayudarme a mantenerme siempre firme en mis éxitos y fracasos.  
**GRACIAS DIOS** mío por tener mucho que agradecer y poco que pedir.

Por darme la vida, por darme siempre su confianza,  
Por sus palabras de aliento para seguir siempre adelante que dan fuerza a mi vida y  
que me hacen sentir que nunca he estado sola.....A MARGARITA.

Porque supo enseñarme la alegría del trabajo e  
inculcarme siempre ese anhelo de superación.....A PABLO.

**A ELLOS**

Por ser unos padres excepcionales, por darme la oportunidad de ser alguien en la vida, por  
ser el motivo de mi lucha.... GRACIAS PAPÁS.

**A MIS HERMANOS:**

Pablo, Mony, Cesar, Christian y Alex  
Por la alegría que me brindan al estar a su lado,  
por toda su ayuda y comprensión.

**A LOS PEQUEÑOS:**

Ely, Dante y Laura; mis sobrinos.  
Por transmitirme su inocencia y alegría  
Ojalá que este pequeño esfuerzo sea un estímulo de superación para ustedes  
**LOS QUIERO.**

**A RODOLFO:**

Por el amor incondicional que siempre me has demostrado,  
Por enseñarme y darme todo lo que sabes y tienes.  
Pero sobre todo por tu gran ayuda y comprensión.  
Para ti; que tu compañía ha sido inspiración en mi vida y no me dejas caer.  
Nunca te defraudaré.....TE AMO.

**A MI ASESOR DE TESIS Con cariño:**

**Dr. José Antonio Enciso Moreno.**

**Por su paciencia y confianza.**

**Por la aportación de sus conocimientos y el tiempo dedicado.**

**Por mostrar el entusiasmo y apoyo necesario para dar término a lo que  
ahora se convertirá en solo el principio de lo que queda por delante.**

**Por ser amigo y maestro, en esta etapa de mi vida.**

**MIL GRACIAS.**

**A MI COASESOR DE TESIS Con cariño:**

**Q.F.B. Maria Esther Revuelta Miranda.**

**Por confiar en mí, por su gran calidad como persona  
y por toda su ayuda y apoyo.**

**GRACIAS.**

**A MIS AMIGOS:**

Martha, Ana, Checo, Toto, Adriana, Rosa, Matilde, Eva, Gaby, Ernes, Lucia y Javier.  
Por la amistad sincera y leal que me brindan, por los consejos, los momentos gratos  
y por poder contar con ustedes en los momentos alegres y difíciles de la vida

A una gran amiga:  
**AMANDA**, quien me ha ayudado de manera desinteresada  
y me ha tendido la mano cuando la he necesitado,  
gracias por brindarme tu amistad y apoyo. este trabajo también es tuyo.

**A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO:**

Gloria, Norma, Maribel, Paty, Mónica, Alma, Loenor, Mauricio y Ricardo.  
Por todo lo que he aprendido de ustedes.....GRACIAS

**A JUANA MARTÍNEZ REYES**  
Por todos los momentos agradables y  
porque sé que tu amistad no será pasajera.

**A Oscar, Caltenco, Belem, Raul Ulloa, Yelda, Felipe, Noemi y Raúl**  
Por ser ejemplo a seguir.

**A MIS JEFES:**  
**Dr. Rogelio Alonso Morales y**  
**Dra. Irma Rosas Pérez.**  
Por su confianza, ayuda y amistad.

**AGRADECIMIENTOS:**

**Dr. José Antonio Enciso Moreno.**  
**Biol. Amanda Gayosso Vázquez.**  
**Porque sin su valiosa ayuda hubiese sido más difícil la culminación de éste trabajo.**

**Dra. Gloria María Calderón Rodríguez.**  
**Por su gran ayuda durante todo este tiempo.**

**Dr. Humberto Díaz Ponce.**  
**Dra. Teresa Gutiérrez Guevara.**  
**Por darnos la confianza y oportunidad de interactuar con ellos.**

**AL H. JURADO:**

Q.F.B. María Esther Revuelta Miranda.

M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo.

Q. Arcadía Hernández Beltrán.

Q.F.B. Carolina Moreno Ramos.

Q.F.B. Carolina Segundo Zaragoza.

Por sus comentarios tan valiosos y tiempo dedicado en la revisión de la tesis **GRACIAS**

Este trabajo experimental de tesis fue apoyado por  
el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
y el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)  
a través de fondos otorgados al proyecto 0796 P M-9506.

## INDICE

	Pág.
Resumen	6
Abreviaturas	6
<b>1. Objetivos.</b>	<b>1</b>
<b>2. Justificación.</b>	<b>2</b>
<b>3. Generalidades.</b>	<b>3</b>
3.1 Formas clínicas de infección por <i>Candida albicans</i> .	
3.1.1 Cutáneo mucosas	5
3.1.2 Granuloma candidósico	6
3.1.3 Candidosis profundas o viscerales	6
3.1.4 Candidosis septicémicas	7
3.2 Epidemiología.	7
3.3 Serotipos.	9
3.4 Tratamiento.	10
3.5 Diagnóstico.	
3.5.1 Morfológico.	11
3.5.2 Serológico.	12
3.5.3 Celular	13
3.5.4 Bioquímico.	14
3.6 Aspectos inmunológicos de <i>C. albicans</i> .	14
3.7 Antígenos principales.	15
<b>4. Métodos generales para la identificación y tipificación de <i>C. albicans</i>.</b>	
4.1. Técnicas básicas	
4.1.1 Digestión del DNA con enzimas de restricción	18
4.1.2 Electroforesis del DNA	19
4.1.3 Tinción de geles de agarosa con bromuro de etidio	20
4.2 Biología molecular.	20
4.3 Regiones genéticas relevantes en <i>C. albicans</i> .	22
<b>5. Material y métodos.</b>	
5.1 Muestras biológicas.	27
5.2 Obtención de <i>C. albicans</i> a partir de su cultivo.	27

	Pág.
5.3 Preparación de esferoplastos.	28
5.4 Extracción de DNA de <i>C. albicans</i> .	28
5.5 Cuantificación de DNA de <i>C. albicans</i> .	30
5.6. Electroforesis del DNA de <i>C. albicans</i> .	30
5.7 Tinción de geles de agarosa con bromuro de etidio.	32
5.8 Digestión de DNA de <i>C. albicans</i> con enzimas de restricción.	32
5.9 Amplificación al azar de DNA polimorfo (RAPD-PCR).	33
5.10 Análisis estadístico.	34
<b>6. Resultados.</b>	
6.1 Clasificación de las cepas de acuerdo a sus rasgos clínicos, serotipos y sensibilidad a antimicóticos	36
6.2 Extracción de DNA de cepas de <i>C. albicans</i> .	39
6.3 Restricción del DNA <i>C. albicans</i> con Eco RI.	39
6.3.1 Dendograma de los fingerprinting de DNA obtenidos mediante la digestión del DNA de <i>C. albicans</i> con Eco RI (RFLP).	43
6.4 Restricción del DNA de <i>C. albicans</i> usando Xba I.	43
6.4.1 Dendograma de los fingerprinting de DNA obtenidos mediante la digestión del DNA de <i>C. albicans</i> con Xba I (RFLP).	47
6.5 Amplificación al azar de DNA polimorfo de <i>C. albicans</i> (RAPD-PCR).	47
6.5.1 Dendograma del análisis mediante RAPD-PCR de cepas de <i>C. albicans</i> .	47
6.6 Agrupación de los patrones de DNA obtenidos mediante el análisis por RFLP y RAPD-PCR.	52
6.6.1 Correlación de los grupos mediante RFLP y RAPD-PCR con el serotipo y sensibilidad a diferentes antimicóticos.	52
<b>7. Análisis de resultados.</b>	57
<b>8. Conclusiones.</b>	60
<b>9. Glosario.</b>	61
<b>10. Bibliografía.</b>	68

## RESUMEN

Los métodos de tipificación fenotípica tradicionales para diferentes microorganismos, como *Candida albicans*, presentan problemas tales como: variabilidad de ensayo a ensayo, cambios fenotípicos relacionados con degradación de marcadores biológicos durante su almacenamiento, expresión diferencial de marcadores, etc. Debido a esta inestabilidad en la definición de marcadores fenotípicos adecuados, se ha planteado la utilización de moléculas más estables, como es el caso del DNA, en ensayos de tipificación molecular para diferentes microorganismos patógenos, relacionando además dichos perfiles genotípicos con factores de resistencia y patogenicidad.

El objetivo de este estudio fué establecer métodos de tipificación de cepas de *C. albicans* utilizando RFLP y RAPD. Para lo cual se analizó el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción de DNA (fingerprinting), de 41 aislados de *C. albicans*, utilizandose las endonucleasas de restricción Eco RI y Xba I. Por otro lado se utilizó el método de RAPD usando 3 iniciadores al azar con secuencia: GTGCAATGAG, CAATGCGTCT, CGTCTAGAGC.

Se identificaron para Eco RI, 6 grupos con bandas de peso molecular entre 1412 y 21420 pares de bases (pb); y 3 para XbaI, con bandas de 554 a 14307 pb. Para el análisis de RAPD se obtuvieron 14 grupos con bandas entre 181 y 1390 pb. En el grupo I del análisis de RFLP se situaron 76% de las cepas serotipo A y 23% con serotipo B sin lograr una clara discriminación hacia sus patrones de sensibilidad. Los grupos II y III fueron formados exclusivamente por cepas de serotipo A, siendo el total de ellas sensibles a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, mientras que solo 50% fueron sensibles a ketoconazol. Cuando la correlación se hizo utilizando los

patrones de RFLP con Eco RI como enzima de restricción, se encontró que los grupos II, III, IV y V, englobaron al 100% de cepas con serotipo A.

El análisis discriminativo con los patrones de RFLP obtenidos con Xba I resultó más adecuado que los patrones obtenidos con Eco RI, por lo que sugerimos utilizar esta enzima en ensayos de RFLP para facilitar la tipificación de diferentes aislados de *C. albicans*. No obstante, seguimos el uso de un marcador molecular que pueda ser utilizado como sonda en ensayos de Southern blot para facilitar aún más el análisis de diferentes aislados de *C. albicans* por RFLP. Aunque el análisis utilizando RAPD mostró un mayor número de grupos a nivel de discriminación del 80% para el total de bandas de amplificación de DNA, la correlación de estos perfiles con serotipo y sensibilidad permitió un mejor análisis discriminativo que cuando se utilizaron los métodos de RFLP con Eco RI y Xba I. De los 14 grupos formados mediante el análisis por RAPD, el I, IV, XI y XII conformaron al mayor número de cepas con serotipo A. Estos grupos incluyeron además al mayor número de cepas sensibles a anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

El análisis de RAPD permitió la amplificación de tres bandas de peso molecular de 541, 714 y 840 pb respectivamente. Estas secuencias amplificadas pueden ser utilizadas como marcadores específicos de *C. albicans*. Estas bandas no fueron amplificadas ni en DNA de *Mycobacterium tuberculosis* y tampoco en DNA de *Serratia marcescens*. Desde el punto de vista metodológico, el método de RAPD resultó más ventajoso que el análisis de RFLP dada su simplicidad, tanto en la realización como en el análisis de los resultados.

## ABREVIATURAS

<b>AP-PCR</b>	PCR con <i>primers</i> arbitrarios.
<b>API 20C</b>	Kit de identificación bioquímica para levaduras.
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>C3</b>	Factor 3 del complemento.
<b>D</b>	Dalton.
<b>DAF</b>	Amplificación de fingerprinting de DNA.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>dNTP</b>	Deoxinucleotidos.
<b>Eco RI</b>	Enzima de restricción aislada de <i>Escherichia coli</i> .
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetracético.
<b>GlcNAc</b>	N-acetil D-glucosamina.
<b>GRAM</b>	Tinción diferencial para bacterias.
<b>iC3b</b>	Fragmento de C3 del complemento con función opsonizante.
<b>ID32-C</b>	Kit de identificación bioquímica para levaduras.
<b>Kb</b>	Kilo bases
<b>LDM</b>	Lanosterol 14 alfa-dimetilasa.
<b>MPT</b>	Timidilato sintetasa.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>RAPD-PCR</b>	Amplificación de DNA polimórfico al azar.
<b>RFLP</b>	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>TAE</b>	Amortiguador de Tris/Acetato/EDTA.

**TE** Amortiguador de Tris/EDTA  
**Tm** Temperatura de desnaturalización  
**Xba I** Enzima de restricción aislada de *Xanthoma bradii*

## 1. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL.

1) Determinar el polimorfismo del DNA de diferentes aislados de Candida albicans en el Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

1) Establecer métodos de tipificación de cepas de C. albicans utilizando polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD-PCR).

2) Analizar la relación existente entre patrones de RFLP's y RAPD's con el serotipo y la resistencia a fluconazol, ketoconazol, itraconazol y anfotericina B de aislados de C. albicans.

3) Evaluar las relaciones genotípicas de aislados de C. albicans obtenidos en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI.

## 2. JUSTIFICACIÓN.

A pesar de todos los avances metodológicos sobre candidosis, en México hay carencia de estudios epidemiológicos a nivel molecular para estos microorganismos, lo cual ha impedido la caracterización de cepas autóctonas, dificultando así la terapia con diferentes fármacos de manera controlada.

Se han desarrollado un gran número de métodos genotípicos para la identificación de cepas de *C. albicans*, entre los que se encuentran reasociación DNA-DNA, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP), análisis mediante Southern blot y, amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD). Estos presentan ventajas de sensibilidad y reproducibilidad<sup>12, 27, 33, 35, 45</sup>. De todos éstos, los métodos genotípicos de tipificación RFLP y RAPD han mostrado ser muy eficientes para caracterizar diferentes microorganismos, incluyendo *C. albicans*<sup>16, 21, 27</sup>. Los métodos de tipificación han hecho posible la caracterización de aislados con gran precisión, mucho más eficientemente cuando se comparan con los métodos tradicionalmente utilizados<sup>6, 8, 21, 24, 30, 37, 40, 48</sup>.

La caracterización y clasificación genotípica de cepas de *C. albicans* puede permitir en un futuro cercano, correlacionar los patrones de fingerprinting de DNA de *C. albicans* con aspectos fenotípicos importantes como pudieran ser sus patrones de resistencia a antimicóticos.

### 3. GENERALIDADES.

El género *Candida* pertenece a la familia *Criptococcaceae* y se agrupa dentro de los hongos imperfectos *Deuteromycetes*<sup>5, 13</sup>. Las cepas de *Candida albicans* se consideran como patógenos humanos, causando enfermedades localizadas o diseminadas en pacientes normales o inmunocomprometidos<sup>7, 10, 15, 36, 50</sup>. Las infecciones por *C. albicans* son promovidas por diferentes procesos invasivos como catéteres, terapia inmunosupresiva, malignidad, inmadurez celular, inmunodeficiencia, granulocitopenia, agentes antimicrobianos de amplio espectro y abuso de drogas intravenosas, entre otros<sup>9, 16, 48</sup>.

Las levaduras de *C. albicans* se consideran como pleomórficas, esto es, que de acuerdo a las condiciones microambientales pueden adquirir diferente morfología, incluyendo la transición de levadura a forma micelial o filamentosa<sup>40</sup>. Estos hongos poseen un genoma diploide que no muestra ciclo sexual<sup>13</sup>. Un examen microscópico puede revelar levaduras de 2-4µm de diámetro (blastoconidias), pseudohifas ó hifas verdaderas septadas. Una de las características principales de diferenciación de *C. albicans* respecto a otras especies es la formación de tubo germinativo en suero fetal bovino<sup>17</sup>.

Se encuentran reportadas más de 80 especies para el género *Candida*<sup>5, 13</sup>, de las cuales solo 12 son de interés médico. Algunas de éstas son: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*), *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, *C. lipolytica*, *C. lusitanae*.

Entre los mecanismos principales de virulencia descritos para *C. albicans* se encuentran la adhesión a las superficies de las mucosas, la cual se requiere para la persistencia del organismo

infectante en ciertos sitios tales como cavidad oral y vaginal. La resistencia a fagocitosis por macrófagos se ha discutido como un mecanismo por el cual *C. albicans* puede evadir los mecanismos de defensa del huésped. La secreción de enzimas hidrolíticas puede facilitar la patogenicidad para invadir más eficientemente el tejido del huésped o evadir las defensas del huésped a través de la hidrólisis de los anticuerpos. Finalmente la conversión dimórfica de levadura a forma hifal de *C. albicans* puede incrementar la invasividad del patógeno al tejido del huésped<sup>40</sup>.

Hay al menos tres tipos de isoenzimas carboxil proteinasas producidas por *C. albicans*, aunque estas formas de isoenzimas por lo general no se diferencian en estudios clínicos. Varias líneas de evidencia sugieren que la actividad proteolítica extracelular contribuye a la patogenicidad. Se sabe que las cepas más virulentas producen más proteinasa<sup>40</sup>. Kwon-Chung y colaboradores, compararon la virulencia de cepas diferenciadas en producción de proteinasas y demostraron que la producción de proteinasas incrementa la virulencia cuando se compararon con otra cepa deficiente en proteinasas<sup>25</sup>. Esto apoya la consideración de que la deficiencia en proteinasas, y no otros factores, fueron los responsables de los cambios observados en la virulencia. En resumen, la proteinasa no producida constitutivamente, es inducida *in vivo* y puede ser detectada en tejidos infectados, sugiriendo que ésta juega un papel importante en los procesos infecciosos.

Los antimicóticos que más comúnmente se utilizan para el tratamiento de esta levadura son algunos azoles, como miconazol, ketoconazol, itraconazol, anfotericina B y 5-fluorocitocina (5-FU); a este último fármaco, *C. albicans* puede desarrollar resistencia<sup>6,42</sup>. Auger y Col.<sup>3</sup> reportaron

11.3% y 49.7% de resistencia a 5-FC, para el serotipo A y B respectivamente, en un estudio de 666 pacientes en Canadá.

### 3.1 FORMAS CLÍNICAS DE INFECCIÓN POR *C. albicans*.

#### 3.1.1 Cutáneo-mucosas

Las formas clínicas más frecuentes de candidosis son de espectro variado y van desde lesiones superficiales, hasta daños mucho más severos a nivel septicémico, las superficiales de tipo cutaneomucoso son las de diagnóstico más sencillo; de éstas es la estomatitis, algodoncillo o muguet (candidosis pseudomembranosa aguda) que generalmente se presenta en los niños lactantes, prematuros o desnutridos<sup>13, 14</sup> y en los adultos tratados con antibióticos o glucocorticoides generales o locales. La estomatitis consiste en lesiones eritematosas recubiertas por membranas superficiales blanquecinas en la superficie de la mucosa que pueden ser muy dolorosas e impedir que el bebé se alimente; no obstante en algunos casos donde las lesiones son leves o moderadamente intensas, las lesiones no provocan dolor<sup>14</sup>.

La estomatitis comisural o queilosis angular, conocida vulgarmente como "boqueras"<sup>14</sup>, se caracteriza por fisura, eritema y dolor en los ángulos de la boca<sup>10</sup>. Los intertrigos son lesiones de tipo mecánico debido al frotamiento de un pliegue cutáneo; se observan como superficies húmedas y brillantes recubiertas por costras y fragmentos de membranas blanquecinas<sup>14</sup>.

Las candidosis genitales son comunes durante el embarazo, *Candida* necesita pH ácido para su crecimiento que se favorece por el empleo de anovulatorios, anticonceptivos locales,

glucocorticoides o antibióticos de amplio espectro; las lesiones son semejantes a las de los intertrigos, el prurito es intenso y el flujo es opaco de color blanco.

Los abscesos por *Candida* son poco frecuentes y solo se observan en pacientes inmunodeficientes. Cuando *C. albicans* infecta las uñas (onixis), la uña adquiere color amarillo verdoso, se arruga y presenta surcos transversales.

### **3.1.2 Granuloma candidósico.**

La candidosis granulomatosa es rara, se presenta en pacientes con falla inmunológica específica ante *C. albicans*. Estos pacientes presentan anergia a la prueba cutánea con candidina y a otros antígenos, así como linfopenia. Las lesiones son pápulas cubiertas por costras y escamas gruesas, que confluyen para formar placas que se localizan en cara, cuero cabelludo, dedos de manos, tronco, piernas y ocasionalmente faringe.

La candidosis cutaneomucosa crónica es poco frecuente; los pacientes presentan lesiones unguales, de piel y mucosas, resistentes a los tratamientos.

### **3.1.3 Candidosis profundas o viscerales**

Las candidosis profundas o viscerales, no tienen sintomatología propia; se presentan como cuadros de bronquitis subaguda, cuadros pulmonares con disnea, febrícula y expectoración hematomucoide. Pueden desarrollarse cuadros urinarios de cistitis o pielonefritis que llegan hasta insuficiencia renal. Las infecciones del sistema nervioso central pueden traducirse por cuadros de meningitis parenquimatosos, secundarios a abscesos, trombosis o granulomas. El líquido

cefalorraquídeo en estos casos es claro con proteínas disminuidas y glucosa elevada. La endocarditis por candida se manifiesta con fiebre elevada, anemia e insuficiencia cardíaca.

### 3.1.4 Candidosis septicémicas

Las candidosis septicémicas ocurren por otro lado, en pacientes con inmunodeficiencias graves, la mayoría que padece candidemia sufre enfermedad diseminada<sup>14</sup>. Pueden ser secundarias al uso de jeringas contaminadas, por empleo de catéteres también contaminados o por generación de lesiones viscerales profundas<sup>13</sup>. Personas con cáncer, receptores de trasplantes de órganos, lactantes prematuros debilitados, inmunodeficientes, y complicación de cirugía mayor presentan una alta tendencia para candidosis diseminada<sup>14</sup>. La candidosis septicémica aparece como consecuencia de tratamiento inmunosupresor (citotóxicos y glucocorticoides) en pacientes hematológicos y el diagnóstico es hecho por hemocultivo<sup>11</sup>. Los sitios más frecuentes de infección en sujetos con candidosis diseminada son pulmones, riñones, hígado, bazo y cerebro<sup>11</sup>.

## 3.2 EPIDEMIOLOGÍA.

*Candida albicans* es la especie dentro del género *Candida* de mayor importancia clínica; se ha aislado del suelo, del follaje o del ambiente en sitios donde probablemente ha ocurrido contaminación humana o animal<sup>14</sup>; en general se considera cosmopolita<sup>1</sup>.

En ciertas condiciones habituales, la transmisión de *Candida* parece requerir la aproximación directa de un sitio colonizado a una región de la mucosa o superficie de piel susceptibles. En neonatos, las infecciones bucales o cutáneas se adquieren de la mucosa vaginal

infectada durante el paso del producto por el conducto del parto. Es posible la transmisión entre el pecho materno y la mucosa oral del lactante. Los estudios sobre la transmisión de *Candida* de un lactante a otro en salas de hospitales, indican que es poco frecuente la infección cruzada y que la segregación de lactantes infectados con algodoncillo tiene escaso impacto sobre los índices de infección<sup>14</sup>.

*Candida* es comensal del organismo sano y bajo condiciones de inmunosupresión, puede causar desde leves hasta severas infecciones en piel, uñas, tracto urinario, esófago, boca, vagina y otros tejidos, siendo el hongo más comúnmente aislado en pacientes inmunocomprometidos<sup>14</sup>. El recién nacido es colonizado por esta levadura durante las primeras semanas de vida.

El desequilibrio ecológico y la inmunodeficiencia, que llevan al organismo a una baja de defensas locales o generales, propician el oportunismo y el desarrollo de la infección. Los factores de oportunismo son de varios tipos :

1. Físicos : Traumatismos, radiaciones y humedad.
2. Químicos: pH cutáneo mucoso, medicamentos, drogadicción y contaminación ambiental.
3. Biológicos: Prematurez, embarazo, infancia, diabetes, linfomas, obesidad, insuficiencia renal, infecciones crónicas, síndromes de inmunodeficiencia y alimentación parenteral<sup>11</sup>.

Dentro de las causas de oportunismo mencionadas, la iatrogenia ocupa un lugar predominante y en ocasiones es provocada por el médico<sup>13</sup>.

Un estudio realizado en Estados Unidos por Beck-Sagué y cols<sup>7</sup>, durante el periodo de 1980-1990, reportaron un total de 30477 infecciones fúngicas nosocomiales, de las cuales 59.7% fueron debidas a *C. albicans*. Por otra parte Vázquez y cols<sup>31</sup> citan a *Candida spp* como el cuarto

organismo más comúnmente recuperado en cultivos de sangre provenientes de pacientes hospitalizados, con una mortalidad de fungemia por *C. albicans* de aproximadamente 80-85%.

En México, el Instituto Mexicano del Seguro Social, reporta en su Atlas epidemiológico (de 1985-1990), un total de 205 egresos por micosis en hospitales de zona en 1990 y 11050 consultas totales por micosis, en niños menores de un año de edad<sup>22</sup>.

### 3.3 SEROTIPOS.

El serotipo es un concepto que define las características de superficie de cualquier tipo celular; para *C. albicans* se han reportado los serotipos A, B y C.

El descubrimiento de los serotipos A y B por Hansclevver y Mitchell<sup>20</sup> y del C por Nishikawa y col.<sup>36</sup> en especies de *C. albicans* ha permitido realizar estudios epidemiológicos que indican una estrecha relación entre el serotipo de esta levadura y su susceptibilidad a 5-fluorocitosina (5-FC). En general las cepas de serotipo A son sensibles a 5-FC y las cepas serotipo B son resistentes<sup>3, 36</sup>. Hansclevver and Mitchell (en un estudio realizado con 653 cepas en Estados Unidos durante 1962) encontraron una prevalencia del 67.7 % para el serotipo A y del 32.7% para el B, siendo esto similar a lo descrito en Europa<sup>27, 11</sup>. De igual forma Auger y cols en un estudio realizado con 666 cepas en Canadá<sup>3</sup>, encontraron una prevalencia mayor del serotipo A (74.3%) que del serotipo B (25.7%). Por otro lado en dos estudios realizados en Europa, se encontró una prevalencia mayor de cepas de *C. albicans* serotipo B en pacientes inmunocomprometidos<sup>18, 27</sup>; lo cual indica que la frecuencia de serotipos ha cambiado. Sin embargo en México no se tienen datos claros acerca del serotipo predominante.

### 3.4 TRATAMIENTO.

La selección del fármaco apropiado o la utilización de una combinación, depende de la localización y amplitud de la infección. Los fármacos contra *C. albicans* de uso general son nistatina, clotrimazol, violeta de genciana, anfotericina, anfotericina B, fluorocitosina, miconazol y ketoconazol.

Para la candidosis orofaríngea se ha empleado nistatina oral (que es un antimicótico derivado de *Streptomyces noursei*), clotrimazol y óvulos de nistatina. La violeta de genciana es moderadamente eficaz, empero irrita y ulcera la mucosa con el uso prolongado<sup>1</sup>. El ketoconazol por vía oral en dosis por dos semanas causa regresión de las lesiones en aproximadamente 75 % de los enfermos. Los casos graves de candidosis de la boca, en especial en pacientes granulocitopénicos, usan tratamientos breves con anfotericina B, es un antimicótico derivado de *Streptomyces nodosus* que posee toxicidad renal elevada y produce fiebre, escalofríos, temblores y vómitos. Sin embargo, cuando se usa correctamente es uno de los mejores agentes antimicóticos conocidos.

La candidosis vaginal se trata con óvulos de clotrimazol ó nistatina. Es posible tratar la candidosis del esófago, estómago o intestino de la misma manera que la candidosis oral, pero no con violeta de genciana. Pacientes con casos leves pueden responder a nistatina, fármaco que no se absorbe por el intestino<sup>1, 13</sup>, de tal forma que las grageas orales sólo son útiles para tratar proliferación de *Candida* en el intestino. En casos moderadamente graves se administra anfotericina B por vía intravenosa; una alternativa a la anfotericina B es el ketoconazol oral o miconazol intravenoso que son menos tóxicos que la anfotericina B.

En individuos con candidosis renal y en quienes se sospecha infección diseminada, la administración intravenosa de anfotericina B con fluorocitosina por 4 semanas (si la cepa es susceptible) es el tratamiento más eficaz<sup>14</sup>. La 5-fluorocitosina es una pirimidina con potente actividad citotóxica<sup>14</sup>, se emplea por vía oral y se aconseja combinarla con anfotericina B en caso de formas profundas de infección.

Los compuestos imidazólicos recientemente introducidos en el tratamiento de las micosis son muy útiles. Existen en forma tópica los siguientes compuestos: nitrato de miconazol, nitrato de isocomazol, clotrimazol, nitrato de econazol, nitrato de oxícomazol, bifonazol, y ticonazol. En resumen por vía general se utilizan el nitrato de miconazol, el ketoconazol y el itraconazol. Todos son activos contra *Candida*, aunque habrá que recordar que cuando se asocian a la anfotericina B, algunas cepas de *C. albicans* se vuelven resistentes<sup>13,1</sup>.

### 3.5 DIAGNOSTICO.

**3.5.1 Morfológico.** El diagnóstico de *Candida* puede efectuarse por medio del examen en fresco; el cultivo y la biopsia.

El examen directo de escamas, uñas, pus, orina, material de punción, líquido cefalorraquídeo y expectoración se hace con la prueba de KOH al 10%<sup>13, 14</sup> ó 20%, el cual ofrecerá una evidencia presuntiva del hongo<sup>43</sup>. También se pueden hacer frotis y teñirlos con GRAM; en donde se observarán levaduras ovoides en gemación de casi 2 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro, pseudohifas o ambas. Las biopsias se tiñen con GRAM, PAS (ácido peryódico de Schiff) o Gomori

Grocott y en ellas se identificarán las estructuras levaduriformes y los filamentos miceliares al introducirse el colorante en el tejido.

El cultivo del material biológico se realiza en SDA al 4% de glucosa (Agar de dextrosa Sabouraud) y solo cuando se considera que los especímenes están contaminados con bacterias se les adiciona normalmente cloramfenicol y ciclohexamida, la cual impide el crecimiento de hongos saprófitos; en el cultivo se observarán colonias de color cremoso, de forma redonda, claramente demarcada, lisas y brillantes ya sea a 37 °C o a temperatura ambiente. En 24-48 hrs, los cultivos desarrollan las colonias levaduriformes blancas y opacas. Para el desarrollo de filamentos y producción de clamidosporas que caracterizan a *C. albicans*<sup>3</sup>, se debe esperar 1 semana. También se pueden cultivar en agar Czapek Dox con 1% de Tween, donde se observarán clamidosporas terminales laterales características de 10 a 12 µm de diámetro con paredes lisas de doble contorno. La presencia de levaduras o el desarrollo de colonias levaduriformes, no es un diagnóstico definitivo de candidosis y por lo tanto éste se debe apoyar con datos clínicos. Uno de los métodos más simples, económicos, disponibles y de elección en el laboratorio para la identificación presuntiva de *C. albicans* es la formación de tubo germinativo<sup>13, 14, 17, 23, 48</sup>, el cual facilita la diferenciación con respecto a otras especies de *Candida*.

**3.5.2 Serológico.** Los anticuerpos se han utilizado ampliamente como herramientas inmunológicas y recientemente se han implementado técnicas de biología molecular y bioquímica. En general a los anticuerpos contra *C. albicans* se les ha dado 3 aplicaciones principalmente: 1) Para la detección de proteínas antigénicas usando anticuerpos policlonales o monoclonales en Western blots o en inmunotinción de antígenos específicos a nivel celular. 2) Para la medición de

títulos de anticuerpos específicos en contra de proteínas específicas de *C. albicans*, determinando así sus valores como marcadores en la infección o para bloquear antígenos funcionando así como agentes protectivos. 3) Para el aislamiento de secuencias que codifican para proteínas antigénicas y el análisis densitométrico de las proteínas relevantes, proporcionando una idea de la expresión de las levaduras<sup>50</sup>.

El desarrollo de la inmunidad humoral no parece tener una importancia capital en la evolución de la candidosis<sup>11, 14</sup>. No obstante, las técnicas de inmunodifusión, de fijación del complemento y de anticuerpos fluorescentes, son útiles en el diagnóstico de la candidosis cutaneomucosa crónica, del granuloma candidósico y de la candidosis generalizada o septicémica, ya que siempre éstas reacciones son positivas. Sin embargo, en pacientes muy debilitados portadores de linfomas malignos y leucemias (las cuales se han tratado con inmunosupresores y glucocorticoides), las técnicas serológicas se vuelven negativas a pesar de existir infección por *Candida*<sup>11</sup>; al igual que en los individuos sanos colonizados por *Candida* y en los pacientes con formas superficiales de candidosis. Una desventaja más, es la dificultad en la interpretación de las pruebas (inmunodifusión, contrainmuno-electroforesis, aglutinación en látex) debido a que las precipitinas se encuentran en el 20-30% de la población, en tal caso la correlación clínica a nivel profundo puede ser de utilidad<sup>17</sup>.

### 3.5.3 Celular.

La intradermoreacción con candidina es positiva en casi el 100% de los individuos sanos y en los pacientes con candidosis, excepto en los que desarrollan las formas granulomatosa o

cutaneomucosa crónica e infección generalizada; donde esta anergia es un pronóstico severo de la infección<sup>14</sup>.

#### 3.5.4 Bioquímico.

El diagnóstico final para la identificación de levaduras es la prueba de asimilación de carbohidratos<sup>14</sup>, la cual mide la habilidad de la levadura para utilizar un carbohidrato específico como única fuente de carbono en presencia de oxígeno. De modo que los aislados que asimilan y no fermentan sacarosa, son confirmados como *C. albicans*, el perfil de asimilación y fermentación para especies de levaduras se resume en la tabla No. 1

Debido a los largos periodos de incubación y otras desventajas, se utilizan más frecuentemente sistemas de identificación como el "API 20C", éste sistema es similar al API 20E usado para la identificación de enterobacterias<sup>5,17</sup>.

#### 3.6 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE *C. albicans*.

En la candidosis mucocutánea crónica ya se han establecido con claridad defectos en la inmunidad mediada por células; en estos casos, la anomalía más constante corresponde a la producción subnormal de linfocinas por células T, en respuesta a los antígenos de *C. albicans*<sup>13</sup>.

Los estudios de la respuesta del huésped competente a especies de *Candida* indican que todos los componentes del sistema inmunitario responden al patógeno; así los sitios receptores en células epiteliales de boca y vagina permiten la adherencia de la levadura. La lisozima (muramidasa) causa aglutinación y destrucción de *C. albicans*. En individuos inmunocompetentes

se generan anticuerpos IgA secretores y humorales y anticuerpos IgE específicos en contra de *C. albicans*. La mayoría de los adultos normales presentan anticuerpos IgG circulantes contra los antígenos de *C. albicans*, aunque en la infección hay respuesta transitoria de anticuerpos IgM<sup>11</sup>. Los anticuerpos IgG logran opsonización eficaz de *C. albicans*. El microorganismo además puede activar la vía alterna del complemento. Los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y eosinófilos ingeren y destruyen a *C. albicans*. Un componente polisacárido de *Candida* puede ocasionar la formación de linfocitos supresores, mientras que los antígenos estimulados por un mitógeno producen una linfocina que destruye al microorganismo<sup>46</sup>.

### 3.7 ANTÍGENOS PRINCIPALES.

La pared celular de *C. albicans* esta constituida de:

- 1) Carbohidratos:  $\beta$ -glucanos. 90% (peso/peso)
- 2) Proteína: manoproteínas. 3-6% (peso/peso)
- 3) Lípidos: Quitina. 2% (peso/peso).

Éstas son moléculas inmunogénicas importantes ya que la pared celular constituye aproximadamente el 30 % del peso seco de la célula. La distribución de estos polímeros es similar en células de levaduras, tubo germinativo y elementos miceliares. En resumen, la pared celular de *C. albicans* es de gran importancia, ya que esta involucrada en la adhesión, colonización, contenido de componentes mitogénicos importantes y finalmente por su capacidad para regular productos secretados de la célula. Los  $\beta$ -glucanos y la quitina de la pared, los cuales no están presentes en células de mamíferos, pueden ser junto con las enzimas involucradas con su síntesis y

degradación, blancos potenciales para nuevos agentes antifúngicos. La quitina en la pared celular de *C. albicans* es la primera que se localiza y esta covalentemente unida a los glucanos guiando el desarrollo de una estructura de pared celular secundaria<sup>40</sup>.

**TABLA No. 1: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y DE CULTIVO DE CEPAS DE**

***Candida albicans***

<b>PRUEBAS FENOTÍPICAS</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Crecimiento a 37°C</b>	+
<b>Pseudohifas</b>	+
<b>Clamidiosporas</b>	+
<b>Tubo germinativo</b>	+
<b>Cápsula</b>	-
<b>Dextrosa</b>	+
<b>Maltosa</b>	+
<b>Sacarosa</b>	+*
<b>Lactosa</b>	-
<b>Galactosa</b>	+
<b>Melibiosa</b>	-
<b>Celobiosa</b>	-
<b>Inositol</b>	-
<b>Xilosa</b>	+
<b>Rafinosa</b>	-
<b>Trealosa</b>	+
<b>Dulcitol</b>	-
<b>FERMENTACIÓN (prod. gas)</b>	
<b>Dextrosa</b>	F
<b>Maltosa</b>	F
<b>Sacarosa</b>	-
<b>Lactosa</b>	-
<b>Galactosa</b>	F
<b>Trealosa</b>	F
<b>Ureasa</b>	-

\*= Varía según la cepa.  
 += Asimilación del azúcar  
 F= Fermentación del azúcar

La fracción manoproteína es el principal componente celular antigénico de *C. albicans* y tres serotipos pueden ser distinguidos por serología basados en diferencias en estructuras manoproteicas<sup>40, 41</sup>. Las estructuras de manoproteínas de *C. albicans* son similares a las de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos con polisacáridos altamente ramificados, unidos a residuos de asparagina de la proteína a través de dímeros de N-acetil- D-glucosamina (GlcNAc), y de pequeñas cadenas similares de residuos de manosa unidos a través de serina y treonina. Las manoproteínas contienen grupos fosfatos los cuales son importantes en la determinación de antigenicidad. La superficie celular de *C. albicans* también contiene receptores para el fragmento C3, iC3b; por unión no covalente de iC3b, la patogenicidad de *C. albicans* se incrementa, porque la fagocitosis de leucocitos humanos polimorfonucleares es disminuida<sup>40</sup>. Recientemente, Bouchara et al<sup>9</sup> demostraron la presencia de receptores de tubo germinativo específico para laminina, los cuales pueden mediar la adherencia de los receptores y así contribuir al establecimiento de candidosis.

## 4. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE *C. albicans*.

### 4.1 TÉCNICAS BÁSICAS.

#### 4.1.1 Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son endo-desoxirribonucleasas que digieren cadenas dobles de DNA después del reconocimiento de la secuencia de nucleótidos específicos por rompimiento de dos enlaces fosfodiéster, uno dentro de cada cadena dúplex de DNA<sup>44, 26</sup>. Las enzimas de restricción forman parte del sistema de restricción-modificación de células bacterianas, y tienen como función protegerlas contra la invasión de DNA exógeno.

La purificación y caracterización de endonucleasas de restricción que cortan el DNA en fragmentos discretos, se ha utilizado con los procedimientos básicos de Biología molecular. El corte se da simplemente por incubación de la enzima con el DNA en condiciones óptimas; la reacción depende de la cantidad de enzima, DNA presente, amortiguador, concentración iónica, temperatura y duración de la reacción.

La eficiencia de las endonucleasas de restricción depende de la pureza del DNA: se puede inhibir su actividad por contaminantes encontrados en algunas preparaciones de DNA, tales como proteína, fenol, cloroformo, EDTA, SDS y altas concentraciones de sales entre otros. La eficiencia de la reacción se puede incrementar aumentando el número de unidades de enzima en la mezcla de reacción; por dilución de esta, o por incremento del tiempo de incubación. Algunas enzimas de restricción se inhiben por metilación de nucleótidos dentro de sus secuencias de reconocimiento.

Para realizar los ensayos de restricción se utilizarán dos endonucleasas de restricción denominadas Eco RI y Xba I (Boehringer Mannheim Biochemica Alemania).

Eco RI se aísla de *Escherichia coli* y su secuencia de reconocimiento para corte de DNA es la siguiente:

$$5\text{'-G}\downarrow\text{AATTC-3'}$$
$$3\text{'-CTTAA}\downarrow\text{G-5'}$$

Xba I se aísla de *Xanthomonas badrii* y su secuencia de reconocimiento para corte de DNA es la siguiente:

$$5\text{'-T}\downarrow\text{CTAGA-3'}$$
$$3\text{'-AGATC}\downarrow\text{T-5'}$$

#### 4.1.2 Electroforesis del DNA

Para verificar la pureza e integridad del DNA cromosomal, el material obtenido se somete a electroforesis en geles de agarosa al 1%. La agarosa gelificada forma una matriz de exclusión molecular determinada por la concentración de ésta. Cuando se aplica un campo electroforético a través del gel, el DNA que tiene carga negativa a pH neutro, migra hacia el ánodo y su velocidad de migración esta determinada por un gran número de factores, entre los que se encuentran: tamaño molecular y conformación del DNA, concentración de agarosa, voltage, dirección del campo eléctrico, temperatura, presencia del bromuro de etidio y composición del amortiguador<sup>44</sup>.

#### 4.1.3 Tinción de geles de agarosa con bromuro de etidio.

El método más usado para visualizar el DNA en geles de agarosa es la tinción con el colorante fluorescente bromuro de etidio. Este colorante posee un grupo planar que se intercala entre las bases del DNA resultando un incremento en la fluorescencia del colorante, comparado con el colorante libre.

El DNA absorbe la radiación ultravioleta a 254 nm y la transmite al colorante. El colorante unido al DNA absorbe la radiación a 302 nm y 366 nm. En ambos casos la energía es remitida a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. El bromuro de etidio se puede utilizar para detectar cadenas simples y dobles de ácidos nucleicos, sin embargo, la afinidad del colorante por la cadena simple es relativamente más baja.

El bromuro de etidio se prepara como una solución stock de 10 mg/ml en agua, que se almacena a temperatura ambiente y se protege de la luz. Este colorante, debe ser manejado estrictamente con guantes, ya que es un agente mutagénico además de ser moderadamente tóxico<sup>44</sup>.

## 4.2 BIOLOGÍA MOLECULAR.

La aplicación de métodos de biología molecular para la identificación de cepas ha hecho posible distinguir aislados con gran precisión, en comparación con métodos formalmente disponibles y con esto se ha facilitado la realización de una variedad de nuevos estudios<sup>45</sup>, que se basan en diferencias en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de DNA genómico cortados con enzimas de restricción.

Varios estudios han empleado polimorfismo en sitios de restricción de DNA ribosomal para la identificación de cepas<sup>2, 21, 30, 38, 40-48</sup>. El polimorfismo se detecta por examinación de geles teñidos con bromuro de etidio en los cuales se demuestra la presencia de bandas distintivas de secuencias repetidas<sup>40</sup>. Otro enfoque son los patrones de digestión con enzimas de restricción de DNA mitocondrial para diferenciar cepas de *Candida* o sondas, como el gene de actina, el cual se ha utilizado como sonda de hibridización para distinguir especies de importancia médica de *Candida*<sup>32</sup>. Así también, se han clonado secuencias moderadamente repetitivas de *C. albicans* y se usaron como sondas de hibridización en estudios de identificación de cepas; tales secuencias han permitido identificar con alta resolución cepas muy relacionadas y con esto se ha demostrado la coexistencia de múltiples cepas de *C. albicans* en un mismo individuo infectado<sup>47</sup>.

Debido a la importancia clínica de esta levadura, se han desarrollado un gran número de métodos para la identificación y tipificación de cepas de *C. albicans*, entre las que se encuentran: serotipificación, morfología, biotipificación y resistotipificación<sup>31</sup>. Sin embargo, Lee y col<sup>26</sup>, han reportado que no existe un método único capaz de proporcionar datos confiables.

En general, los métodos fenotípicos empleados en la identificación de *C. albicans* presentan diferentes problemas tales como: dificultad en la ejecución, estandarización, variabilidad de corrida a corrida, cambios de patrones con el almacenamiento y reproducibilidad<sup>27, 36, 38</sup>.

Recientemente han surgido dos métodos para la identificación genética de cepas individuales. El primero es el método de RFLP de DNA (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de DNA) que fue descrito por primera vez en 1985<sup>31</sup> (Jeffreys et al.). El ensayo de RFLP consiste únicamente en la fragmentación del DNA genómico con enzimas de restricción y su análisis electroforético, el cual en algunos casos donde existe una sonda específica

se puede mejorar usando un ensayo de Southern blot<sup>41</sup>. El método se basa en la utilización de sondas de hibridación para detectar secuencias repetitivas hipervariables (minisatélites y microsátélites de DNA).

El otro método usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un *primer* único (iniciador) relativamente pequeño con una secuencia nucleotídica arbitraria, el cual se utiliza para amplificar DNA polimórfico al azar; este método se ha descrito como "amplificación de DNA polimórfico al azar por PCR" (RAPD-PCR) (Williams et al., 1990), PCR con *primers* arbitrarios (AP-PCR) (Welsh and McClelland, 1990), ó amplificación de fingerprinting de DNA (DAF) (Cactano-Anollés et al., 1990). El ensayo de RAPD usa típicamente una combinación de iniciadores, de 10-20 nucleótidos de longitud, para amplificar una secuencia de DNA blanco mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>49</sup>.

Debido a que cada uno de estos métodos prueban digestiones de DNA genómico para secuencias repetitivas, usan *primers* únicos para amplificar arbitrariamente fragmentos de DNA y son capaces de detectar variaciones entre individuos; se ha sugerido que una combinación de ambos métodos puede producir un método rápido y más sensible para identificar cepas que son también aplicables para experimentos a gran escala.

#### 4.3 REGIONES GENÉTICAS RELEVANTES EN *C. albicans*.

Lott y col<sup>40</sup>, clonaron y secuenciaron el gene aspartil proteinasa, de *C. albicans* y reportaron que a pesar del alto nivel de homología en la secuencia del gene aspartil proteínasa de *C. albicans* y *S. cerevisiae*, las dos secuencias difieren en la región que contiene el amino terminal. La enzima de *S. cerevisiae* es una proteína vacuolar; esta diferencia sugiere que la clonación del

gene de *Candida* podría codificar una proteína secretada. Los progresos en estos experimentos están enfocados a determinar si el producto de la clonación del gene es secretado y si su secreción contribuye a la virulencia<sup>40</sup>.

La contribución del crecimiento dimórfico para virulencia se ha investigado en estudios de mutantes, los cuales pueden crecer solo como forma de levadura o en forma filamentosa. Los estudios de biología molecular en esta área están enfocados principalmente en la expresión diferencial de genes en los dos estados morfológicos. Estudios de electroforesis de geles en segunda dimensión de extractos de proteínas de células de levaduras y formas filamentosas han demostrado diferencias en los niveles de ciertas proteínas.

La expresión diferencial de genes se ha estudiado a nivel de RNA en la cual se clonó el gen de tubulina y lo usaron como sonda para medir los niveles de RNA mensajero en la células de levadura y en los filamentos. Sorprendentemente solo se encontró un gen de actina en *C. albicans*, aunque se puede esperar que tenga dos genes que optimizen la síntesis de estas moléculas en cada tipo celular. Los niveles de un mRNA único de 1.2 kb se incrementa seis veces dentro de las primeras 2 hrs. después de que emerge el tubo germinativo, reduciéndose su síntesis después de este tiempo. Esto presumiblemente refleja el control transcripcional del gene de actina, el cual es inducido tempranamente en la conversión de levadura a forma filamentososa, aumentando así la necesidad del producto de este gene. La contribución precisa del gene de actina y otros genes para dimorfismo requieren investigación adicional<sup>40</sup>.

El descubrimiento de antibióticos ha estimulado el estudio de un gran número de genes cuyos productos son blancos potenciales de agentes antifúngales. Estos genes codifican para  $\beta$ -

tubulina, 14 $\alpha$  lanosterol-dimetilasa, 2-3-oxidosqualene ciclasta, timidilato sintetasa, dihidrofolato sintetasa, dihidrofolato reductasa.

Los carbamatos benzimidazoles son de las primeras clases de fungicidas agrícolas selectivos y actúan por unión a la subunidad beta del dímero de tubulina, produciendo despolimerización de los microtúbulos. Los microtúbulos están compuestos por 2 proteínas de peso molecular aproximado de 55,000 D,  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina; estas proteínas forman subunidades de heterodímeros que se ensamblan dentro de microtúbulos y forman un componente de el citoesqueleto celular y huso mitótico y son importantes para la integridad celular y para la división celular. El gene estructural para la  $\beta$ -tubulina, es el blanco potencial de los benzimidazoles carbamatos, fué clonado de *C. albicans* y su secuencia fué aislada usando el gene de  $\beta$ -tubulina de *S. cerevisiae* como una sonda de hibridación bajo condiciones de alta astringencia. Debido a el alto grado de conservación (82 % de homología) entre los genes de  $\beta$ -tubulina *C. albicans* y *S. cerevisiae* cuyos productos difieren solo por 80 aminoácidos, es sorprendente que *C. albicans* sea altamente resistente a benomil, un fungicida selectivo perteneciente a los carbamatos benzimidazoles. La resistencia probablemente se deba a otros factores en la beta tubulina tales como permeabilidad, inactivación de los fungicidas, y diferencias en proteínas asociadas con microtúbulos. El gene de la  $\beta$ -tubulina de *Candida* se expresó en *S. cerevisiae* y fué capaz de complementar una disrupción en el gene de la  $\beta$ -tubulina; las cepas que expresaron el gene de la  $\beta$ -tubulina no fueron más resistentes al benomil, sino de hecho, mostró un incremento en la sensibilidad. Un gene que codifica para resistencia a benomil se ha clonado de *C. albicans* el cual no tuvo una secuencia homóloga detectable, con  $\beta$ -tubulina, sugiriendo que el producto de este

gene produce resistencia a benomil por otro agente que afecta el mecanismo de unión de los microtúbulos.

Lanosterol 14  $\alpha$ -demetilasa (LDM) es el blanco de la clase más grande de fungicidas empleados en medicina y agricultura, los cuales incluyen los imidazoles, los triazoles, y las pirimidina. LDM es una enzima en la vía biosintética del esterol y cataliza la reacción común para la síntesis de ergosterol en hongos y colesterol en mamíferos; también es un citocromo P450, una de las grandes familias de proteínas que tienen una distribución taxonómicamente amplia que catalizan una variedad de reacciones. El gene de LDM de *C. albicans* se clonó a través del uso del mismo gene pero de *S. cerevisiae* como una sonda de hibridación bajo condiciones específicas. Las clonas se emplearon para sobreexpresarlo en *C. albicans* y *S. cerevisiae*. El aumento de éste gene decreció la sensibilidad en ambas especies a un número de inhibidores de LDM, los resultados confirman el mecanismo de acción propuesto para imidazoles y triazoles. En resumen, la delección del gene LDM en *S. cerevisiae* resultó en la letalidad del hongo, demostrando que la función del gene LDM es esencial para la viabilidad.

En cuanto a 2,3-Oxidocualeno ciclasa, esta enzima cataliza la reacción que ocurre en la vía biosintética del esterol previa a la reacción que cataliza LDM. Cattel (1996) examinaron la acción de una variedad de inhibidores en 2,3 oxidocualeno ciclasa de células de plantas, hongos y animales, observaron diferencias y sugirieron que esta enzima puede ser blanco potencial para el desarrollo de fungicidas. El gene 2,3-oxidocualeno ciclasa de *C. albicans* se clonó por complementación en una mutante deficiente en este gen en *S. cerevisiae*<sup>40</sup>. El gene se expresó adecuadamente en *S. cerevisiae*, usando una sola copia de la secuencia de *Candida*, se logró el crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* mutante en ausencia de colesterol.

La timidilato sintetasa se ha estudiado como un blanco potencial para terapias anticandidales. El razonamiento de que la enzima puede ser un buen blanco radica en que.

1. El producto de la enzima dMPT, puede ser sintetizada únicamente en *C. albicans*, ya que la levadura carece de timidina kinasa.
2. La levadura no incorpora timina, timidina y dTMP de el ambiente.
3. La 5 Fluorocitosina es bien conocida como agente anticandidal, actúa en la vía celular convirtiéndose a 5 fluoro-dUMP, que es un inhibidor de timidilato sintetasa.

Además se sabe que puede diferenciar varios grupos a nivel filogenético (especialmente en protozoa) y como un resultado, ha sido extensamente estudiado como un blanco potencial en terapéutica.

La hidrofolato reductasa es blanco de un número importante de agentes terapéuticos incluyendo el trimetoprim, pirenmetamina y metrotexate. Las diferencias en la enzima producidas por el patógeno y la producida por el huésped hace posible el tratamiento de enfermedades infecciosas con inhibidores de enzimas específicas; la existencia de tales agentes terapéuticos apoya la idea que la hidrofolato reductasa puede servir como un blanco para agentes antifungales.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se estudiaron 41 cepas de *Candida albicans* las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Humberto Díaz Ponce, de la Unidad de Infectología del Hospital de Pediatría (Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS); previamente identificadas, serotipificadas y resistotipificadas (detección de resistencia a 4 antimicóticos)<sup>19</sup>. Las características de las cepas y los datos relevantes de los pacientes de donde se obtuvieron los aislados se presentan en las Tablas 3, 4 y 5 en la sección de resultados.

### 5.2 OBTENCIÓN DE *C. albicans* A PARTIR DE SU CULTIVO.

Una vez identificadas las levaduras como *C. albicans*, se prosiguió a propagar los aislados para la extracción del DNA. Cada aislado fue sembrado por dilución en una placa de agar de dextrosa Sabouraud y se incubó a 37°C durante 48 hrs. Se tomó una colonia aislada y se sembró en tubos de polipropileno que contenían 5ml de caldo de Dextrosa Sabourud (Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.), incubándolas a 37 °C durante 24 hrs con agitación constante de 200 rpm. Finalmente, el cultivo celular se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min en una centrifuga clínica (E. I. Du Pont de Nemours Find Co. Inc; Newtown, Conn.). El cultivo fue lavado con 5 ml de sorbitol 1M (Sigma, Chemical Co; St. Louis, MO, USA) agitando vigorosamente y centrifugando bajo las mismas condiciones. El número de levaduras por ml se cuantificó espectrofotométricamente y se utilizaron pastillas de  $2 \times 10^8$  células. Esto se realizó

tomando en cuenta que 1 unidad de densidad óptica a 600 nm es equivalente a  $3 \times 10^7$  células por ml<sup>41</sup>. El cultivo se usó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta iniciar la extracción de DNA.

### 5.3 PREPARACIÓN DE ESFEROPLASTOS

A las pastillas celulares se les adicionó 0.5 ml de sorbitol 1 M y se agitaron vigorosamente hasta resuspender completamente las levaduras. Posteriormente los esferoplastos se prepararon adicionando 50 µl de β-mercapto etanol 0.28 M y la suspensión se homogeneizó vigorosamente durante 10 segundos. A continuación se adicionaron 15 µl de una solución de liticasa 1mg/ml (Sigma, Chemical Co; St Louis, MO, USA) y la suspensión celular se resuspendió suavemente durante 5 segundos. La mezcla se incubó entonces a 37°C durante 1 hr. con agitación constante (200 rpm), posteriormente la muestra se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas. Una vez obtenidos los esferoplastos, estos fueron resuspendidos en 500 µl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl y 1mM de EDTA, pH 8), la suspensión fué posteriormente transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

### 5.4 EXTRACCIÓN DE DNA de C. albicans.

Para realizar la lisis celular de los esferoplastos, se mezclaron por inversión con 50 µl de SDS al 10% (Gibco BRL, Life Technologies Inc; Gaithersburg, MD, USA) y se incubaron durante 20 minutos a 65°C. Para asegurar la lisis completa, el tubo se mezcló por inversión a diferentes tiempos hasta que la solución se observó viscosa. La muestra se centrifugó a 14000 rpm/5 minutos a t° ambiente y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para precipitar los

ácidos nucleicos. Debido a que las bajas temperaturas favorecen la precipitación, (Merk-México, S.A.; México D.F.), se adicionó gota a gota etanol absoluto frío y la solución se incubó durante 15 mins. a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente la solución se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante se desechó.

Para eliminar sales que hayan precipitado junto con el DNA, se realizaron dos lavados por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min con 500 $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, el cual se adicionó por las paredes del tubo teniendo cuidado de no resuspender la pastilla de ácidos nucleicos. Para eliminar el exceso de etanol de los ácidos nucleicos y dejar la pastilla seca, se utilizó un concentrador al vacío para tubos eppendorf "Automatic speed vac" (AS160, Savant, Farmingdale, NY). La pastilla de DNA se resuspendió en 300 $\mu\text{l}$  de amortiguador TE y se dejó reposar durante 15 mins. Para facilitar la resuspensión del DNA se calentó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 mins. y una vez disuelto, se homogeneizó con una micropipeta con la punta cortada. El RNA de la muestra se eliminó adicionando 50 $\mu\text{l}$  de RNAsa "A" a una concentración de 1mg/ml (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania), resuspendiendo la solución suavemente e incubando la muestra a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Finalmente los ácidos nucleicos se precipitaron bajo las mismas condiciones adicionando 500 $\mu\text{l}$  de isopropanol (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA). Una vez precipitado el DNA se centrifugó 10 mins. a 14,000 rpm para eliminar el isopropanol y nuevamente se lavó con etanol al 70% como se mencionó anteriormente. Finalmente el DNA se resuspendió en 125  $\mu\text{l}$  de amortiguador TE y se cuantificó de acuerdo al protocolo descrito a continuación.

### 5.5 CUANTIFICACION DE DNA de C. albicans.

La lectura de densidad óptica a 260 nm permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. El ratio entre las lecturas a 260 y 280 nm da una estimación de la pureza del DNA. Se consideraron preparaciones adecuadas aquellas que presentaron un ratio entre 1.7 y 1.9. Así, para cuantificar el DNA obtenido, se tomaron 5µl de cada muestra y se realizó una dilución 1:200 con amortiguador TE, tomando la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro con sistema de luz UV (7800, Singapore, Jasco Co, Japón). Para realizar el cálculo de la concentración de DNA se tomó en cuenta lo siguiente:

1 UDO 260 nm = 50µg/ml DNA doble cadena

1 UDO 280 nm = 40µg/ml DNA cadena única

$$r = 260/280 = 1.8$$

$$\text{DNA} = (50\mu\text{g/ml}) \times (\text{UDO } 260 \text{ nm}) \times (\text{Vf en ml}) / 5\mu\text{l}$$

$$\text{DNA} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Una vez cuantificadas las muestras de DNA, se almacenaron a -20°C debidamente etiquetadas hasta su uso.

### 5.6 ELECTROFORESIS DEL DNA de C. albicans.

Para fraccionar el DNA, se emplearon 20µg de DNA de cada aislado de C. albicans, los cuales se mezclaron con el buffer de muestra 1X (el stock 6X contenía 0.25% xileno-cianol FF0).

0.25% azul de bromofenol, 30% de glicerol en agua) para incrementar la densidad del DNA y garantizar que la muestra no difundiera, dando además coloración azul a la muestra para su monitoreo durante la corrida electroforética. Este colorante indica la distancia recorrida por el frente de la muestra.

Para la preparación de los geles, se pesó la cantidad de agarosa necesaria para tener una concentración final de la agarosa del 1%; se solubilizó en un volumen de agua menor al volumen final, ya que habría que considerarse el volumen del amortiguador TAE (242g Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5M pH= 8m, cbp 1000 ml) el cual fué adicionado cuando la agarosa alcanzara una T de  $\approx 56^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se preparó la cámara de electroforesis, se niveló el contenedor del gel en una plataforma de grafito; la agarosa se vació en la cámara de electroforesis y previamente a la gelificación de la agarosa se colocó el peine para formar los pozos que contendrían las muestras. El gel se cubrió con amortiguador de corrida a lo largo del peine para retirarlo con facilidad y el reservorio de la cámara se llenó con amortiguador pero sin cubrir el gel. Antes de cargar la muestra se llenaron los pozos con buffer TAE para evitar que la muestra al ser cargada, se pegara en las paredes del pozo. Las muestras así como los marcadores de peso molecular se depositaron con la ayuda de una micropipeta (pipetman p 10, Gilson, Francia). La cámara de electroforesis (Horizon 11.14, Gibco BRL Life Technologies Inc, Gaithersburg, Md, USA) se conectó a una fuente de poder (250, Gibco BRL Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD, USA) considerando la ubicación de los electrodos en base a que el DNA tiene carga negativa y por lo tanto corre hacia el ánodo. Una vez que las muestras salieron de los pozos, se apagó la fuente de poder y se adicionó

más amortiguador TAE 1X hasta cubrir el gel, se continuó la corrida electroforética hasta que el amortiguador de corrida alcanzó una distancia cercana al borde del gel.

### 5.7 TINCIÓN DE GELES DE AGAROSA CON BROMURO DE ETIDIO.

La tinción se realizó introduciendo el gel en un recipiente con solución de bromuro de etidio (Gibco BRL Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA) 5µg/ml, se mantiene el gel en agitación constante durante cinco minutos; el exceso de colorante se elimina al enjuagar el gel en agua destilada y agitación suave durante 3 minutos. Finalmente el gel se observó bajo luz ultravioleta a 260 nm utilizando un transiluminador de luz UV (LKB 2011, Macrovue, Sn. Gabriel California, USA). De acuerdo a lo observado, se podrá discernir entre un DNA puro (el cual se observa como una banda única que varía proporcionalmente con la concentración del DNA), un DNA degradado (en el cual se observa además de la banda cromosomal un barrido) y un DNA con RNA (el cual presentará un barrido al final del gel que corresponderá al RNA).

Los geles de agarosa con el DNA se fotografían con una cámara tipo MP-4 de Polaroid (Sigma St. Louis Mo., USA) con filtro naranja para bloquear la intensidad de la luz UV. En este caso se usaron películas instantáneas polaroid 55 P/N 4X5 (Polaroid Co, St. Louis, Mo, USA) para las cuales se recomiendan 22 segundos tanto de exposición como de revelado.

### 5.8 DIGESTIÓN DEL DNA *C. albicans* CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Para realizar los ensayos de restricción se tomaron 50µg de DNA de *C. albicans* y 100U de enzima. Para Eco RI se usó el siguiente amortiguador: 10 mmol/l Tris H-Cl, 200 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0.5 mmol/l ditioneol, 0.2% Tritón X-100, 50% glicerol pH 7 a 4°C. Para Xba

I: 20 mmol/l Tris H-Cl, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l 2-mercaptoetanol, 0.01% Tritón X-100, glicerol 50%, pH 7.5 a 4°C. El volumen final de la reacción fué de 500µl, la concentración final de DNA fué de 0.1 µg/µl. Para cada ensayo se utilizó un control positivo, el cual se trabajó en condiciones similares, con la única diferencia de que el DNA control contenía 1µg de DNA del bacteriofago lambda. Como control negativo, se utilizó 1µg de DNA de *C. albicans* que no fué tratado con enzima de restricción. Todas las reacciones se incubaron a 37°C durante 24 hrs, para detener la reacción se adicionó amortiguador de muestra en una concentración final 1X y el material obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa.

### 5.9 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE DNA POLIMORFICO (RAPD-PCR)

Para realizar los ensayos de RAPD, se utilizaron los siguientes iniciadores:

#### Gen 1-50

1:GTGCAATGAG

2:CAATGCGTCT

#### Gen 3

9:CGTCTAGAGC

Los cuales fueron sintetizados por Genosys Biotechnologies, (Inc., Woodlands, Texas., USA).

La reacción de PCR se realizó en una mezcla de volumen final de 50µl, que contenía: 1X de buffer PCR (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1 mg/ml BSA), 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 400µM de cada dNTP 1 pmol/µl de cada uno de los iniciadores, 500 ng de DNA de *C. albicans* y 2.5 U de Taq

polimerasa. Cada uno se adicionó en este orden para evitar la desnaturalización de la enzima, la mezcla se realizó en una área exclusiva del laboratorio que carece de corriente de aire y en la que previamente se desinfectaron las mesas de trabajo con una solución de cloro comercial, para evitar contaminación de algún DNA exógeno. Las mezclas finales se realizaron utilizando puntas con filtro. Los ciclos de amplificación fueron regulados de acuerdo a la tabla No. 2.

Los patrones de amplificación obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% de acuerdo al protocolo descrito previamente.

**Tabla No. 2: Ciclos de RAPD para diferentes aislados de *C. albicans*.**

<b>Paso</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización:</b>	95°C/5 minutos
<b>35 ciclos</b>	
Alineamiento:	36°C/2 minutos.
Extensión:	72°C/1:30 segundos
Desnaturalización:	95°C/1:00 minuto
<b>Alineamiento</b>	36°C/2 minutos
<b>Extensión:</b>	72°C/10 minutos 4°C/α

#### **5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Para medir el número de pares de bases de las bandas obtenidas en las diferentes cepas, los negativos se analizaron en el densitómetro (Personal SI "PDSI", Molecular Dynamics Inc, USA), dando como resultado la imagen del negativo en el monitor de una computadora. Esta

imagen que contiene los patrones de bandas de los productos de restricción y amplificación de cada una de las cepas de *C. albicans*, se procesó a través del Software Fragment NT (Molecular Dynamics, Inc, USA), obteniéndose los pesos moleculares de cada una de las bandas usando como referencia los marcadores de peso molecular que se encuentran en los extremos del gel. Posteriormente se realizó una tabla binaria de los resultados de peso molecular expresados en pares de bases y del número de cepa para los 41 aislados de *C. albicans*.

Se empleó un análisis en grupos, utilizando el método de aglomeración jerárquica (Agglomerative Hierarchical Cluster Analysis). Este método se basa en calcular las distancias y similitudes entre cada una de los diferentes cepas de *C. albicans* tomando como criterio de combinación (Variables de aglomeración) su patrón de bandas expresado en pares de bases. En la primera fase del análisis se miden las diferencias entre todas las cepas para encontrar sus coeficientes de distancia, la siguiente consiste en agrupar (cluster) las 2 cepas más "próximas" y en las posteriores fases, las diferentes cepas se agrupan de manera sucesiva dependiendo de su distancia hasta formar un solo grupo que incluye todas las cepas estudiadas. Después se realiza una representación gráfica de éstos resultados en un dendograma, en el cual se toma el rango de los coeficientes de distancia (de similitud) a los cuales se les asigna el número 1 y 25 que corresponden a los coeficientes menor y mayor respectivamente para representar las distancias entre cada grupo. Todo el análisis se realizó en el programa estadístico "SPSS" para Windows versión 6 (SPSS Inc, Michigan, Chicago, Illinois).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *C. albicans* DE ACUERDO A SUS RASGOS CLÍNICOS, SEROTIPO Y SENSIBILIDAD A ANTIMICÓTICOS.

Uno de los aspectos más importantes en el estudio de cualquier microorganismo infeccioso es el conocimiento de la historia clínica del paciente con el fin de retomar algunos datos que puedan influir en la severidad de la infección y con esto facilitar su diagnóstico. Debido a esto, el primer paso en éste estudio consistió en el agrupamiento de las cepas de *C. albicans* de acuerdo a los datos clínicos que presentaba cada uno de los pacientes de donde se aislaron dichas cepas. En la tabla 3 se muestra la clasificación de los 41 aislados de *C. albicans* de acuerdo al sitio de aislamiento en los pacientes pediátricos.

Tabla No. 3: SITIO DE AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Candida albicans*.

CEPAS	AISLAMIENTO	TOTAL
40,63,70,136,ATCC,80,137,62,64,4,45,68	Hemocultivo	12
5,17,18,73,91,37,48,96,61,44	Orina	9
14,67,78,93,15,35	Catéter	6
108,84,85,105,16	Exudado vaginal	5
36,99,47,2,7	Espujo	5
53,1,60,32	Líquido peritoneal	4

Muestras obtenidas en el Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI.

El número de cada cepa en orden progresivo de acuerdo a su procesamiento, aparece en la primera columna, mientras que en la segunda columna, se observa el sitio de donde fueron aisladas las levaduras. El resto de la tabla muestra la frecuencia del sitio de aislamiento; así de 41 cepas procesadas, 12 fueron de hemocultivo, 9 de orina y 6 de catéter; las cepas obtenidas de exudado vaginal y esputo tuvieron la misma frecuencia de aislamiento. Las muestras de líquido peritoneal fueron las que presentaron menor frecuencia de aislamiento.

En la tabla 4 se muestra la frecuencia del diagnóstico de los pacientes en los cuales se aisló *C. albicans*. Se observa que cuando se diagnosticó sepsis, existió un mayor predominio en el número de aislamientos de *C. albicans*.

Tabla No. 4: DIAGNOSTICO CLÍNICO Y AISLADOS DE *Candida albicans*.

CEPAS	DIAGNOSTICO	TOTAL
14, 18, 73, 91, 93, 136, 80, 7, 62, 61, 64, 44, 45, 68	Sepsis	14
40, 63, 67, 70, ATCC, 37, 137, 96, 35	LLA	9
36, 78, 47, 48, 2	Neumonía	5
108, 84, 85, 105, 16	LES	5
99, 15, 4	Candidosis	3
1, 5, 53, 60, 32	Otros	5

Muestras obtenidas en el Hospital de Pediatría del CMN siglo XXI

LLA: Leucemia linfocítica aguda.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

Otros: Se incluyen diarrea, insuficiencia renal crónica y otitis.

En la tabla 5 se muestran los datos obtenidos de la clasificación de las cepas de *C. albicans* así como su serotipo y sensibilidad a anfotericina B, Ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Algunas cepas presentaron resistencia a tres antimicóticos (fluconazol, itraconazol y ketoconazol)

aunque más del 50 % del total de cepas analizadas presentaron sensibilidad a todos los antimicóticos utilizados.

Tabla No. 5:

**CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE *Candida albicans* MEDIANTE SU SEROTIPO Y  
SENSIBILIDAD A DIFERENTES ANTIMICÓTICOS**

Cepa	Serotipo	a	f	i	k
5, 14, 18, 36, 40, 63, 67, 70, 73, 78, 91, 93, 99, 108, 136, ATCC	A	S	S	S	S
15, 37, 47, 48, 53, 80, 84, 85, 137	B	S	S	S	S
1, 2, 7, 35, 60, 62, 96	A	S	S	S	R
61,88	B	S	S	S	R
64, 105	A	S	S	R	R
4	B	S	S	R	R
44, 45	A	S	R	R	R
68	B	S	R	R	R
16	B	S	R	S	R
32	A	S	S	R	S

a: anfotericina B; f: fluconazol; k: ketoconazol; i: itraconazol  
R= Resistente.  
S= Sensible.

El número de las cepas de *C. albicans* analizadas aparece en la primera columna, mientras que en la segunda columna se observan los niveles de reactividad de dichos aislados a anticuerpos policlonales específicos que reconocen proteínas de superficie, los que definen los serotipos A y B. Los puntos de corte para la concentración que determinó entre cepas sensibles y resistentes fue: anfotericina B menor o igual a 1µg/ml, fluconazol menor o igual a 12.5µg/ml, itraconazol menor o igual a 14µg/ml, ketoconazol menor o igual a 14µg/ml.

## 6.2 EXTRACCIÓN DE DNA DE CEPAS DE C. albicans.

La obtención de DNA genómico se realizó en todos los casos usando  $2 \times 10^8$  células de C. albicans. Los resultados obtenidos de la extracción del DNA fueron muy variados obteniéndose un rendimiento desde 200 a 1000  $\mu\text{g}$  DNA/ $2 \times 10^8$  células. Para confirmar que el material genómico conservara su integridad después de la extracción (no degradado ni contaminado con RNA). Se corrieron electroforéticamente 5 $\mu\text{g}$  del DNA en geles de agarosa y se visualizaron después de la tinción del gel con bromuro de etidio. La figura 1 muestra el corrimiento electroforético del DNA de diferentes aislados de C. albicans en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y utilizando TAE como amortiguador de corrida.

## 6.3 RESTRICCIÓN DEL DNA DE C. albicans USANDO Eco RI.

Para los ensayos de RFLP de los 41 aislados de C. albicans, se utilizaron 50 $\mu\text{g}$  de DNA aislado y se incubaron con la enzima de restricción Eco RI. El corrimiento electroforético en geles de agarosa para visualizar la digestión del material genómico de la levadura se muestra en la figura 2.

Los productos de digestión del DNA con Eco RI de diferentes aislados de C. albicans, separados en geles de agarosa al 1%, mostraron un patrón de bandas muy complejo que van desde 21420 a 1412 pb. De los 41 aislados de C. albicans que se utilizaron en éste estudio, no pudo definirse el patrón de bandeado para 6 cepas, ya que solo se observó un barrido sin una clara definición de las bandas. La tabla 6 muestra las bandas con sus pesos moleculares obtenidas a través de la digestión de los diferentes aislados de C. albicans utilizando la enzima de digestión Eco RI.

DNA GENOMICO DE DIFERENTES AISLADOS DE  
*Candida albicans*.

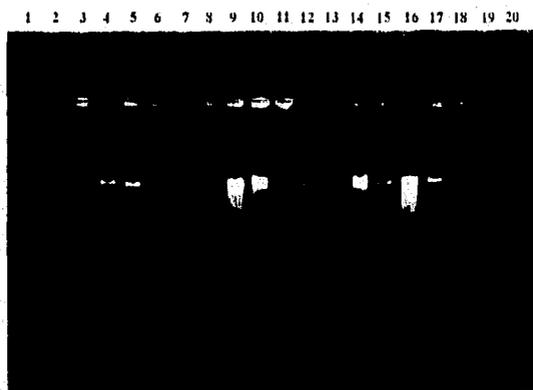


Figura 1: Electroforesis del material genómico de diferentes aislados de *C. albicans*. En la fotografía se muestran las bandas de DNA de 20 aislados de *C. albicans* separados en un gel de agarosa al 1% usando amortiguador TAE. La corrida fué realizada a 90 voltios durante 1 hora. La distribución por carril es la siguiente: Carril 1, aislado 1; 2-4; 3-5; 4-7; 5-14; 6-15; 7-16; 8-17; 9-18; 10-32; 11-35; 12-36; 13-37; 14-40; 15-44; 16-45; 17-47; 18-48; 19-60; 20-61.

**ANALISIS MEDIANTE RFLP DE AISLADOS DE *Candida albicans*  
USANDO Eco RI**

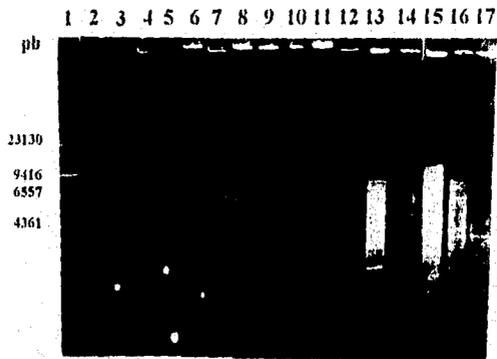


Fig. No. 2: Electroforesis de productos de digestión con Eco RI de aislados de *Candida albicans*. En la fotografía se muestran los patrones de bandas de diferentes aislados de *C. albicans* separados en un gel de agarosa al 1% usando amortiguador TAE y teñidos con 5µg/ml de bromuro de etidio. La corrida fue realizada a 90 voltios durante 2.5 horas. La distribución por carril es la siguiente: Carril 2, aislado 16; 3-73; 4-35; 5-37; 6-85; 7-91; 8-137; 9-47; 10-40; 11-45; 12-17; 13-14; 14-108; 15-36; 16-96; 17-63. En el carril 1 se muestran las movilidades relativas del marcador  $\lambda$ /Hind III.

Tabla No.6: PESOS MOLECULARES DE LAS BANDAS DE DNA DE DIFERENTES AISLADOS DE

*Candida albicans.*

Análisis mediante RFLP, usando Eco RI como enzima de restricción.

CEPA 1	CEPA 5	CEPA 7	CEPA 14	CEPA 15	CEPA 16	CEPA 17	CEPA 18	CEPA 32	CEPA 35	CEPA 36	CEPA 37	CEPA 40	CEPA 44	CEPA 45	CEPA 47	CEPA 48	CEPA 60	CEPA 61	CEPA 62	CEPA 63	CEPA 64	CEPA 68	CEPA 70	CEPA 73	CEPA 78	CEPA 84	CEPA 85	CEPA 91	CEPA 93	CEPA 96	CEPA ATCC	CEPA 108	CEPA 136	CEPA 137		
16830	11291	10002	16023	17314	11984	15524	14946	14758	11080	17731	21420	17314	10825	16738	16975	16975	17618	11080	10002	17070	11680	7796	14480	10825	16312	10387	18014	15341	10825	18301	18014	20509	17936	18446		
13041	9111	8568	14118	14389	9488	12759	12519	12440	8984	13941	11984	14286	8912	13815	14018	13748	14389	8912	8397	6293	9053	6806	11517	8912	13748	8568	14758	10994	8765	15232	14854	16623	14289	15524		
10825	7650	7088	13086	11080	4695	9905	9760	9780	7513	11385	11291	10694	7354	10694	10618	10618	11080	7354	6991	5766	7733	6104	7796	7354	11680	7221	11291	8984	7231	11751	11517	12840	11147	12206		
8178	6661	6293	10387	7650	3757	8397	8568	6991	6293	10486	9488	8665	5839	8102	8765	7291	7513	6043	5839	5134	5426	3757	6588	6509	9780	5839	9411	6293	5839	8602	10298	9843	8397	10163		
7221	6043	5766	10002	6366	2689	7888	7088	5912	5426	8984	7888	7513	5328	6806	8178	6104	6293	5426	5134	3949	4544		5766	6231	8178	5203	8665	5912	4954	8025	7733	8568	7513	8765		
6104	5426	4393	9053	7888		7221	5912		4474	7796	6437	6231	4393		7354	5134		5063	4296	3690			4393	5640	7291	4296	7650	5426	4393	7513	6509	7796	6293	8025		
4626	4474	4089	8397	6437		6043	4695		3949	7221	3757	5203	3603		6175	4146		4544	3830						5328	4793	3603	6366	4474	3949	6661	4852	7354		6588	
	3690	3603	7650	5640		5203	4695			6661	3017	4146			5203	3096		4908	2689						4393		2840	4852	3690	5440	4474	6231		6588		
	2803	2840	6231	4695		3096				5839	2424				4146			3757									4206	3415	4544	3287					6588	
			5328							4852					3603												3757	2903	4089						6588	
			4296							3830					3096												4206	3415	4852	3690	4474	6231			6588	
			3757							2840																	3690	2689							6588	
			3226							2689																										6588
			2517							2269																										6588
			1412																																	6588

Pesos moleculares obtenidos a través de densitometría y expresados en pares de bases

### 6.3.1 Dendograma de los fingerprinting de DNA obtenidos mediante la digestión del DNA de *C. albicans* con Eco RI (RFLP).

Con la finalidad de realizar el análisis del polimorfismo de los patrones de bandas de DNA que definen cada aislado de *C. albicans*, se realizó el agrupamiento de los aislados a través del análisis de clusters, obteniéndose como resultado una gráfica con los grupos de cepas ordenadas por el índice de similitud de los patrones de bandeos obtenidos de la digestión de Eco RI. El dendograma de la figura 3 representa el agrupamiento con base en la similitud entre los 35 aislados de *C. albicans* discernibles por este método.

### 6.4 RESTRICCIÓN DEL DNA DE *C. albicans* USANDO Xba I.

Se digirieron 50 µg de DNA de cada aislado de *C. albicans* y se incubaron con la enzima de restricción Xba I. El corrimiento electroforético de los productos de digestión del DNA de *C. albicans*, mostró patrones de bandas de DNA menos complejos y de menor peso molecular en comparación con Eco RI. En la figura 4 se muestran los productos de digestión de DNA de diferentes aislados de *C. albicans* empleando para la electroforesis geles de agarosa al 1%. Los productos de digestión utilizando Xba I mostraron bandas de peso molecular entre 14307 a 554 pb. De los 41 aislados de *C. albicans* no pudo definirse el patrón de bandeos para 6 cepas, ya que solo se observó un barrido sin una clara definición de las bandas. La tabla 7 resume los pesos moleculares de 35 cepas de *C. albicans* utilizando la enzima de digestión Xba I.

**DENDOGRAMA USANDO ENLACE SENCILLO PARA EL ANÁLISIS DE AISLADOS  
DE *C. albicans* MEDIANTE RFLP UTILIZANDO Eco RI.**

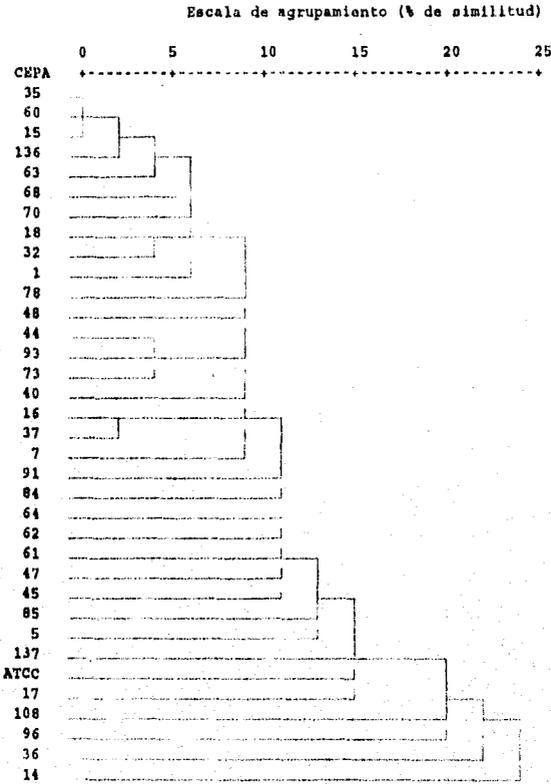


Fig. No. 3: El dendograma muestra la similitud de los aislados de *C. albicans*, de acuerdo a sus patrones de bandeos obtenidos mediante RFLP usando Eco RI como enzima de restricción. De esta forma, tomando en cuenta el coeficiente cero (un 100% de similitud) en la escala de agrupamiento, la cepa 35, 60 y 15 son iguales pero genéticamente más alejadas del aislado 14.

ANALISIS MEDIANTE RFLP DE AISLADOS DE *Candida albicans*  
USANDO Xba I



Fig. No. 4: Electroforesis de productos de digestión con Xba I de aislados de *Candida albicans*. En la fotografía se muestran los patrones de bandas de diferentes aislados de *C. albicans* separados en un gel de agarosa al 1% usando amortiguador TAE y teñidos con 5µg/ml de bromuro de etidio. La corrida fué realizada a 90 voltios durante 2.5 horas. La distribución por carril es la siguiente: Carril 2, aislado 48; 3-63; 4-61; 5-37; 6-78; 7-73; 8-36; 9-91; 10-85; 11-62; 12-84; 13-80; 14-35; 15-2; 16-7; 17-44. En el carril 1 y 17 se muestran las movilidades relativas del marcador  $\lambda$ /Hind III.

Tabla No. 7: PESOS MOLECULARES DE LAS BANDAS DE DNA DE DIFERENTES AISLADOS DE *Candida albicans*.

Análisis mediante RFLP usando Xba I como enzima de restricción.

CEPA 1	CEPA 2	CEPA 5	CEPA 7	CEPA 14	CEPA 15	CEPA 16	CEPA 18	CEPA 32	CEPA 35	CEPA 36	CEPA 37	CEPA 40	CEPA 44	CEPA 45	CEPA 47	CEPA 48	CEPA 53	CEPA 61	CEPA 62	CEPA 63	CEPA 67	CEPA 68	CEPA 70	CEPA 73	CEPA 78	CEPA 80	CEPA 84	CEPA 85	CEPA 88	CEPA 91	CEPA 93	CEPA 96	CEPA 105	CEPA ATCC		
5164	4816	5472	4816	6043	5677	6954	7578	4330	9831	5240	6954	12791	5548	5417	7210	10307	9289	12639	5240	9831	5548	4887	4330	4887	5937	5091	14307	14197	5164	5472	5240	7113	12639	6043		
4632	4475	4939	4277	4541	5937	4816	5812	3652	4939	4887	5164	10018	4939	4816	5417	5164	7309	11080	4996	6811	4939	3092			4193	4193	4541	5707	10659	4330	4996	4754	6615	10307	5707	
2839	5577	4193	3652	4330	4887	4277	4754	2839	4632	4475	4996	8740	4541	4094	5091	4887	4397	8019	4632	4887					3577	3577		5091	8447	3748	4632	4397	4330	4754	4754	
		3798	3577	3963	4541	3390	4193	554	4277	3577	4330	6615	4193	3577	4632	4541	3715	7682	3652									4397	5091	2931	3652	3473	2931	4330	4193	
		3092	3304	2750	3715	2645	3577		3473		3577	5091	3577		3126	3577	3652	6811										3652	4330		3126			3577	3473	
					3095	963	2645											4754																3590		
					789													5937																		
																		5472																		
																		4816																		
																		4330																		
																		3577																		
																		3092																		

Pesos moleculares obtenidos a través de densitometría y expresados en pares de bases (pb).

#### **6.4.1 Dendograma de los fingerprinting de DNA obtenidos mediante la digestión del DNA de *C. albicans* con Xba I (RFLP).**

Para el análisis estadístico de los fingerprinting obtenidos a través de la digestión con Xba I, se realizó el agrupamiento de las cepas por clusters, obteniendo como resultados, grupos de cepas de acuerdo al índice de similitud de los patrones de bandas de DNA genómico digerido. En la figura 5, el dendograma representa el agrupamiento en base a la similitud de los diferentes aislados de *C. albicans* en ensayos de RFLP utilizando la enzima de restricción Xba I.

#### **6.5 AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE DNA POLIMORFICO DE *C. albicans* (RAPD-PCR).**

El corrimiento electroforético en geles de agarosa al 2% permitió visualizar los productos de amplificación del DNA genómico de los diferentes aislados. La figura 6 ilustra los productos de amplificación del DNA obtenidos de diferentes aislados de *C. albicans*. Como se observa en la figura, los productos de amplificación mostraron patrones de bandas más claros y de menor peso molecular, los cuales van desde 1390 a 181 pb. La tabla 8 y 9 resume los pesos moleculares obtenidos a través de la amplificación de diferentes aislados de *C. albicans* utilizando la técnica de RAPD-PCR.

##### **6.5.1 Dendograma del análisis mediante RAPD-PCR de cepas de *C. albicans*.**

Mediante el análisis estadístico de clusters de los fingerprinting obtenidos por RAPD-PCR en los diferentes aislados de *C. albicans*, se pudo realizar el agrupamiento de 35 aislados de *C.*

**DENDOGRAMA USANDO ENLACE SENCILLO PARA EL ANÁLISIS DE AISLADOS  
DE *C. albicans* MEDIANTE RFLP UTILIZANDO Xba I.**

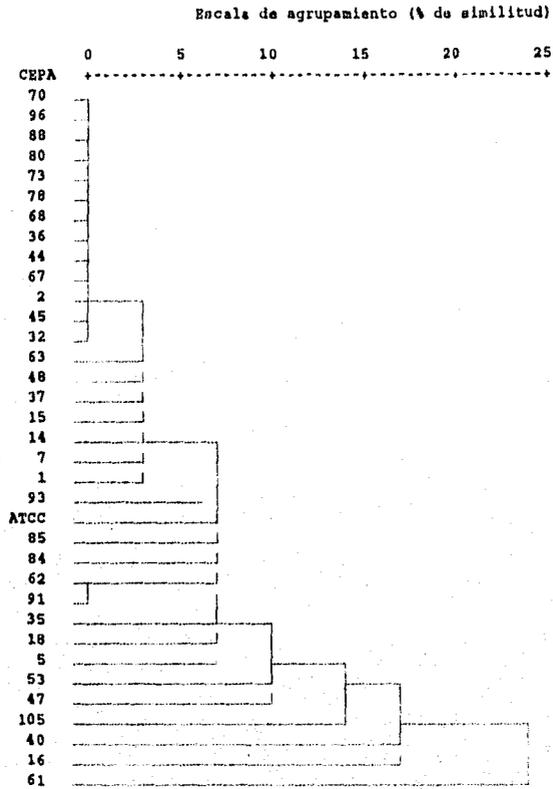


Fig. No. 5: El dendograma muestra la similitud de los aislados de *C. albicans*, de acuerdo a sus patrones de bandeo obtenidos mediante RFLP usando Xba I como enzima de restricción. De esta forma, tomando en cuenta el coeficiente cero (un 100% de similitud) en la escala de agrupamiento, las cepas 70, 96, 88, 80, 73, 78, 68, 36, 44, 67, 2, 45 y 32 tienen el mismo patrón de bandeo por lo cual en el dendograma se encuentran formando un solo grupo; no así las cepas que están en la parte inferior las cuales son genéticamente diferentes con éste grupo.

ANALISIS MEDIANTE RAPD-PCR DE DIFERENTES AISLADOS DE  
*C. albicans*

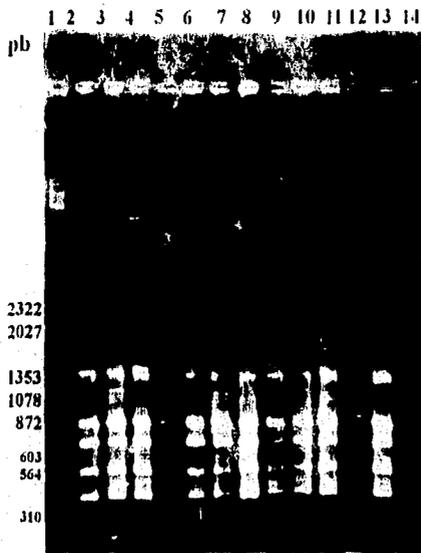


Fig. No. 6: Electroforesis de los productos de amplificación mediante RAPD-PCR de diferentes aislados de *C. albicans*. En la fotografía se muestran los patrones de bandas de diferentes aislados de *C. albicans* separados en un gel de agarosa al 2%, usando amortiguador TAE y teñidos con 5µg/ml de bromuro de etidio. La corrida fue realizada a 90 voltios durante 2.5 horas. La distribución por carril es la siguiente: Carril 2, aislado 1. 3-2; 4-4; 5-5; 6-7; 7-14; 8-16; 9-35; 10-37; 11-47; 12-53; 13-60. En el carril 1 se muestran las movilidades relativas del marcador λ Hind III-φ X174/Hae III.

Tabla No. 8: PESOS MOLECULARES DE LAS BANDAS DE DNA DE DIFERENTES AISLADOS DE

*Candida albicans*

Análisis mediante RAPD.

CEPA 1	CEPA 2	CEPA 4	CEPA 5	CEPA 7	CEPA 14	CEPA 15	CEPA 16	CEPA 35	CEPA 36	CEPA 37	CEPA 40	CEPA 44	CEPA 47	CEPA 48	CEPA 53	CEPA 60	CEPA 62	CEPA 63	CEPA 64	CEPA 68	CEPA 70	CEPA 73	CEPA 78	CEPA 80	CEPA 84	CEPA 85	CEPA 88	CEPA 96	CEPA 99	CEPA 105	CEPA 108	CEPA 135	CEPA 137	ATCC		
1390	1390	1390	840	1390	1390	1390	1390	1390	1390	840	1390	1390	1390	1390	920	1390	1390	885	1390	1390	1390	1390	840	840	1390	1390	1390	1390	1390	840	1091	1091	1390			
1190	1190	1091	714	840	840	840	1091	1091	1091	714	1091	1091	1091	1091	795	1091	1091	821	840	840	840	840	181	714	840	840	1190	1190	840	840	714	840	840	1091		
840	1091	840	541	714	714	714	840	840	840	541	885	840	840	840	390	840	840	795	714	714	714	714													840	
714	840	714	390	541	541	541	714	714	714	390	840	795	795	795		714	714	749	541	541	541	541		390	541	541	840	840	541	541	390	541	541		714	
541	795	541		390	390	390	541	541	541	235	795	714	714	714		541	541	541	390	390	390	390				390	390	795	795	390	390	235	390	390		541
390	714	470			235	235	390	436	390		714	541	541	541		470	390	235										714	714		235				470	
235	541	390					235	390			541	390	390	390		390												669	541						390	
	390	235									436	235	235	235		235												541	390						235	
	235										390																	390								
											235																	235								

Pesos moleculares obtenidos a través de densitometría y expresados en pares de bases (pb).

**REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE DIFERENTES AISLADOS DE *C. albicans* FORMADOS MEDIANTE RAPD-PCR.**

	60	16	47	48	44	70	105	37	15	14	108	85	99	84	73	68	64	7	5	80	136	137	36	62	35	1	4	2	96	88	40	78	53	63			
1390																																					
1190																																					
1091																																					
920																																					
885																																					
840																																					
820																																					
795																																					
749																																					
714																																					
669																																					
541																																					
470																																					
436																																					
390																																					
235																																					
181																																					

Tabla No. 9: Representación del corrimiento electroforético de los productos de amplificación de diferentes aislados de *C. albicans* obtenidos mediante RAPD-PCR. En la tabla se muestran los pesos moleculares obtenidos de los patrones de bandas.

*albicans*, obteniéndose como resultado un dendograma de agrupamiento de los aislados de acuerdo al índice de similitud de los patrones de bandas de DNA amplificado al azar. El dendograma de la figura 7 representa el ordenamiento por grupos de 35 diferentes aislados de *C. albicans*.

## **6.6 AGRUPACIÓN DE LOS PATRONES DE DNA OBTENIDOS MEDIANTE EL ANÁLISIS POR RFLP Y RAPD-PCR.**

Para agrupar las diferentes cepas *C. albicans*, se consideró un 80 % de similitud en la escala de agrupamiento de los dendogramas, obteniéndose por RFLP 6 y 3 grupos en los ensayos usando Eco RI y Xba I respectivamente. En los ensayos de RAPD-PCR se obtuvieron 14 grupos.

### **6.6.1 Correlación de los grupos mediante RFLP y RAPD-PCR con el serotipo y sensibilidad a diferentes antimicóticos.**

Con la finalidad de conocer si existe una asociación entre el perfil de fingerprinting de DNA, la resistencia a antimicóticos y el serotipo que presentan las cepas de *C. albicans*, se correlacionaron los datos obtenidos de sensibilidad a antimicóticos y serotipos, con los grupos de aislados obtenidos por el análisis de RFLP y RAPD-PCR.

Los 6 grupos formados mediante RFLP usando Eco RI fueron sensibles a anfotericina B, y el antimicótico que presentó mayor resistencia fue ketoconazol, a excepción del grupo IV, en el cual todas las cepas resultaron sensibles a la acción de este antimicótico. Sin embargo, este grupo fue el que presentó mayor resistencia a itraconazol (50%). En la tabla 10 se resume la correlación entre los grupos formados. Los grupos II y III ambas con serotipo A, no presentaron resistencia a

**DENDOGRAMA USANDO ENLACE SENCILLO PARA EL ANÁLISIS POR RAPD-PCR  
DE AISLADOS DE *C. albicans*.**

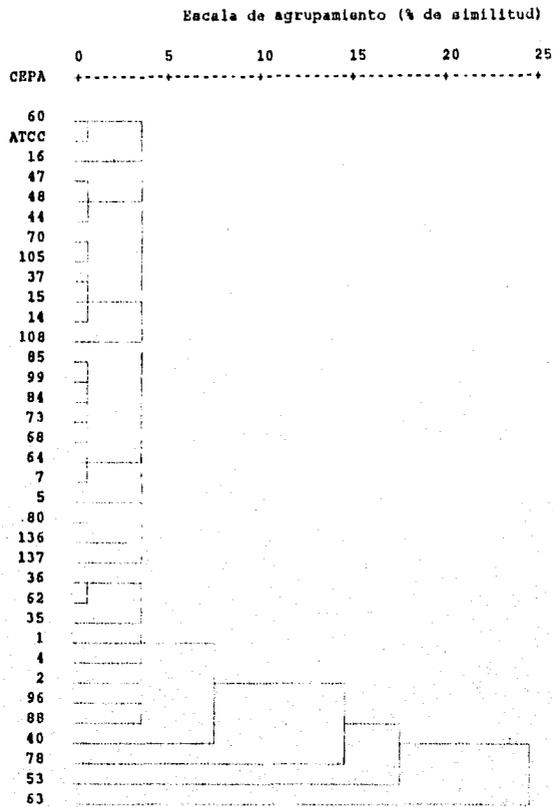


Fig. No. 7: El dendrograma muestra la similitud de los aislados de *C. albicans*, de acuerdo a sus patrones de amplificación obtenidos mediante RAPD-PCR. En el dendrograma se observan 6 grupos de aislados de *C. albicans* tomando en cuenta el coeficiente cero (un 100% de similitud) en la escala de agrupamiento. La similitud entre los aislados disminuye conforme se aleja una cepa de otra en el dendrograma.

fluconazol ni a itraconazol. El único grupo que presentó resistencia a tres antimicóticos fué el grupo V y esta solo se presentó en menos del 40% de los aislados de éste grupo.

**Tabla No. 10: CORRELACION DE SEROTIPO Y SENSIBILIDAD ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS FORMADOS MEDIANTE RFLP CON Eco RI.**

Gpo	Cepas	Serotipo A	Serotipo B	Anfotericina B %	Fluconazol %	Itraconazol %	Ketoconazol %
I	35, 60, 15	66.6	33.3	100	100	100	33.3
II	60, 136	100	0	100	100	100	50
III	60, 136, 36	100	0	100	100	100	66.6
IV	18, 32	100	0	100	100	50	100
V	44, 93, 73	100	0	100	66.6	66.6	66.6
VI	16, 37	0	100	100	50	100	50

Nivel de discriminación del 80 %.

% de sensibilidad al antimicótico.

Los 3 grupos obtenidos del análisis mediante Xba I fueron sensibles a anfotericina B, y el antimicótico que presentó mayor resistencia fué ketoconazol. En la Tabla 11 se resume la correlación entre estos grupos.

**Tabla No. 11: CORRELACION DE SEROTIPO Y SENSIBILIDAD ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS FORMADOS MEDIANTE RFLP CON Xba I.**

Gpo	Cepas	Serotipo A	Serotipo B	Anfo B %	Fluco %	Itraco %	Ketoco %
I	70,96,88,80,73,78,68, 36,44,67,2,45,32	76.92	23.07	100	76.92	68.23	46.15
II	2,63	100	0	100	100	100	50
III	62,91	100	0	100	100	100	50

Nivel de discriminación del 80 %. % de sensibilidad al antimicótico.

En el grupo I, en el cual existe un 77 % de predominancia del serotipo A, se presentó mayor resistencia a fluconazol, itraconazol y ketoconazol, en contraste con los dos grupos restantes, donde todas las cepas fueron serotipo A y no se presentó resistencia a fluconazol e itraconazol.

De los grupos obtenidos mediante RAPD-PCR, el VII, XII y XIV fueron los tres únicos grupos que mostraron en todas sus cepas resistencia a ketoconazol. La Tabla 12 resume éstos resultados, indicando que todos los aislados de los 14 grupos mostraron sensibilidad a la acción de la anfotericina B.

**Tabla No. 12: CORRELACION DE SEROTIPO Y SENSIBILIDAD ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS FORMADOS MEDIANTE RAPD.**

Gpo	Cepas	Serotipo A	Serotipo B	Anfo B %	Fluco %	Itraco %	Keto %
I	60,ATCC	100	0	100	100	100	50
II	47,48,44	33,3	66,6	100	66,6	66,6	66,6
III	70,105,37,15,14	60	40	100	100	80	80
IV	85,99,84,73,68,64,7	57,14	42,8	100	85,7	71,4	57,14
V	5,80	50	50	100	100	100	100
VI	36,62	100	0	100	100	100	50
VII	60,16	50	50	100	50	100	0
VIII	60,16,48	33,3	66,6	100	66,6	100	33,3
IX	15,108	50	50	100	100	100	100
X	5,137	50	50	100	100	100	100
XI	36,35	100	0	100	100	100	50
XII	2,96	100	0	100	100	100	0
XIII	1,35,36,4	75	25	100	100	75	25
XIV	88,96,2	66,6	33,3	100	100	100	0

Nivel de discriminación del 80 %, % de sensibilidad al antimicótico.

En general, la resistencia que se presentó con fluconazol e itraconazol no rebasó el 50% de los aislados. Todos los aislados de los grupos I, VI, y XI fueron serotipo A, sensibles a anfotericina B, fluconazol e itraconazol y solo un 50% de los aislados fueron resistentes a ketoconazol. Los aislados de los grupos (V, IX y X) fueron sensibles en su totalidad a los 4 antimicóticos empleados. Sin embargo, no existió correlación entre el serotipo y algún antimicótico en particular, debido a que en los aislados de estos tres grupos la proporción del serotipo A y B fué la misma (50%).

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El objetivo fundamental de este estudio fue establecer un método de tipificación de cepas de *C. albicans*. Para lograrlo, se procedió a la obtención del material genómico de los aislados mediante el protocolo descrito para el aislamiento de DNA de levaduras<sup>41</sup> con algunas modificaciones. A diferencia del protocolo, en el presente trabajo se utilizaron lavados adicionales del DNA con etanol al 70% recuperándolos por centrifugación. Esto permitió obtener DNA de alta calidad en las levaduras analizadas y un mayor rendimiento, con respecto a los métodos que utilizan extracciones fenólicas. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones de DNA para cada una de las levaduras fué calculada de la misma manera (espectrofotométricamente) existieron diferencias visibles en la cantidad de DNA cuando este fué sometido a electroforesis en geles de agarosa, observándose diferencias en las intensidades de las bandas de DNA. Posiblemente las diferencias en las concentraciones de DNA obtenidas se deban en parte a la alta especificidad de detección del método, y por otra parte a pérdidas del material durante la extracción, no obstante que la calidad del DNA y el rendimiento obtenido fueron buenos.

Uno de los métodos empleados para la tipificación de los aislados de *C. albicans* fué la digestión del DNA con las enzimas de restricción Eco RI y Xba I. Los productos de digestión producidos por la enzima Eco RI fueron muy complejos; probablemente esto se deba a que la enzima produjo cortes múltiples o al fondo intenso observado en los geles de agarosa, cuando el DNA fue sometido a electroforesis. Los aislados que mostraron una banda de 3757 (aislados: 14, 16, 37, 61, 68, 85,) pb en el análisis de RFLP utilizando la enzima Eco RI, se relaciona con

serotipo B, mientras que las bandas de 4393 (aislados: 70, 44, 93, 73, 7, 137), 6293 (aislados: 35, 60, 130, 63, 7, 91) y 7513 pb. (aislados: 35, 60, 136, 40, 96) fueron serotipo A.

Debido a la complejidad en el patrón de bandas y a la dificultad en el análisis de RFLP utilizando la enzima Eco RI, es imposible establecer bandas representativas de la población como ocurre en los ensayos de RAPD-PCR, por lo que se requiere un análisis de Southern blot para disminuir la complejidad de los patrones de bandas, lo cual puede permitir hacer una correlación entre sensibilidad y serotipo.

Nuestros resultados concuerdan con los reportes de Bart-Delabesse y col.<sup>19</sup> quienes han digerido DNA nuclear y mitocondrial con la enzima Eco RI y han obtenido un patrón complejo de bandas que corresponden a múltiples copias en el genoma del DNA mitocondrial y nuclear. Cada una de sus muestras produjo de 4 a 5 fragmentos principales de 3.7 y 2.6 Kb en todas las muestras; los otros fragmentos, estuvieron en el rango de 6 a 8.5 kb.

La digestión con la endonucleasa Xba I produjo un patrón con un menor número de cortes, sin embargo, las bandas obtenidas fueron muy tenues, lo cual también dificulta el estudio de dichos patrones de fingerprinting. Hubo además algunos aislados en los cuales no se dio el corte con la enzima de restricción, posiblemente por algún inhibidor presente en el material genómico o a cepas con características diferentes.

La mayoría de las cepas que presentaron la banda de 3577 pb (aislados: 2, 7, 18, 36, 37, 40, 44, 45, 48, 61, 73, 78, 105,) se relacionaron con serotipo A, y todas las cepas que presentaron la banda de 4754 pb (aislados: 93, ATCC, 18, 105, 40, 61) fueron serotipo A. Todos los aislados de urocultivo presentaron las bandas de 3577 y 4754. La mayor parte de estas cepas pertenecen al serotipo A (14 de 28 cepas) lo cual plantea que la utilización de estas dos bandas como sondas

moleculares en ensayos de Southern blot, pudiera permitir el agrupamiento de por lo menos el 50% de los aislados obtenidos de los ensayos de RFLP usando Xba I. Otro candidato a sonda es la banda de 5091 pb, presente en la mayoría de las cepas que pertenecen al serotipo B (aislados: 80, 85, 84, 47, 61, y solo 40 es A).

El segundo método empleado en la tipificación de los aislados de *C. albicans* fue la amplificación al azar del material genómico, conocido como RAPD-PCR. Este método produjo patrones más claros y fáciles de analizar en comparación con el primer método de RFLP. Este ensayo, permitió la amplificación de tres bandas predominantes de 541, 714 y 840, pb en el 95 % de las cepas de *C. albicans* empleadas en el estudio; además de que permitió formar 6 grupos idénticos.

Algunos aislados sin embargo, (aislados: 53, 63 y 78) solo presentaron una de las tres bandas predominantes, lo cual las ubico como cepas genéticamente diferentes o pertenecientes a otra especie. La banda de 885 pb se relacionó con aislados que presentaron serotipo A y sensibilidad a los cuatro antimicóticos empleados. De igual manera la banda de 181 pb, esta más alejada del resto de los aislados. Utilizando el análisis de RAPD, bajo las condiciones aquí descritas, no permitió establecer una correlación directa con serotipo y sensibilidad, para los 41 aislados de *C. albicans* analizados. Esto implica necesariamente el empleo de otros iniciadores que permitieran la obtención de bandas diferenciales abriendo nuevas posibilidades para la correlación con serotipo y resistencia a fármacos antimicóticos. Las bandas de 541, 714 y 840, pueden permitir la simplificación de los patrones de bandas en los ensayos de RFLP con enzimas de restricción, por lo que se sugiere la secuenciación de estos marcadores y su posterior uso como sondas de hibridación en estudios de Southern blot.

## 8. CONCLUSIONES

- 1) La técnica de RAPD-PCR resultó ser un mejor método para tipificar aislados de *C. albicans* en comparación con el método de RFLP.
- 2) A pesar de que el análisis por RAPD-PCR produjo patrones claros de analizar, no fue posible una correlación al 100% con el serotipo y sensibilidad a diferentes antimicóticos.
- 3) Las bandas de 541, 714 y 840, pb obtenidas mediante RAPD-PCR, pueden ser empleadas como sondas en ensayos de Southern blot para disminuir la complejidad de las bandas en los ensayos de RFLP.
- 4) Los métodos de genotipificación utilizados no permitieron asociar los "fingerprinting" de DNA con perfiles de resistencia o de serotipo de los aislados analizados, por lo cual se requiere de marcadores moleculares más específicos.

## 9. GLOSARIO

**Agarosa.** Es un polímero lineal altamente purificado, derivado de algas marinas.

**Anergia.** Defecto inmune en el cual el cuerpo no rechaza las sustancias extrañas lo suficientemente bien.

**Anticuerpos monoclonales.** Anticuerpos específicos producidos in vitro por clones de células B hibridizadas con células cancerosas.

**Blastosporas.** Espora asexual de una levadura producida por gemación.

**Cistitis.** Inflamación de la vejiga, la mayor parte de las veces de origen infeccioso.

**Clamidosporas.** Espora asexual producidas por ensanchamiento de hifas septadas circular de doble pared.

**Clona.** Una población de células que son idénticas a la célula madre.

**Clonación.** Una serie de manipulaciones designadas para aislar y propagar una secuencia específica de ácido nucleico o célula para caracterización, almacenaje o amplificación posterior.

**Comensal.** Organismo que dentro de una asociación parasitaria se beneficia del hospedero sin provecho ni daño para este.

**Complemento.** Un grupo de proteínas séricas involucradas en el control de la inflamación, la lisis y fagocitosis en membranas celulares. El sistema puede ser activado por interacción con el sistema inmune.

**Contrainmunelectroforesis.** El movimiento del antígeno y anticuerpo en dirección uno hacia el otro a través de un campo eléctrico.

**Densitómetro.** Un instrumento compacto de análisis densitométrico que se basa en el empleo de un rayo láser que "barre" espectrofotométricamente geles húmedos y secos; blots y negativos de película. Este sistema permite el análisis de los patrones de bandas y con esto el procesamiento de la imagen para el cálculo posterior de los pesos moleculares de cada cepa, utilizando el software Fragment NT

**Dalton.** Peso equivalente a un átomo de hidrógeno ( $1.66 \times 10^{-24}$ ).

**Desnaturalización.** Conversión de DNA o RNA del estado de doble cadena a cadena simple. Esto significa disociación de la doble hélice en dos cadenas sencillas, o la eliminación intramolecular del apareamiento de las bases.

**Dimórfico.** Es una propiedad de los hongos para crecer en forma de levadura y filamentosa.

**Disnea.** Dificultad en la respiración.

**División celular.** Durante el ciclo de replicación de las células somáticas, los cromosomas son replicados durante la fase S (síntesis). Después de un periodo llamado  $G_2$ , las células comienzan el complicado proceso de mitosis, también llamado fase M.

**Electroforesis.** Un tipo de cromatografía en la cual las macromoléculas (p. ej. proteínas y ácidos nucleicos) son separadas a través de una matriz empleando un campo eléctrico.

**Enzima de restricción.** (Endonucleasa) Una enzima que reconoce y corta una secuencia corta específica llamada sitio de restricción, en una molécula de DNA de doble cadena. Están

ampliamente distribuidas en bacterias y son utilizadas extensamente en técnicas de DNA recombinante.

**Estomatitis.** Inflamación de la mucosa de la boca.

**Estringente.** Realizado bajo condiciones estrictas.

**Fagocitosis.** Mecanismo de defensa antimicrobiana, que involucra procesos de digestión e ingestión por parte de fagocitos hacia moléculas extrañas en el organismo.

**Febrícula.** Incremento en la temperatura corporal inferior a 38 °C.

**Fermentación.** Proceso metabólico que relaciona obtención de energía de un azúcar u otra molécula orgánica, que no requiere oxígeno o un sistema de transporte de electrones, y usa una molécula orgánica como aceptor final de electrones.

**Fijación del complemento.** Proceso mediante el cual se combina el complemento con un complejo antígeno-anticuerpo

**Fungemia.** Presencia de agentes fúngicos en la sangre.

**Gemación.** Proceso de reproducción celular que consiste en la formación, en una parte de la célula, de una yema o un botón que se desprende para formar un nuevo individuo.

**Hifa.** Unidad estructural de los hongos.

**Iatrogenia:** Las repercusiones en el paciente como consecuencia del tratamiento médico.

**Imidazoles.** Drogas antifúngicas que interfieren con la síntesis de esterol.

**Inmunofluorescencia.** Una técnica usada para identificar antígenos microscópicamente particulares en tejidos o en células unión de un anticuerpo fluorescente conjugado.

**Iniciador o Primer.** Una molécula pequeña de ácido nucleico que en base a su apareamiento con una secuencia complementaria, provee un extremo 3'-OH libre para cualquier variedad de reacciones de extensión dependiente de iniciadores.

**Inmunodeficiencia.** Enfermedad resultante de la ausencia, o falla de la función normal, de uno o más elementos del sistema inmune.

**Inmunodifusión.** Una prueba que consiste en reacciones de precipitación llevadas fuera de un medio de agar

**Inmunosupresión.** Inhibición de la respuesta inmune.

**Inmunotinción.** Es la manifestación de la reacción Ag-Ac en diferentes soportes (tejidos, blotting, etc.,) por medio de técnicas de tinción.

**Isoenzimas.** Formas múltiples de una enzima que catalizan la misma reacción pero difieren una de otra en su secuencia de aminoácidos, afinidad del sustrato,  $V_{max}$ , y/o propiedades regulatorias.

**Malignidad.** Naturaleza oncológica (neoplásica) de una entidad clínica.

**Satélite DNA.** Consiste de muchas repeticiones en tandem (idénticas o relacionadas) de una pequeña unidad básica repetitiva.

**Muguet:** Infección micótica de la mucosa de la boca, caracterizada por el desarrollo de placas blanquecinas, habitualmente por hongos del género *Candida*.

**Nucleósido.** Un compuesto que consiste de una base purica o pirimidica unida a una pentosa.

**Nucleótidos.** Un nucleósido fosforilado en uno de los grupos hidroxilo de la pentosa.

**Onxis.** Inflamación de la dermis ungular.

**Orofaringen.** Relativa a la faringe en su porción oral.

**Pápulas.** Lesiones en la piel caracterizadas por levantamiento de ésta e induración.

**Pirimidinas.** Son bases heterocíclicas nitrogenadas encontradas en ácidos nucleicos y ribonucleicos eje. Citosina. La timina se encuentra exclusivamente en DNA.

**Purinas.** Son bases heterocíclicas nitrogenadas encontradas en ácidos nucleicos y ribonucleicos Adenina y Guanina.

**PCR.** Describe una técnica en la cual los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión con la enzima DNA polimerasa, son usados para amplificar el número de copias de una secuencia de DNA blanco mayor a  $10^6$  veces.

**Pielonefritis.** Inflamación simultánea de la nefrona y pelvis renal.

**Pleomórfico.** Muchos hongos, incluyendo *C. albicans* exhiben un diferente número de morfológicas ( blastoconidias o células levaduriformes en gemación, pseudohifa e hifa verdadera septada) bajo ciertas condiciones y a consecuencia de esto reciben el nombre de pleomórficos.

**Precipitinas.** Anticuerpo que se forma en el suero de un organismo por administración de un antígeno y que tiene la propiedad de precipitar este antígeno de los líquidos donde está contenido.

**Pseudohifas.** Unión de levaduras dando la apariencia

**RAPD-PCR.** Este método usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un iniciador único relativamente pequeño con una secuencia nucleotídica arbitraria, el cual es utilizado para amplificar DNA polimórfico al azar.

**RFLP.** Se refiere a las diferencias inherentes en sitios para enzimas de restricción (por ejemplo causadas por cambios en la secuencia blanco) que resulta en diferencias en la longitud de los fragmentos producidos por el corte con alguna enzima de restricción relevante.

**Serotipo.** Es un concepto que define las características de superficie en una célula.

**Sonda.** Usualmente son moléculas de ácidos nucleicos marcados ya sea DNA o RNA, usadas para hibridar a secuencias complementarias en una biblioteca, o entre una secuencias blanco presente en una muestra de ácidos nucleicos, como en el Northern blot y Southern blot.

**Southern blot.** Técnica bioquímica ampliamente usada para detectar la presencia de secuencias específicas de DNA en una mezcla. La muestra (fragmentos de restricción) primero se separa en un gel de agarosa usualmente bajo condiciones desnaturizantes; los componentes separados se transfieren (blotted) a un papel de nitrocelulosa, la cual es expuesta a moléculas marcadas (secuencias de nucleótidos complementarios) radiactivamente que son específicamente unidas a la moléculas de interés, y entonces unidas para ser autorradiografiadas.

**T<sub>m</sub>.** Temperatura a la cual el 50% de todos los dúplex posibles son disociados en su cadena única. Para facilitar la formación de todos los dúplex posibles, la hibridación es conducida debajo de la T<sub>m</sub> de los dúplex, usualmente a la T<sub>m</sub> -20°C. La T<sub>m</sub> aumenta linealmente con el contenido de pares de bases G=C, los cuales están unidos por 3 puentes de hidrógeno y por lo tanto son más estables que los pares A=T.

**Transcripción.** Proceso por el cual una cadena de una molécula de DNA es usada como un templado para la síntesis de un RNA complementario. La RNA polimerasa y varias proteínas accesorias llamados factores transcripcionales forman un complejo que inicia la transcripción.

**Tubo germinativo.** Elongación de las levaduras sin llegar a desprenderse.

**Western blot.** Técnica para detectar proteínas específicas en una mezcla. Después de la separación de las proteínas en un gel mediante electroforesis, las proteínas se fijan en un papel filtro y son detectadas por unos anticuerpos marcados específicos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas R. 1995. *Micología medica ilustrada*. Editorial Interamericana, México, pags. 223-233.
2. Anderson J., Srikantha T., Morrow B., Miyasaki S.H., White T.C., Agabian N., Schmid J. and Soll D.R. 1993. Characterization and partial nucleotide sequence of the DNA fingerprinting probe Ca3 of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:1472-1480.
3. Auger P., Dumas C. and Joly J. 1979. A study of 666 strains of *Candida albicans*: Correlation between serotype and susceptibility to 5-Fluorocytosine. *Journal Infectious Diseases*. 139:590-594.
4. Ausubel Frederick M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. 1989. *Current protocols in molecular biology*. Greene publishing associates and wiley-interscience. United States of America.
5. Balows A., Hauster W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D. and Shadomy H.J. 1991. *Manual of Clinical Microbiology*, Fifth Edition. American Society for Microbiology. Washington D.C. p. 1-1364.
6. Bart-Delabesse E., Boiron P., Carlotti A. and Dupont B. 1993. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:2933-2937.
7. Beck-Sagué C.M., Jarvis W.R. and the National Nosocomial Infections Surveillance System. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. 1980-1990. *The Journal of Infectious Diseases*. 167:1247-1251.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8. Bostock A., Khattak H.N., Matthews R. and Bernie J. 1993. Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*. 139: 2170-2184.
9. Bouchara J. P., Tronchin G., Annaix U., Robert R., Senet J. M. 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infection and Immunity*. 58:48.
10. Brande Abraham I. Davis Charles E. and Fierer Joshua. 1984. *Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pags. 158-176 y 732-741.
11. Brawner D. L. 1991. Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:1020-1025
12. Clemons K.V., Shankland G.S., Richardson M.D. and Stevens D.A. 1991. Epidemiologic study by DNA typing of a *Candida albicans* outbreak in heroin addicts. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:205-207.
13. Fay, Gutiérrez, Rodríguez, López, Romero. 1993. *Microbiología y Parasitología Médica*. Mendez editores. p. 4.98-4.106.
14. Feigin R. D. and Cherry J. D. 1992. *Infecciones en Pediatría*. 2a edición, Interamericana, México. Vol. I:1-1304, Vol II: 1305-2260.
15. Fisher J.F., Chew W.H., Shadomy S., Duma R.J., Mayhall C. G. and House W.C. 1982. Urinary tract infections due to *Candida albicans*. *Reviews of Infectious Diseases*. 4:1107-1118.
16. Fox B. C., Mobley H. L.T., and Wade J. C. 1989. The use of a DNA probe for epidemiological studies of candidiasis in immunocompromised hosts. *The Journal of Infectious Diseases*. 159:488-494.

17. Glenn D. R. 1990. Laboratory methods in basic micology. In: Baley e Scott's, Diagnostic Microbiology, 8a edition, edited by Baron E. Jo. and Finegol S.M., Mosby. St. Louis. p. 681-775.
18. Goshorn A. K., Grindle S. M. and Sherer S. 1992. Gene isolation by complementation in *Candida albicans* and applications to physical and genetic mapping. Infection and Immunity. 60: 876-884.
19. Gutierrez Guevara Teresa. 1995. Serotipificación y sensibilidad a cuatro antimicóticos de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes pediátricos. Tesis para especialización en infectología y ecología medica. UNAM. México.
20. Hasenclever H. F. and Mitchell W. O. 1961. Antigen studies of *Candida albicans*. I. Observation the two antigenic groups in *Candida albicans*. Journal of Bacteriology. 82:570-573.
21. Hellstein J., Vawter H. H., Fotos P., Schmid J. and Soll D. R. 1993. Genetic similarity and phenotypic diversity of comensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. Journal of Clinical Microbiology. 31: 3190-3199.
22. IMSS. 1993. Atlas epidemiológico del Instituto Mexicano del Seguro Social 1985-1990. México.
23. Jones J. M. 1990. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clinical Microbiology Review. 3: 32-45.
24. Kobayashi G. 1995. Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. Archives of medical research. 26:293-296.

25. Kwon-Chung K. J., Lehman D. Good C., Magee P. T. 1985. Genetic evidence for the role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 49: 571.
26. Lee W., Bumie J., Matthews R. 1986. Fingerprinting *Candida albicans*. *Journal of Immunological Methods*. 93: 177-182.
27. Lehmann P. F., Lin D. and Lasker B. A. 1992. Genotypic identification and characterization of species and strain within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 3249-3254.
28. Lewin B., 1994. *Genes V*. 5a edición, Oxford University Press. New York, p.1-1273.
29. Macotela R. E. 1993. Micosis por oportunistas. In: *Microbiología y parasitología médica*, editado por Fay, Gutierrez, Rodríguez, López y Romero. Méndez editores, México. p.4,98-4.107.
30. Magee B. B., D'souza T. M. and Magee P. T. 1987. Strain and species identification by fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida species*. *Journal of Bacteriology*. 169:1639-1643.
31. Maresca B. and Kobayashi G. S. 1994. *Molecular biology of pathogenic fungi. A laboratory manual*. 2a edición, Telos Press, New York p.1-301.
32. Mason M. M., Lasker B. A. and Riggsby W. S. 1987. Molecular probe for identification of medically important *Candida species* and *Torulopsis glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*. 25: 563.
33. Mercure S., Poirier S., Lemay G., Auger P., Montplaisir S. and Repentigny L. 1993. Application of biotyping and DNA typing of *Candida albicans* to the epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 168: 502-507.

34. Miyakawa Y., Mabuchi T. and Fukazawa Y. 1993. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 3344-3347.
35. O'Connor M., Sobel Jack D. 1986. Epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis: Identification and strain differentiation of *Candida albicans*. *The Journal of Infectious Diseases*. 154: 358-363.
36. Citado en: Odds F. C. 1979. *Candida and Candidosis*. University Park Press. Gran Bretaña.
37. Pacheco R.A., Araujo H.L., Cashat C.M., Samudio D.G., Avila F.C. y Santos J.I. 1993. Endocarditis por *Candida* en el primer año de vida. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 50:157-161.
38. Pearce M.A. and Howell S.A. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of azole-resistant and azole-susceptible *Candida albicans* strains. *Journal of clinical microbiology*. 29:1364-1367.
39. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C. and White T. J. 1993. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. In: *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*, edited by Tenover F. C. and Unger E. R. Washington D.C.: American Society for Microbiology., p.3-25.
40. Prasad R. 1991. *Candida albicans Cellular and Molecular Biology*. Springer-Verlag. Alemania. p. 1-259.
41. Reiss E. 1986. *Molecular immunology of mycotic and actinomycotic infections*. Elsevier. U.S.A.

42. Rex J. H., Pfaller M. A., Rinaldi M. G., Polak A. and Galgiani J. N. 1993. Antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology Review*. 6:367-381.
43. Rolfs A., Schuller Y., Finckh U. and Weber R. Y. 1992. PCR: Clinical diagnostics and research. New York. Springer Laboratory. p.
44. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Boston: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2a edition, p.Vo I: 1.1-7.87. Vol II: 8.1-15.113, Vol III: 16.1-1.47.
45. Schröppel K., Rotman M., Galask R., Mac K. and Soll D.R. 1994. Evolution and Replacement of *Candida albicans* strain during recurrent vaginitis demonstrated by DNA fingerprinting.
46. Scherer S. and Stevens D.A. 1987. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 25:675-679.
47. Soll D. R., Staebell M., Langtinum C., Pfaller M., Hicks J., Gopala R. T. V. 1988. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. *Journal Clinical Microbiology*. 26: 1448-1459.
48. Stevens D.A., Olds F.C. and Scherer S. 1990. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. *Reviews of Infectious Diseases*. 12:258-266.
49. Swoboda R. and Brown A. J. P. 1994, *Molecular Biology of pathogenic fungi. A Laboratory manual*. Telos Press. New York. p.
50. Van Belkum A., Melchers W., de Pauw B. E., Scherer S., Quint W. and Meis J. F. 1994. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 169:1062-1070.

51. Vázquez J.A., Sanchez V., Dmuchowski C., Dembry L. M., Sobel J. D. and Zervos M.J. 1993.

Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study. *The Journal of Infectious Diseases*. 168:195-201.

51. Vázquez J.A., Sanchez V., Dmuchowski C., Dembry L. M., Sobel J. D. and Zervos M.J. 1993.  
Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study. *The Journal of Infectious Diseases*. 168:195-201.