UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"IDENTIFICACIÓN BIOQUIMICA, FENOTIPICA Y GENOTIPICA DE ESPECIES DEL GENERO *CANDIDA* AISLADAS DE PACIENTES CON CANDIDOSIS EN EL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, OPD-SSA."

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ÁLVAREZ MONDRAGÓN PALOMA

MÉXICO, D.F. 2011

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	**Profesor:** Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL	**Profesor:** Rosalba Esquivel Cote
SECRETARIO	**Profesor:** Haydee Torres Guerrero
1er. SUPLENTE	**Profesor:** Octavio Rodríguez Cortes
2er. SUPLENTE	**Profesor:** Liliana Rocío González Osnaya

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Inmunoalergología y Micología Medica del Laboratorio Central del Hospital Juárez de México OPD-SSa y en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, Edificio "A" de Investigación, 6º piso.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Haydee Torres Guerrero _____

SUPERVISOR TÉCNICO: Prof. Misael González Ibarra _____

SUSTENTANTE: Paloma Álvarez Mondragón _____

AGRADEDIMIENTOS

En la vida no existe forma de pagar todo lo que debemos, porque no hay precio alguno por el amor, la amistad y compañerismo, este libro va dedicado a todas las personas que estuvieron junto a mi de cualquier forma o circunstancia, es mi historia de vida, son muchas personas y en ellas las incluyo. Es difícil de escribir lo que siento por cada una, pero solo puedo decirles que con lágrimas en los ojos, les doy este trabajo el más caro que he pagado. Me costo 21 años de dedicación, de estudio, de esfuerzo y felicidad, de risas, lagrimas, tristezas, alegrías, tropiezos, caídas, heridas y huellas que me han dejado marcada para toda la vida, me ha costado la perdida de amistades, pero también he ganado mejores amigos, he perdido tiempo, he dejado momentos con mis seres queridos he dejado a lado mi vida para lograr lo que hoy soy, lo que hoy entrego "MI TESIS".

Antes que nada quiero agradecerle a dios por esta vida maravillosa y esta oportunidad de disfrutar lo mejor de mi existir; a mis ángeles hermosos que se han marchado en vida pero en alma siguen conmigo por siempre y para siempre: gracias a mis abuelitos "Chole" que su enseñanza, sus costumbres y su manera de ver la vida y enfrentarla es una mujer ejemplar y excepcional; "Don lucho" (el abuelo divertido) gracias por todas las aventuras y porque fuiste una persona que no necesito de nadie para salir adelante, al contrario diste un ejemplo de vivir en calidad de, porque contigo una grosería se sentía como el mas grande amor que nos dabas LOS KIERO MUXO!! Gracias a ambos por que con ustedes aprendi a que una familia es lo mejor. A mi tía María por su amor de madrina preferida A mis tía Socorro que existió para mi por su forma de ser, a mi primito Danielito dejaste a los mejores hermanos. Pero no se hubiese logrado este trabajo sin mi ángel de la guarda, el ángel mas adorado y mas extrañado y superior a cualquier cosa, el ángel que ayudo a mi madre y a mi a llegar al final de este camino, gracias PAPI por todo tu esfuerzo por ayudarme a dar los primeros pasos y porque en la vida sigues caminando junto a mi y nunca me dejaras y yo te AMARE POR SIEMPRE, recuerda que soñabas con este día, y aquí estamos juntos, como el primero, gracias por tus risas, por ser tan divertido, por cumplir todos mis caprichos, por siempre apoyarme, por siempre confiar en mi y por quererme de esa manera. En la vida sobran palabras y falta time.

En este párrafo quisiera escribir todo lo que es para mi este esfuerzo pero no terminaría jamás, así que primero quiero pararme sola a aplaudirle al ser humano mas hermoso q conozco, a la mujer que logro llegar a esta meta, esta personita es:

MI MAMI: la cual amo con todo mi ser, es la persona la que le debo la vida, el esfuerzo, las lagrimas, los sufrimientos, las risas, los desvelos, porque a los golpes duros los hizo mas suaves, porque en las caídas ella me levantaba, en los tropiezos ella me tomaba entre sus brazos y porque siempre estuvo conmigo a pesar de todo, siempre camino junto a mi, y es la primer cosa mas linda por lo que vale la pena vivir solo para conocerla, gracias por

acompañarme en este camino largo y duro, y aunque no tengo manera de agradecerle todo lo que ha hecho, solo puedo decirle q esto, mas que mi logro es tuyo es tu esfuerzo y aquí esta escrito solo por ti y para ti. Gracias por todo tu amor.

HERMANOS: Lo logramos! Carnales de sangre y amigos de mi vida, antes que nada gracias por estar con vos siempre, este fin llego, este objetivo lo cumplimos juntos, y aunque no se los diga siempre los he amado:

DAN: Querías ser el protagonista de esta tesis psss no jaja, eres uno de ellos, ocupas uno de los mejores. Hermano gracias por ser mi segundo padre, por formarme, por ayudar a crecer, por tomarme de la mano y llevarme siempre a lado tuyo, gracias por siempre tomarme en cuenta, gracias porque soy tu mano derecha en todo, porque dejaste tu vida a un lado por darme lo mejor y ahora lo lograste estas preparado para ser el mejor PAPA, gracias por todo, por tus regaños, por llevarme por buen camino, por tus risas, por tus duros golpes y tu enseñanzas, por tu amor. Te kiero muxo.

IVAN : Hermano, padre y amigo, persona que adoro y que siempre estará conmigo, y que soy orgullosa de ser el mejor hermano, el divertido, el que me enseño a no caer, a no dejarme, a salir sola como el lo hizo, y gracias a ti siempre llevo esta sonrisa en la cara siempre veo una mejor oportunidad, una ilusión por luchar mas por la vida, porque solo ha demostrado ocuparse de todo y de mi, nunca me dejaste, te kiero muxo.

LIZ: Hermana, amiga y cómplice de todas mis aventuras, gracias por existir eres un ser lindísimo, que nunca cae y que he compartido momentos increíbles que no dejaría por nada, risas, diversiones, fiestas. Eres una caja hermosa, y que me ha querido de una manera impresionante, y que siempre me vera como su hermanita y estara conmigo a pesar de todo, te kiero muxo.

Aquí incluyo a mi hermosos s angelitos que la vida me dio la oportunidad de agredecerles en vida, los mas sinceros y tiernos momentos, los de mis sobrinos, empezare por la primera que cayo en mis brazos mi sobrina Atala gracias por todo tu amor, tu amistad, tu diversión y por llegar a mi vida para sonreir; Diego eres el hombresito mas guapo, mas inteligente, y por que en tan pequeño tamaño me haz dado lecciones de vida y me haz ensenado a reír gracias por existir cosita hermosa, y mi ultimo angelito Tamara, quiero agradecerle lo mucho que me quiere y que gracias por que llego a la vida para demostrarme la humildad, el amor y compañerismo, gracias nenita por darme día con día una sonrisa.

Estas personas tienen el nombre de "cunaditas" pero la verdad se los cambio por hermanitas o así las considero yo, gracias Carmela por escucharme, por enseñarme a salir sola, por que eres la única persona que me defiendes, gracias por considerarme una amiga, por tu confianza y solidaridad. Lety gracias porque eres una mujer admirable, educada y amable, gracias por escucharme. Gracias a ambas por todas las pláticas siempre se aprende algo nuevo.

Gracias a todos ellos por las platicas hasta la madrugada, sin tener nocion del tiempo, por esos momentos juntos, por todo gracias.

Mi familia es tan amplia que si menciono a cada una seria una tesis de agradecimientos mas que de hongos, asi que si la familia es el nucleo de y el sosten de vivir, son las personas que siempre están conmigo apoyándome, alientandome, aplaudiéndome y gracias a ellos nunca estare sola.

Gracias a la familia Parra que siempre tiene un chiste para reir en todas las fiestas y un consejo, a mi tia TERAPIAS Gaby por que es una mujer que siempre te apoyara en todo, es la tia que nos entiende perfectamente y te dara un consejo y te abrirá los ojos, a mi tio Daniel por su amor y risas es el padrino favorito, a mis primos karla y Daniel admiraciond de todos por sus esfuerzos y por ser divertidos. Grecia es más que una amiga, más que una prima es una HERMANA, eres tan divertida de confianza, de admiración, es mi compañera y colega de vida. Te kiero muxo.

Gracias a la familia Ontiveros por su compañerismo en todo momento, sus platicas y enseñanzas, por quererme tanto, a Maris por ser amiga y TIA HOT por su apoyo moral y económico, a mi tio Matus por quererme tanto y ser puma de corazón gracias tio por estar con vos, a mis primos Uzziel y David por ser tan divertidos y siempre apoyarme.

Gracias a al familia Mondragon-Garcia principalmente a mi tío Patas porque sin su apoyo esta compu no serviría y porque su amor y consejos son marcados para importantes para mi, y a su familia por su amor y diversión, a mi tía Martha, Lalo, Mónica, Laura, Pepe, Jesús, Jazmín, Axel, Gemelas (Alinne y Sol) Donett.

Gracias a Mi tia Clara por sus consejos, su apoyo y amor, y a mi primo Ricardo y Liber que es una amiga incondicional, gracias por esas aventuras. Los kiero.

Gracias a mis Tia Pericuchis por todo su apoyo y cariño siempre, por su amor incondicional, a Josita por sus risas. Gracias a mis Primas Gutierrez que son una fuerza para mi, a Meche, Malu, Sandra y Aurora y Angy, Las kiero muxoo, a pesar de la distancia su apoyo y sus consejos son valiosos y reflejados en mi vida.

A mi familia paterna principalmente a mis abuelitos "Francisco y Concepcion" por sus bendiciones y sus enseñanzas, los quiero muxo. Mi tío Cuate por siempre esperarme con un tamalito, Mi tia Irene por su cariño y bendición para poder lograr esta meta.

Bueno estas dos cositas hermosas que mencionare dentro de mi familia (porque asi las considero), son parte fundamental y especiales de esta historia y solo porque las conoci en la universidad se volvieron mas que amigas:

NENA (Azalia): Ser extraordinario y sorpréndente que existe, agradezco tu existencia y después lo mucho que hiciste y haces por mi, gracias por que desde el primer instante fuiste mi mejor amiga y porque eres la que da un dulce sin recibir a cambio nada, por prestarme tu compu. (regalármela), por ser amiga de pedas, de sonrisas de lagrimas, de sufrimiento de salvación, de familia y de todo, hay que mas si eres lo mejor niña, gracias por ser mi gemela.

GRYSSYYY (Griselda): A ti te agradeceré la mejor amiga-amigo que tengo eres los dos, gracias por ese tamalito que inicio la amistad maravillosa, gracias a tus sarcasmos, gracias por las aventuras, sinceridad, compañerismo, fidelidad, y por ser mas linda, en todos los sentidos, gracias por siempre estar conmigo sin dejarme en ningún momento, por que eres una amiga inseparable.

FAYSS: A pesar de que llegaste al final de esta historia tienes la mas importante participacion por la cual te agradezco por que cambiaste mi mundo en un abrir y cerrar de ojos, la volviste felicidad y me ensenaste el valor del amor, humildad y a crecer porque con vos descubri lo mejor del mundo, lo mas hermoso del amor TU, porque desde que te conocí formamos una persona, eres una cosita hermosa que quiero conservar por toda la vida, que gracias a los hongos nos conocimos que fuiste una inspiración día con día para seguir adelante. Je t' aime bcp.

A mis amigos de la primaria-Secundaria: Sarai, Nanci, Susana, Urick y Hisascara. Gracias por que en tantos años sigue la amistad y su cariño, sus consejos, aventuras y hasta la fecha forman parte de mi formación para disfrutar este triunfo.

Los amigos CCHros que sus divesiones, viajes, fueron unas maravillosas personitas: Fron, Sandy, Norma, Martha, Yoce, Gaby, Claudia, y fosiles: Daniel, trapo, Chancla, Gnomo, Tapir por tus consejos y apoyo moral en cada momento, Asma por tu apoyo y hermandad siempre.

La Barda Química Paulina, Aurora, María, Jimena, Karla, Chucho, Pandita, Odín, David, Arismendi, Stimpy, Oscar, Mota, Rodas por que son los amigos inseparables de la universidad, por todas las pedas y diversiones; porque ustedes fueron el sosten de cada dia de la facultad, por que lo mas valioso es su amistad.

A mis Amigos de alimentos: Juan José y Pablo y el sarcástico por sus diversiones y porque son hermosas personas..A mis amigos Carlitos y Super, gracias por ser la mejor compañía durante mi estancia en la universidad, y por compartir conmigo momentos increíbles y gracias por ser el secretito, por ser tan frío y lindo a la vez que me ayudaron a crecer.

Profesor Misael: Esta pasión fungí que tengo, en gran parte se la debo a usted por confiar en mi y ser la primera persona que me abrió las puertas, los brazos y su amistad, porque usted es mi sensei, el cual admiro y veo con respeto por su gran capacidad de ver las cosas con una

sonrisa y por su amabilidad. Si a un profesor tengo q agradecer en parte se lo debo a usted por la manera que ve la vida y porque es la persona que ayuda a todos sin ver atrás y salva vidas, yo le doy honores por ser único y especial y mas porque fue la primera persona que creyó en mi desde el principio, desde que lo conocí hasta estos momentos por darme siempre ánimos por enseñarme, por ser el mejor profesor, uno de los mejores amigos que vale la pena conservar simplemente por su sonrisa y porque siempre llevare conmigo la frase de « El ciencia se comparte » conocimiento que usted me brindo y amistad que perdura por toda la vida, gracias por todo.

Dra. Haydee : Hay tantas cosas que agradecerle, que no existe manera alguna de pagarle, la principal es aceptarme en su laboratorio a pesar de ser Q'A y empezar desde ceros, con vos aprendí a muchas cosas, gracias por compartir sus conocimientos, por que gracias a usted aprendí ingles y pase mi examen, gracias por enseñarme a ser mejor en el estudio, por ser mi profesora, mi doctora, mi tutora, mi compañera de laboratorio y mi amiga de vida por aquellas platicas interesantes, por confiar en mi, y por compartir su alegría y logros profesionales, pero sobre tdo agradezco por que es la primera persona que me ayudo en mi carrera y estudios económicamente y científicamente, y que siempre me apoyo en todo apesar de la mala alumna que soy, siempre confió en mi y gracias a usted tengo un diplomado, este éxito de trabajo y también gracias a usted conocí el amor y aprendí a trabajar y estar sola, es decir, a ser una investigadora. Porque gracias a usted tuve mi primer aguinaldo y recibi quincenalmente dinero y unos dulces y una sonirsa de usted un apoyo y por comprender todo los obstáculos, a pesar de todo nunca me abandono, me formo y crecí gracias porque usted es igual que yo la autora de este éxito de trabajo.

He aprendido que el éxito no se mide por la posición que alguien ha alcanzado en la vida, sino por la magnitud de los obstáculos que he tenido que superar para obtener el éxito.

ÌNDICE

Páginas

ABREVIATURAS I

UNIDADES INTERNACIONALES II

LISTA DE TABLAS III

LISTA DE GRAFICAS IV

LISTA DE FIGURAS V

PARTE 1. RESUMEN 1

PARTE 2. INTRODUCCION 2
Candidosis 2
Predisposición del hospedero 5
Factores de virulencia del genero *Candida* 6
Epidemiologia 7
Identificación de microorganismos 12
a) Fenotípicos 12
b) Genotípicos 13
Genoma de organismos eucariontes 13
Genes ribosomales 14
Microsatélites 16
Características de los genomas del genero *Candida* 19

PARTE 3. OBJETIVOS 22
General 22
Específicos 22

PARTE 4. METODOLOGIA 23
Identificación de especies de *Candida* 24
Fenotipificaciòn de los aislamientos 24
Examen Directo (ED) y Tinción de Gram 24
Cultivos 24
Medios no selectivos 24
Medios selectivos 25
Pruebas Biológicas 25
Producción de clamidoconidias 25
Formación de tubo germinativo 26

Pruebas Bioquímicas “Auxonograma” 26
API- Yeast-20C 26
Auxacolor ™ 2 27
Identificación genética 28
Extracción de ADN 28
Amplificación PCR-RFLP 29
Digestión del ADN amplificado con la enzima Msp 1 (Hpa II) 31
Amplificación (PCR) del microsatélite CAI especifico de *C. albicans* 31

PARTE 5. RESULTADOS 33
1. Identificación de diferentes infecciones micoticas. 33
a) Fenotípicos: 35
Formas Patognómicas 37
Pruebas Bioquímicas 38
CHROMagar 40
b) Genético 41
Extracción de ADN 41
PCR-RFLP 42
2. Variabilidad Genética de *C. albicans* 44
Especies identificadas 48

PARTE 6. DISCUSION 49

PARTE 7. CONCLUSIONES 54

PARTE 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 55

PARTE 9. APENDICE 63

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNr	Acido desoxirribonucleico ribosomal
ADS	Agar dextrosa de sabouraud
ARN	Acido ribonucleico
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
ßMeEtOH	ßeta-mercapto-etanol
BrEt	Bromuro de etidio
Candida sp.	*Candida especie*
C. albicans	*Candida albicans*
C. tropicales	*Candida tropicalis*
C. glabrata	*Candida glabrata*
C. parapsilosis	*Candida parapsilosis*
DIU	Dispositivo intrauterino
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatados
EDTA	Acido etilen diamina tetra acético
EtOH	Etanol
ETS	Espaciador externo transcrito
Fig.	Figura
HCl	Acido clorhídrico
HJM	Hospital Juárez de México
H_2O	Agua
ITS 1-2	Espaciador interno transcrito
ITS-1F	Primer`s forward (5` $\longrightarrow$ 3`)
ITS-4R	Primer`s reverse (3` $\longrightarrow$ 5`)
MgCl	Cloruro de magnesio
Msp 1	Enzima (endonucleasa) de *Moxarella sp.*
NaCl	Cloruro de sodio
N_2	Nitrógeno
No.	Número
OPD-SSa	Organismo público descentralizado - Secretaria de salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
PM	Peso molecular
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RNAsa	Enzima (nucleasa)
SNC	Sistema nervioso central
Taq-Pol	ADN polimerasa
TE	Tris-EDTA
Tm	Temperatura de alineamiento
UV	Ultra violeta
Vol.	Volumen
YEPD	Extracto de levadura papa dextrosa

UNIDADES INTERNACIONALES DE MEDIDAS

º C	grados centígrados
h	horas
Kb	Kilopares de bases
M	Molar
μl	microlitros
μg	microgramos
μM	micromoles
min	minutos
mg	miligramos
ml	mililitros
mM	milimolar
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
T amb.	Temperatura ambiente
V	Volt's

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título de la Tabla	Página
Tabla 1	Taxonomía del género *Candida*	3
Tabla 2	Variedades clínicas de candidosis	4
Tabla 3	Distribución geográfica de especies de candidosis invasiva.	8
Tabla 4	Diferentes micosis dentro del Hospital Juárez de México, de enero del 2009 a mayo del 2010.	10
Tabla 5	Registro de los pacientes en el protocolo del Hospital Juárez de México.	12
Tabla 6	Características del genoma de las especies de *Candida*.	20
Tabla 7	Mezcla de reacción para PCR –RFLP	30
Tabla 8	Secuencia de los cebadores ITS1-F e ITS4-R	30
Tabla 9	Mezcla de reacción para la digestión con Msp 1.	31
Tabla 10	Mezcla de reacción para PCR con microsatélites.	32
Tabla 11	Secuencia de los cebadores CAI-F y CAI-R	32
Tabla 12	Asimilación de carbohidratos de las diferentes especies de *Candida*.	38
Tabla 13	Tamaño de los productos de ITS1-ITS4 de especies de *Candida* antes y después de la digestión con Msp 1.	43
Tabla 14	Asignación de numero de los diferentes alelos de *C. albicans*	45
Tabla 15	Frecuencia de genotipos identificados por amplificación de microsatélites de las cepas homocigotas	46
Tabla 16	Frecuencia de genotipos identificados por amplificación de microsatélites de las cepas heterocigotas.	46
Tabla 17	Diferentes pacientes con el mismo genotipo.	47
Tabla 18	Frecuencia de especies del género *Candida* identificadas en el HJM.	48

LISTA DE GRAFICAS

Grafica	Título de la Grafica	Página
Grafica 1	Casos de candidosis urogenital en la población general de México en el año 2008.	9
Grafica 2	Cuantificación de candidosis u otras infecciones micoticas que se analizan en el Hospital Juárez de México, durante el periodo de enero del 2009 a mayo del 2010.	11
Grafica 3	Número de casos con candidosis que presentan los pacientes en el Hospital Juárez de México.	33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título de la figura	Página
Fig. 1	Frecuencia de candidosis por Entidad Federativa de México en 2008.	10
Fig. 2	Constitución del ADN eucariótico.	14
Fig. 3	Gen ribosomal de eucariotes.	15
Fig. 4	Microsatélites generados por deleción o por adición.	18
Fig. 5	Reparación de mutaciones causadas por desprendimiento del complejo de replicación. A) fijación de la mutación B) reparación	18
Fig. 6	Fases: diploide y haploide: *C. albicans (A)* y *C. glabrata (B).*	19
Fig. 7	Diagrama de flujo de la metodología.	23
Fig. 8	Prueba API YEAST 20C	27
Fig. 9	Hola de resultados de API YEAST 20C	27
Fig.10.	Prueba bioquímica Auxacolor ™ 2.	28
Fig. 11	Condiciones de incubación de la mezcla de reacción de PCR-RFLP.	30
Fig. 12	Condiciones de PCR utilizando los microsatélites específicos de C. *albicans.*	32
Fig. 13	Tres manifestaciones clínicas diferentes de candidosis oral.	35
Fig. 14	Análisis morfológico de las cuatro especies de *Candida* tipificadas por métodos fenotípicos	36
Fig. 15	Blastoconidios pequeños de *Candida glabrata*	37
Fig. 16	Pseudohifas (izquierda) más blastocodios(derecha) de *C. albicans*	37
Fig. 17	Imágenes representativas de falsos positivos para tubo germinativo.	39
Fig. 18	Identificación de especies en CHROMagar ™ *Candida*.	40
Fig. 19	Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1%.	42
Fig. 20	Gel de Agarosa al 2%. A) Productos de PCR de 4 especies de *Candida* y B) Productos de restricción Msp 1.	43
Fig. 21	Imagen representativa de la amplificación de locus CAI homocigotos.	44
Fig. 22	Amplificación de locus CAI heterocigotos.	45

PARTE 1. RESUMEN

La candidosis es la micosis oportunista más frecuente de los seres humanos; puede presentarse por múltiples factores predisponentes principalmente en personas inmunosuprimidas. Es producida por hongos levaduriformes del género *Candida* predominando *Candida albicans* (aproximadamente 80%).

Se analizaron 76 aislamientos clínicos con diagnostico de candidosis de pacientes internados en el Hospital Juárez de México en el periodo de julio del 2009 a mayo del 2010. Por métodos fenotípicos se identificaron 56 asilamientos como *Candida sp*. Uno de estos aislamientos presentó un fenotipo complejo y al crecerlo en CHROMagar ™*Candida* se observó la mezcla de tres especies provenientes de un mismo paciente. La identificación molecular se realizo utilizando la amplificación de regiones variables del ADN ribosomal y la digestión del ADN amplificado con la enzima de restricción Msp 1 (PCR-RFLP), que permitió identificar eficazmente a las diferentes especies; la más frecuente fue *C. albicans* (80.3 %), seguida de *C.tropicales* (8.9%), *C. glabrata* (5.4%) y *C. parapsilosis* (5.4%). Se analizó la variabilidad genética entre los aislamientos de *Candida albicans* utilizando la amplificación de un microsatélite ampliamente estudiado CAI (CAA). En el análisis de microsatélites de este grupo de levaduriformes "*C. albicans",* se identificaron 11 alelos diferentes que combinados forman 18 genotipos. De 45 aislamientos 16 son homocigotos (28%) y 29 son heterocigotos (72%); la presencia del mismo genotipo en diferentes aislamientos sugiere que hubo infección intrahospitalaria entre algunos de los pacientes. Sin embargo se podrá concluir después de secuenciar y comparar entre los diferentes microsatélites.

PARTE 2. INTRODUCCION

Candidosis

Es una micosis causada por especies del género *Candida*. Estas especies son parte de la microbiota normal, habitan en la piel, las mucosas, el tracto respiratorio alto, tracto genitourinario y el tracto digestivo; por lo que una de las fuentes de infección es endógena (infección que se origina o nace dentro del cuerpo), aunque también hay factores exógenos (causas exteriores al organismo que provocan la infeccion) que la producen. Son la causa mas común de infecciones fúngicas, produce enfermedades mucocutáneas hasta infecciones invasivas que pueden ser fatales. Se presenta más frecuentemente en pacientes inmunocomprometidos con desórdenes hematológicos, enfermedades gastrointestinales, quemaduras o enfermedades terminales (Wey. et al., 1989; Richards et al., 1999; Richards et al., 2000).

Los hospitales son la fuente de candidosis exógena más frecuente en pacientes internados y está asociado a la utilización de dispositivos médicos como catéteres vasculares, diálisis o hemodiálisis, generando infecciones sistémicas que involucran al tracto urinario y el torrente sanguíneo. Estos factores sumados a la condición médica pone en riesgo la vida del paciente (Kojic y Darouiche, 2004).

Existen aproximadamente 200 especies del género *Candida*, clasificadas actualmente en la taxonomía de la familia *Saccharomycetes,* (Tabla 1). De estas especies, una docena son de interés medico, de las cuales 6 u 8 especies son las que se presentan mas frecuentemente en humanos.

Tabla 1. Taxonomía del genero *Candida* (**Scannell et al., 2007; Clement et al., 2008)**

Dominio	***Eukarya***
Reino	***Fungi***
Phylum	***Ascomycota***
Clase	***Ascomycetes***
Subclase	***Hemyascomycetes***
Orden	***Saccharomycetales***
Familia	***Saccharomycetes***
Genero	***Candida***
Especies	***C. albicans, C. glabrata,*** ***C. tropicalis, C. parapsilosis.*** ***C. dubliniensis, C. kefyr, C.krusei,*** ***C.guillermondii.***

Las especies patógenas del género *Candida* son: *C. albicans, C. glabrata, C.tropicalis, C.parapsilosis, C. dubliniensis, C. kefyr, C. krusei, C. guillermondii, C.lusitaniae y C.famata,* siendo la más común *Candida albicans* que a diferencia de las otras especies son patógenos emergentes que pueden colonizar superficies mucocutáneas aunque a baja frecuencia (Sobel et al., 2006). Estas especies que se han identificado, pueden producir diferentes formas clínicas de candidosis, las cuales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Variedades clínicas de candidosis (López. y cols., 2006; López y cols., 2009; Bonifaz, 2010;).

Candidosis	Tipo clínico	Signos y síntomas
Mucocutánea	Oral Genital Mucocutánea crónica Gastrointestinal Bronquial/pulmonar	Placa blanquecina, adherente, membranosa, de bordes difusos con base eritematosa. Dolor y a veces prurito.
Cutánea	Intertrigos Onicomicosis (perionixis, onicolisis, onixis) Del área del pañal Pustulosis Granulomatosa	Descamación, pústulas, pápulas. Uñas engrosadas con estrías transversales, despigmentación. Dolor, inflamación, edema y exudado, prurito y ardor.
Sistémica	Tracto urinario Meningitis Endocarditis Candidemia (fungemia)	Fiebre, dolor y mal estado general; disuria, hematuria, sensación de quemadura, prurito, con descargas mucoides.
Miscelánea	Otitis (otomicosis) Ulceras corneales (oculomicosis) Endoftalmitis	Lesiones blancas, algodonosas. Dolor, visión borrosa.
Alérgica	Candidides (ides) Eccema Rinitis, alveolitis y asma	Lesiones estériles, vesiculosas, eritematosas descamativas. Inflamación, prurito

Las variedades clínicas son diferentes por la zona que afecta al organismo; pero se requiere tanto de las condiciones del hospedero (paciente) como del microorganismo para que se establezca la enfermedad; por lo que la patogénesis de *Candida sp* en el ser humano es muy compleja. A continuación se mencionan algunos factores del hospedero y del microorganismo (*Candida*) que se requieren para producir la micosis.

Predisposición del hospedero:

1. Enfermedades: diabetes, obesidad, tuberculosis, hepatitis.
2. Proceso debilitantes como: embarazo, senectud y desnutrición.
3. Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodkin, sarcomas, Síndrome de Di´George, VIH-SIDA.
4. Iatrogénicos: tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro debido a que disminuyen la biota bacteriana. Corticoesteroides y citotóxicos (quimioterapia), anticonceptivos, dispositivos intrauterinos (DIU).
5. Trasplantes: principalmente renales, hepáticos, de corazón y medula ósea debido al uso de inmunosupresores para evitar el rechazo de órgano trasplantado.
6. Cateterismo y nutrición parenteral: Introducción de microorganismo por diversos fluidos y formación de capas de microorganismos (microfilm).
7. Misceláneos: dermatitis de contacto y de pañal, dentaduras en mal estado y mal adaptadas, traumatismo ungueal, propios del clima y ocupación.

Factores de virulencia de *Candida*

La gran mayoría de los factores de virulencia de los hongos se han desarrollado naturalmente durante la evolución del organismo y actúan como mecanismo de defensa a condiciones adversas del ambiente por lo que muchos de ellos facilitan la infección en el hospedero. La candidosis puede ocurrir debido a la alteración en el equilibrio entre la inmunidad del hospedero y estos patógenos oportunistas; sin embargo esta infección no solo se debe a un problema inmunológico del paciente también depende de la habilidad de los hongos para adaptarse a diferentes nichos dependiendo de la expresión de genes asociados a la infección o genes de virulencia (Brown et al., 2007).

Estos genes y sus productos contribuyen a la patogenia del hongo. Dentro del género *Candida* se incluyen:

1. Producción de enzimas hidrolíticas y adhesinas: (por ejemplo: Als1p, Ala1p) que se han descrito en *C. albicans ,C. glabrata, C. tropicalis, C.guilliermondii y C. parapsilosis* (Chaffin et al., 1998; Rupinder et al., 2005; Arancia et al., 2009; Portela et al., 2010).
2. Capacidad para formar biopeliculas (biofilms); es la agregación de microorganismos fuertemente adheridos a una superficie y mantenidos por sustancias poliméricas secretadas por las mismas levaduras: *C. albicans, C.glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis y C. pseudotropicalis* (Hawser y Douglas, 1994; Mohammed et al., 2004; Quindós y cols.,2009; Silva et al., 2009; Castrillón y cols., 2010).

3. Cambiar su morfología celular dependiendo de las características del sitio de infección (dimorfismo): *C. albicans* (Mitchell, 1998; Hornby et al., 2001).
4. Cambio espontáneo a alta frecuencia de fenotipos coloniales (switch), lo que implica cambio de formas celulares y antígenos de superficie: *C. albicans, C.glabrata, C. parapsilosis* (Laffey et al., 2005; Castaño et al., 2006; Georgy et al, 2009; Karkowska et al., 2009).

Epidemiología de candidosis

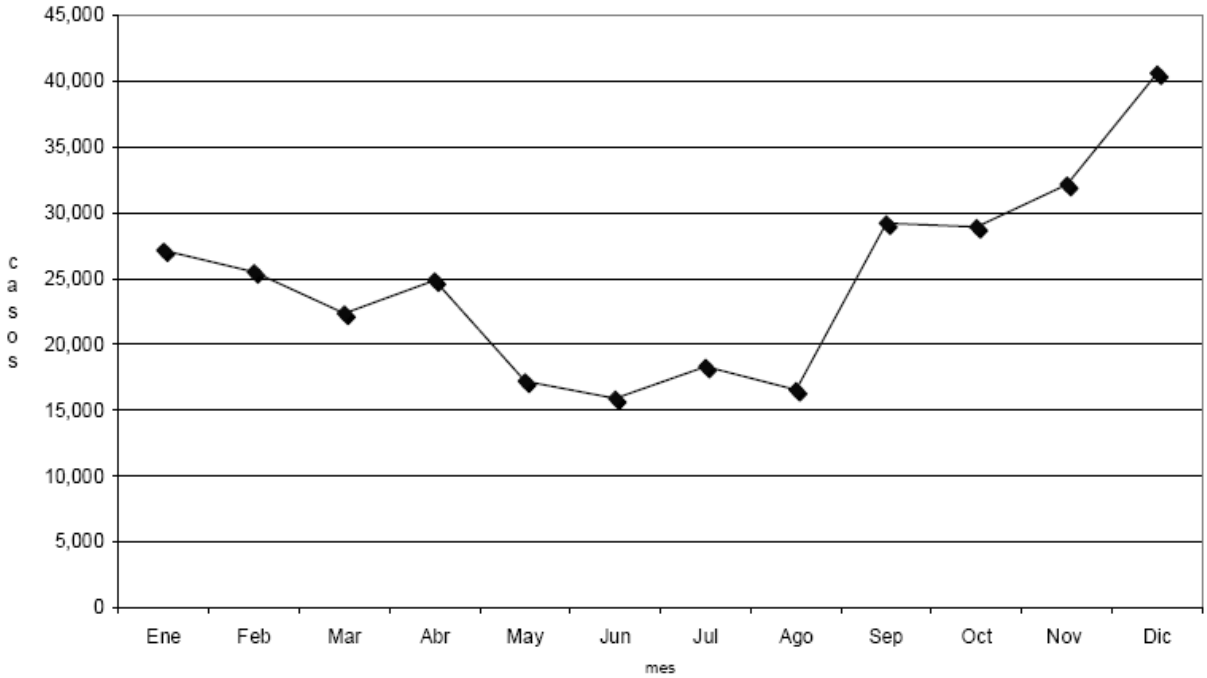
En los últimos 20 años la candidosis ha incrementado de forma importante a nivel hospitalario (López y cols., 2009) se ha observado un aumento progresivo de especies de *Candida* no *albicans* como generadoras de la infección (Fitzpatrick, 2006). Estas levaduras son la cuarta causa de las infecciones sanguíneas, en los Estados Unidos de América se ha calculado que las candidemias son del 2-3.8% de las infecciones por cada 1000 pacientes hospitalizados. En Brasil, es de 2.49 casos por 1000 admisiones hospitalarias. Otros de los hechos establecidos, es la morbilidad del 26 al 57% en los pacientes sometidos a transplantes de órganos y que presentan candidemias.

Los estudios epidemiológicos de candidosis en diferentes países, muestran el aumento de las especies de *Candida no albicans;* las cuales varían en su distribución geográfica: en América del Norte (EUA y Canadá) va en incremento *C.glabrata* mientras que en Latinoamérica (de México al sur de América) los aislamientos de *C. parapsilosis y C.tropicalis* son los más frecuentes (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución geográfica de especies de Candidosis invasiva (Colombo et al., 2003).

Región	Numero de pacientes	*C. albicans*	*C. glabrata*	*C. parapsuilosis*	*C. tropicalis*	*C. krusei*	Otras multiples espcies
USA/ Canada	71	35 (49%)	13(18%)	8(11%)	10(14%)	1(1%)	**4(6%)**
Latin America	73	27 (37%)	2(3%)	22(30%)	18(25%)	1(1%)	**3(4%)**
Europa/Russia	51	25 (49%)	4(8%)	9(18%)	4(8%)	3(6%)	**6(12%)**
Asia/Austrialis	15	8(53%)	2(27%)	1(7%)	2(14%)	0(0%)	**0(0%)**
Total	**210**	**95 (45%)**	**23 (11%)**	**40(19%)**	**34(16%)**	**5 (2%)**	**13 (6%)**

Mientras que en México no se ha reportado algún estudio sistemático general de esta infección; los reportes que se han publicado son específicamente de candidosis urogenital que es considerada como una infección exógena (de transmisión sexual) responsable de vulvovaginitis, y se encuentra dentro de las 20 principales causas de morbilidad (cantidad de personas o individuos considerados enfermos o víctimas de enfermedad en un espacio y tiempo determinados). El estudio epidemiológico mas reciente de casos identificados como candidosis urogenital fue realizado en México del 2008 (Grafica 1). En este estudio se observó el incremento de esta micosis; en septiembre se presentaron 29211 casos y en diciembre 40597 casos.



Grafica 1. Casos de candidosis urogenital en la población general de México en el año 2008, publicado en SUIVE, Secretaria de Salud, 2009.

Las estadísticas en las entidades federativas de esta infección, mostraron que el mayor número de casos lo presentaron (en orden descendiente): Tabasco, Veracruz; Oaxaca, Zacatecas y Chiapas (estados de color rojo-Fig. 1); mientras que las entidades federativas con menores casos fueron: Baja California; Coahuila; Chihuahua; Nuevo León y Distrito Federal (estados de color verde-Fig.1); los estados con casos intermedios se muestran de color amarillo (Fig. 1).

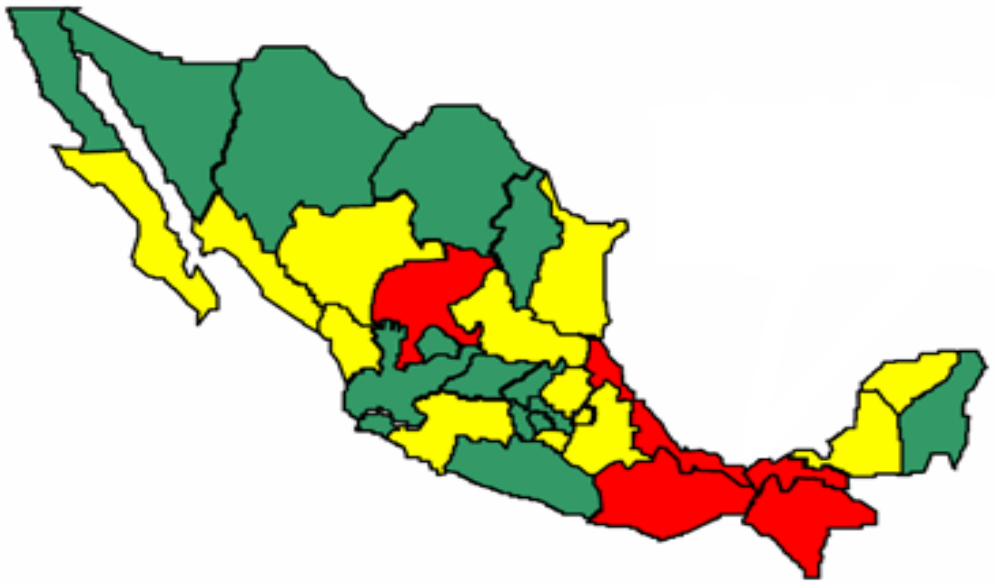


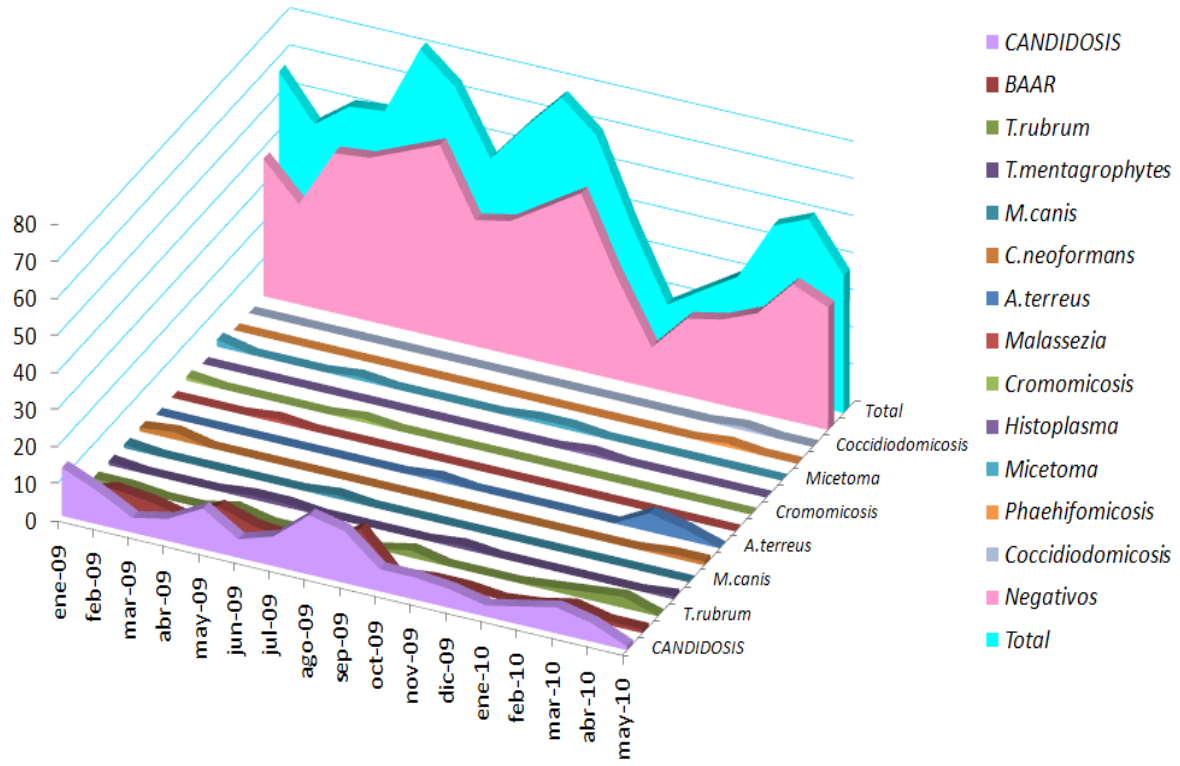
Figura. 1. Frecuencia de candidosis por Entidad Federativa de México en 2008. (SUIVE, 2009)

Por lo que se realizo un estudio de candidosis en el laboratorio de Inmunoalergologia y micología médica del HJM, donde se reciben diferentes muestras de diversas infecciones micóticas, de las cuales candidosis es la micosis mayoritaria (Tabla 4).

Tabla 4. Diferentes micosis dentro del Hospital Juárez de México, de enero del 2009 a mayo del 2010.

	ene-09	feb-09	mar-09	abr-09	may-09	jun-09	jul-09	ago-09	sep-09	oct-09	nov-09	dic-09	ene-10	feb-10	mar-10	abr-10	may-10
CANDIDOSIS	13	9	4	6	11	5	8	16	14	6	6	5	3	5	7	5	1
BAAR	2	5	4	2	7	4	3	4	10	0	1	1	0	1	3	1	1
T.rubrum	1	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2	3	0
T.mentagrophytes	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M.canis	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.neoformans	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
A.terreus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	3	0
Malassezia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cromomicosis	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Histoplasma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Micetoma	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Phaehifomicosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Coccidiodomicosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Negativos	37	27	43	44	48	52	34	36	42	48	28	11	21	23	27	37	33
Total	56	44	51	52	71	63	46	57	67	59	37	18	24	30	46	50	37

Aunque el índice de muestras negativas (color rosa-Tabla 4) es superior a las diversas micosis, debido al diagnóstico mal interpretado por parte del personal responsable; sin embargo la candidosis es la mas frecuente de las infecciones (Grafica 2).



Grafica 2. Cuantificación de candidosis u otras infecciones micoticas que se analizan en el Hospital Juárez de México, durante el periodo de enero 2009 a mayo 2010.

En este trabajo del HJM, se estudiaron las muestras de candidosis desde la identificación fenotípica primaria (síntomas, signos y examen directo) hasta lo epidemiológico (variabilidad genética de *C. albicans),* esto es para tener un conocimiento amplio de la micosis; tomando en cuenta que todas las muestras fueron previamente diagnosticadas por el medico general como sospecha de candidosis e inmediatamente fue entregada al químico a cargo del laboratorio; el

cual es el responsable de registrar al paciente en el protocolo del laboratorio (Tabla 5) para llevar una organización y una estadística de cada paciente.

Tabla 5. Registro de los pacientes en el protocolo del Hospital Juárez de México.

Mtra.	NOMBRE	EXPEDIENTE	TIPO Y FECHA	EDAD (años)	ESPECIALIDAD Y PROCEDENCIA	DIAGNOSTICO
348-09	----------	781724	Esputo 13-07-09	14	Estudiante/ D.F.	Infección por VIH
355-09	----------	460798	Esputo 16-07-09	70	Hogar/Toluca Edo. De Mexico	Derrame Pleural+ NAC+ P.b. Actinomia
366-09	----------	785502	Esputo 27-07-09	29	Chofer/ D.F.	NAC +
397-09	----------	788047	Esputo 12-08-09	58	Empleado de tortillería/ D.F.	Neumonía

La candidosis es un problema de salud por lo que es importante la identificación rápida del patógeno en etapas tempranas de la infección y con métodos confiables para establecer el tratamiento farmacológico correcto (Leaw et al., 2006).

Identificación de *Candida*

La identificación de microorganismos del género *Candida* se realiza actualmente por dos métodos:

a) Fenotípicos: basados en la caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica. Estos métodos habituales se manejan en los hospitales como cultivos, pruebas bioquímicas, entre otros; consumen un mínimo de 48h para tener el resultado. Con

estas pruebas en ocasiones las observaciones son confusas porque puede haber mezclas de las características de las diferentes especies de *Candida*. Este problema se presenta porque dependen de la expresión de un carácter fenotípico (resultado de la interacción de genotipo con el ambiente). El fenotipo varía de forma importante dependiendo de las condiciones de crecimiento *in vitro*; esto genera una mala identificación de la especie.

b) Genotípicos: basados en el estudio de características genéticas. Esta alternativa es rápida, sensible y con un alto poder de discriminación. Los métodos moleculares que se utilizan en la identificación entre -especies o entre aislamientos de la misma especie se basan en la amplificación del ADN con cebadores específicos. Para poder realizar estas pruebas debe haber conocimiento previo de las características del genoma del organismo en estudio. En el caso del género *Candida* varias de las especies han sido estudiadas genética y molecularmente lo que nos permite aplicar estas técnicas en la identificación de aislamientos del Hospital Juárez de México (HJM).

Para entender el enfoque genotípico es necesario describir como se encuentra organizado el genoma de los eucariotes e identificar las secuencias importantes para la tipificación de cualquier organismo vivo.

Genoma de organismos eucariontes:

El genoma de un organismo consiste en el total de ADN contenido en el núcleo de las células eucariotas. El ADN es el sustrato de la evolución debido a que muta espontáneamente, estas mutaciones son las responsables de la variabilidad

genética en las poblaciones de organismos. El genoma esta constituido por diferentes tipos de secuencias: genes estructurales, secuencias repetidas, satélites microsatélites como se muestra en la siguiente figura (Fig. 2).

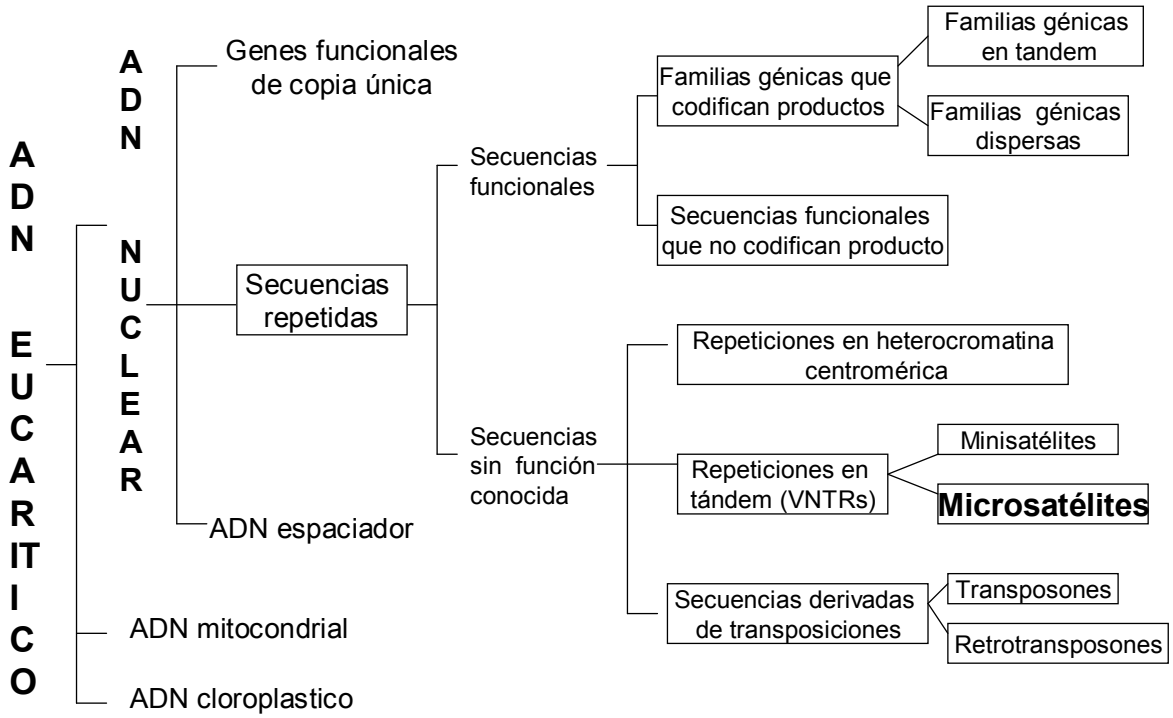


Figura 2. Constitución del ADN eucariótico. Tomado de la pagina: http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromoeuc/cromoeuc.htm

Para la identificación molecular entre-especies del mismo género se han utilizado las secuencias intergenicas (ITS) que se encuentran en los loci de los genes ribosomales (ADNr) y para establecer relaciones filogenéticas entre aislamientos de la misma especie se utilizan secuencias de microsatélites.

Genes ribosomales

Los genes de ARNr son transcritos por la ARN polimerasa; como la mayoría de los genes están constituidos en dirección 5`a 3` por un promotor, secuencias génicas

(18S, 28S y 5.8S), regiones conocidas como ADN espaciador entre las secuencias génicas (varían en longitud y secuencia entre las especies) y un terminador (Mirhendi et al., 2006). Cada gen ribosomal produce un precursor de ARN que tiene un coeficiente de sedimentación 45S, este fragmento contiene las secuencias de los ARNr 18S, 5.8S y 28S asociados a los ITS y al ETS (región en el extremo 5´). Antes de salir del núcleo este ARNr es procesado por la RNAsa 3 y la RNAsa P, dejando libres las secuencias 18S, 28S y 5.8 S que forman al ribosoma. Las ITS-1 e ITS-2 y la ETS (espaciador externo transcrito) son degradadas (Fig. 3).

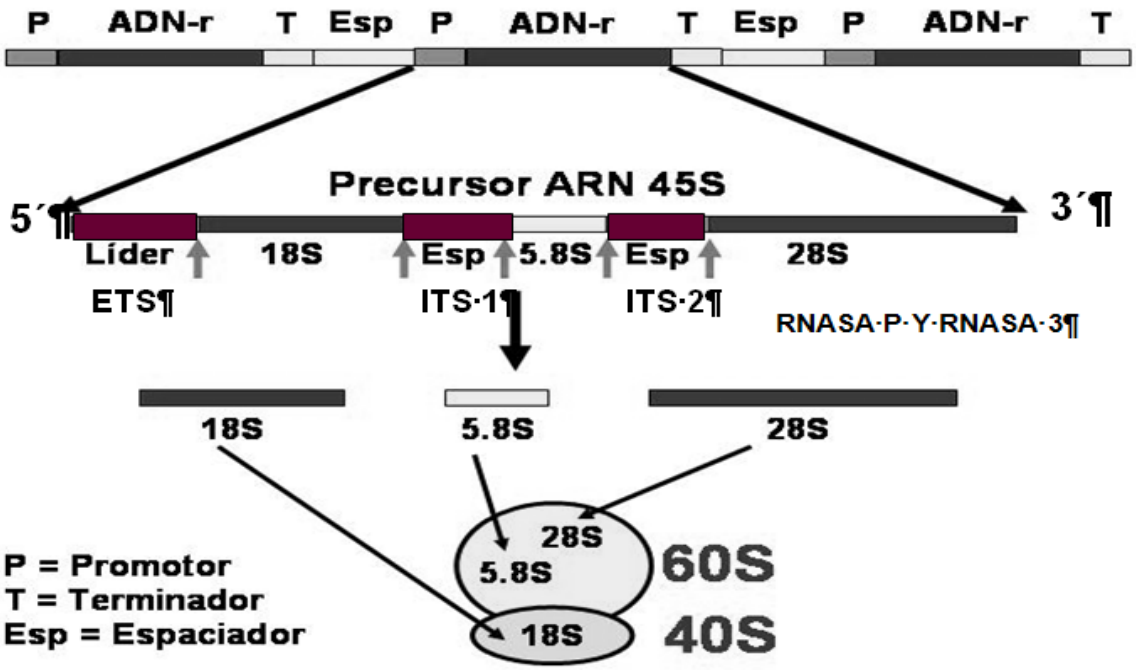


Figura 3. Gen ribosomal de eucariotes

Estas secuencias intergénicas (ITS 1 e ITS 2) tienen una mayor frecuencia de mutación que los genes que están bajo presión de selección y han sido una herramienta importante en la identificación de diferentes especies dentro de un mismo género, lo cual ha permitido medir la distancia evolutiva. Esta se obtiene al comparar los cambios ocurridos en las secuencias del ADN de los diferentes

organismos en el transcurso de su historia evolutiva. Este análisis se ha utilizado para clasificar a los seres vivos, sin embargo no permite identificar las diferencias entre organismos de la misma especie. Para esto, se utiliza el análisis de secuencias de ADN que se modifican con frecuencia muy alta en tiempos cortos. Estas secuencias generalmente no están bajo presión de selección ya que no codifican para un producto funcional. Las más utilizadas son las secuencias llamadas microsatélites.

Microsatélites

Son secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos que se repiten consecutivamente 10 o más veces. Los microsatélites también son conocidos como SSRs (por sus siglas en ingles "Simple Sequence Repeats"), estas secuencias son altamente polimórficas, muy abundantes y están distribuidas por todo el genoma. Son de herencia codominante, estas secuencias permiten identificar las células homocigotas (células diploides que contienen el mismo alelo) y heterocigotas (células diploides con dos alelos diferentes). Por estas características los microsatélites son utilizados como marcadores genéticos para identificar individuos que vienen de la misma población. La mayoría de los microsatélites se encuentran en regiones no codificantes del ADN; sin embargo, un microsatélite puede interrumpir los procesos normales de la célula si crece demasiado, como en el caso de la enfermedad de Huntington o en el síndrome frágil X que afecta a los humanos (Fu et al., 1991; Sinden, 1999; Verkerk et al., 1991; Sinden et al., 2002; Ellegren, 2004; Sampaio. et al, 2005; Yu et al., 1991).

Su naturaleza polimórfica (polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, diferentes alelos de un mismo gen) ha hecho de los microsatélites una herramienta útil en el mapeo genético, en el estudio de la inestabilidad genética en cáncer, en genética de poblaciones, medicina forense y en la tipificación de microorganismos en infecciones adquiridas durante la hospitalización de pacientes (Ellegren H. et al., 2004; Sampaio et al, 2007; Barada et al., 2008).

La mutación de los microsatélites se ve reflejada en las diferencias de tamaño de las secuencias repetidas. Estas diferencias pueden generarse por deleción (perdida de un fragmento de la secuencia de ADN) o por inserción (es la adición de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN) (Fig. 4). El mecanismo más frecuente para la generación de estas mutaciones es durante la replicación del ADN en la cadena discontinua donde la ADN polimerasa III se resbala y el complejo de replicación se separa momentáneamente del ADN. La cadena naciente de ADN se realinea y se forma una estructura secundaria en forma de asa, la replicación continúa fuera de fase, provocando la inserción o deleción de la unidad de repetición. La mayoría de estos errores son reparados por el sistema de reajuste, sin embargo una pequeña proporción de las mutaciones no son reparadas o corregidas, esto genera que se establezca la mutación del microsatélite (Fig. 5). Por lo que la frecuencia de mutación de los microsatélites es entre 10^{-2} y 10^{-5} por cada división celular (Palsboll, P.J., 1999.). Esta herramienta es muy útil en el estudio de organismos genéticamente relacionados (Jarne y Lagoda, 1996).

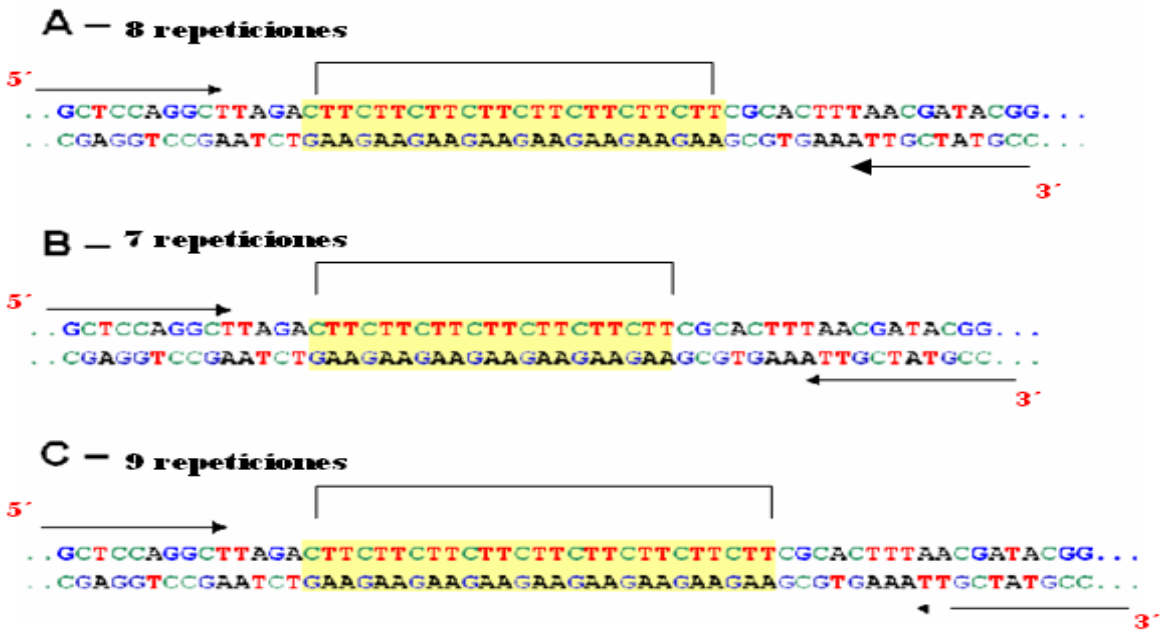


Figura 4. Microsatélites generados por deleción o por adición

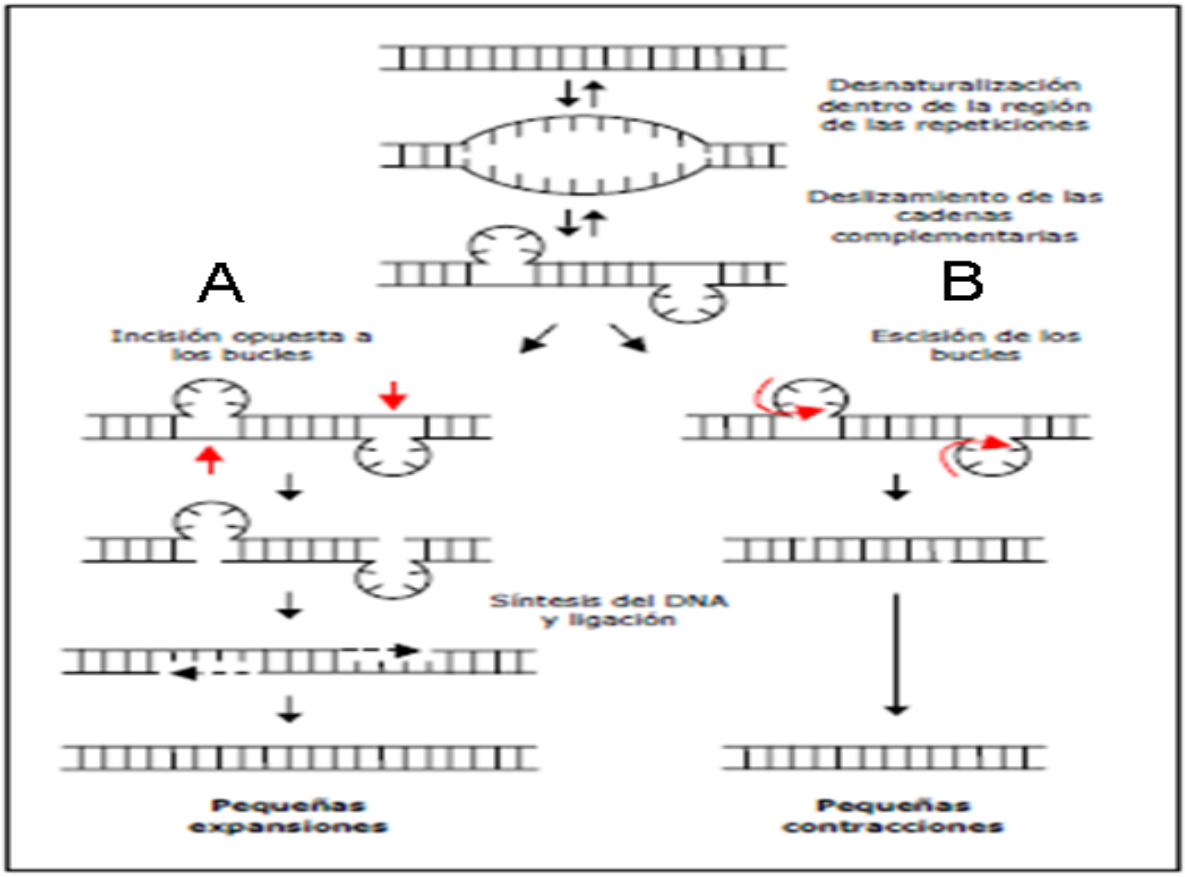
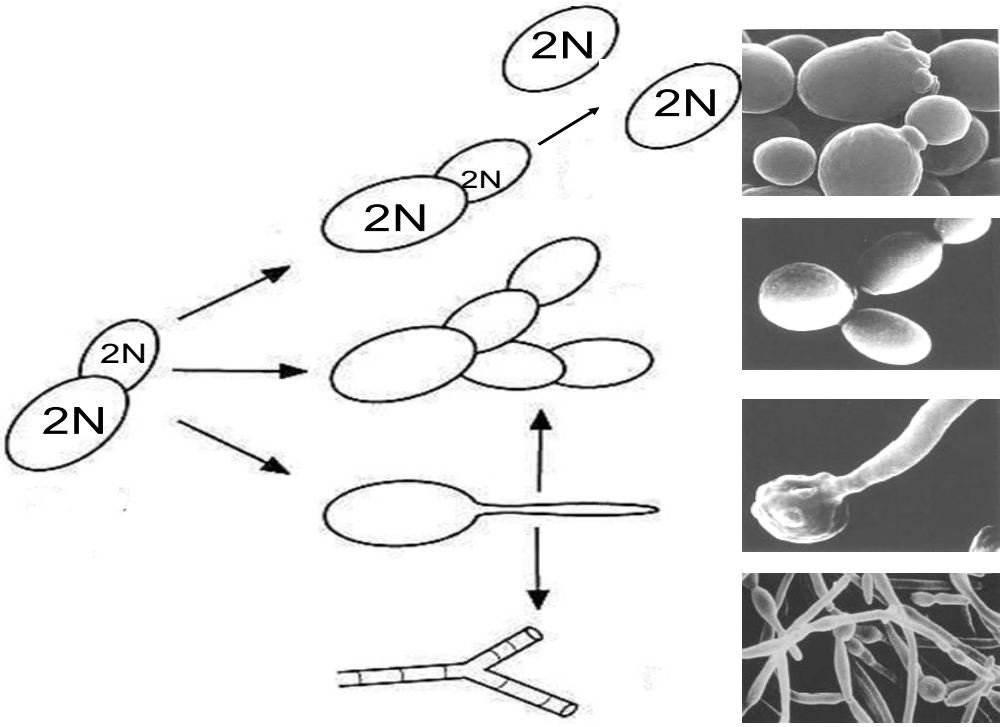


Figura 5. Reparación de mutaciones causadas por desprendimiento del complejo de replicación. A) fijación de la mutación B) reparación (Palmiewsi et al., 2002)

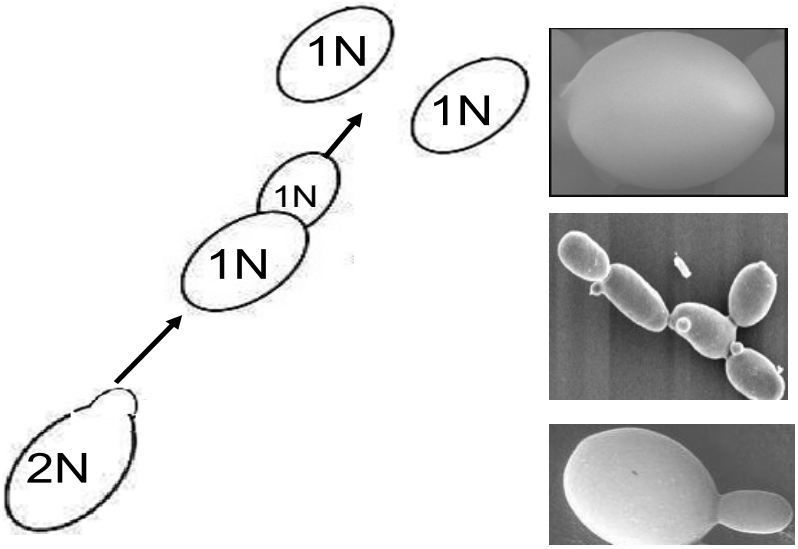
Dependiendo de la ploidía del organismo los microsatélites van a identificar la presencia de uno o más alelos en una población. En una célula haploide se identifica solo un alelo mientras que en la diploide hay dos posibilidades, a) el mismo alelo ó b) 2 alelos diferentes, esto es importante al analizar los resultados.

Características de los genomas del género *Candida*

La mayoría de los géneros de levadura tiene la capacidad de reproducirse por división mitótica o meiotica. Esto implica tanto fases haploides como diploides (Fig. 6). En el caso particular de las especies patógenas del genero Candida su reproducción es asexual por gemación y división mitótica. La mayoría tiene un genoma diploide y en ocasiones aneuploide con excepción de *C. glabrata* que tiene un genoma haploide. Tienen diferente número de cromosomas y de genes (Tabla 6).



A. Diploide (*C. albicans)*



B. Haploide (*C. glabrata)*

Figura 6. Fases: diploide y haploide: *C. albicans (A)* y *C. glabrata (B).*

TABLA 6. Características del genoma de las especies de *Candida* (Castaño et al., 2006; Matsuko Doi et al, 1992).

Especie	Ploidía	Cromosomas	Tamaño del genoma	No. de genes
C. albicans	Diploide	8	14.4	**6159**
C. tropicales	Diploide	12	14.5	**6258**
C. glabrata	Haploide	13	12.3	**5283**
C. parapsilosis	**Diploide**	**14**	**13.1**	**5733**

Candida albicans es la levadura patógena mas estudiada genética y molecularmente, su genoma ha sido secuenciado. A partir de análisis moleculares tipo Southern se identificaron varios tipos de microsatélites los cuales han permitido analizar diferencias entre los aislamientos de este patógeno. Entre los microsatélites identificados en *C. albicans* están los Ca3, CaI, CEF 3, HIS 3, CA III, CDC 3, EF 3 (Botterel et al., 2001; Sampaio et al., 2005; Chavez. et al., 2009). En especies *Candida no albicans*, el estudio de microsatélites apenas empieza. En *Candida glabrata* se han identificado pocos microsatélites que poseen un poder de discriminación de 84% *(*Foulet. et al., 2005) y en un estudio reciente se pudo discriminar a un 97% (Enache-Angoulvant et al., 2010*).* En *C. parapsilosis* se identifico un microsatélite que tienen un poder de discriminación de 99% (Sabino et al., 2010).

En este trabajo se compararon los métodos fenotipicos y genotípicos en la identificación de los aislamientos de *Candida sp.* Ya que *C. albicans* fue la especie más frecuente en el hospital, se analizó la variabilidad genética entre los aislamientos utilizando como marcador al microsatélite CAI (CAA) específico de *C.albicans*:

PARTE 3. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar por métodos bioquímicos, fenotípicos y genéticos las especies del género *Candida* aisladas de pacientes con candidosis del Hospital Juárez de México.

Objetivos específicos

1. Identificar por métodos fenotípicos las especies del género *Candida* en pacientes con candidosis.
2. Identificación molecular de los aislamientos de *Candida sp* por PCR-RFLP.
3. Analizar la variabilidad genética entre los aislamientos de *C. albicans* utilizando los microsatélites CAI.

PARTE 4. METODOLOGIA

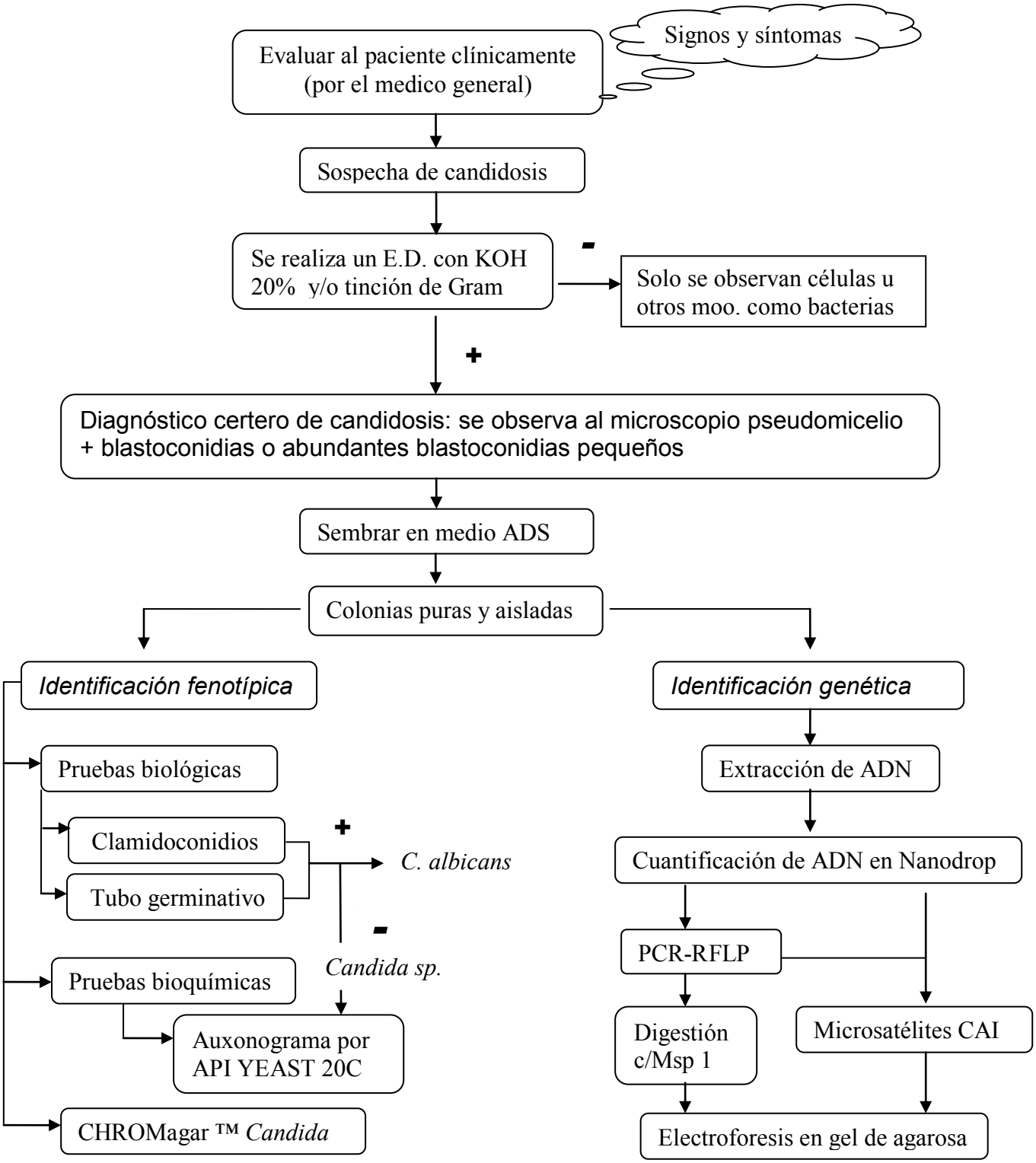


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología. Para la identificación de candidosis, su caracterización y tipificación de las especies de *Candida.*

Identificación de especies de *Candida*

Los pacientes del Hospital Juárez de México (HJM) fueron internados por una inmunosupresión surgida por una enfermedad; cada paciente dentro de su hospitalización, fue evaluado clínicamente por el medico general por presentar signos y síntomas sospechosos de candidosis. Después por los mismos médicos fueron tomadas las muestras o también llamados aislamientos (porque se aislaron del paciente) como liquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, orina, esputo, etc., excepto las muestras de la cavidad oral que fueron tomadas por el químico a cargo; y fueron enviadas al laboratorio de Inmunoalergologia y micología médica del HJM para su posterior identificación de candidosis.

Fenotipificaciòn de los aislamientos

Examen directo (ED) y tinción de Gram: Sobre dos portaobjetos se hizo un frote de cada muestra en estudio. A un portaobjetos se le agregaron dos gotas de KOH al 20% (o azul de lactofenol), se colocó un cubreobjetos, se calentó con mechero por unos segundos y se observo al microscopio a 10X y 40X (ED). La acumulación de blastoconidios y/o pseudohifas (formas parasitarias) indicó una candidosis activa. Al segundo portaobjetos se le hizo una tinción de Gram para observar las características microscópicas y homogeneidad de la muestra. Las muestras de orina y LCR de los pacientes, se centrifugaron a 1500rpm/15 min para estudiar el sedimento.

Siembra en medios de cultivo:

Medios no selectivos: Se sembró la muestra por estría de agotamiento en zona de esterilidad entre dos mecheros en los medios Agar Dextrosa Sabouraud (ADS,

BioRad) y agar Extracto de levaduras-Peptona-Glucosa (YEPD, BioRad), para obtener colonias puras y asiladas. Se incubaron a 25-30ºC/ 5 a 15 días.

Medios selectivos: Se sembró la muestra de cada paciente por la técnica de estría de agotamiento en agar Micosel (BioRad) medio donde solo crece *C. albicans*; en zona totalmente estéril entre dos mecheros; se incubó a temperatura ambiente (25-30ºC) de 5 a 15 días, se observaron macro y microscópicamente para corroborar la presencia de colonias de aspecto mucoide y blastoconidias. También se sembró la muestra por la misma técnica en CHROMagar ™*Candida* (CHROMagar; Paris, Francia) que es un medio cromogénico que confiere una coloración especifica a las diferentes especies de *Candida*: *C. albicans* - verde esmeralda, *C. dubliniensis* –verde oscuro, *C. tropicalis*-azul metálico, *C. krusei* - rosa, *C. glabrata* - violeta, *C.parapsilosis* - crema a rosa pálido y otras especies de tonalidad blanco a malva, la combinación de colores indica una asociación de especies o mezclas. Se incubó por 48h a 37ºC.

Pruebas Biológicas:

Producción de clamidoconidios: Se sembró una colonia pura y aislada proveniente de la muestra previamente sembrada en ADS, por la técnica de estriado continuo en el medio de agar Harina de Maíz-Tween 80 al 1% y se indujo la resistencia al crecimiento de clamidoconidias formando con el asa micologica tres grietas rompiendo el agar verticalmente, se incubo a 28ºC de 3 a 6 días. Por examen microscópico se ha descrito que en este medio todas las especies forman blastoconidios y/o pseudomicelio; pero *C.albicans* además genera clamidoconidios al igual que *Candida dubliniensis* pero esta ultima genera tres veces mas la cantidad de estas estructuras.

Formación de tubo germinativo: A partir de una colonia (sembrada previamente en ADS proveniente de cada muestra del paciente), se tomo una asada y se inoculó en 0.5 ml de suero humano en un tubo de ensayo de 13x100 (marca Pirex, modelo 9820). Se incubó durante 2 horas y media a 37° C, después se analizó la muestra al microscopio en los objetivos 10X y 40X. Solo *C. albicans* genera tubos germinativos, aunque *C.dubliniensis* también los genera pero con mayor abundancia.

Pruebas Bioquímicas "Auxonograma":

API-Yeast-20C (bioMèriux): A partir de un cultivo joven (de 48h) del aislamiento a identificar, se realizó una suspensión celular en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual al tubo No. 2 de McFarland aproximadamente. Se transfirieron 100µl de esta suspensión a una ampolleta de C Medium y se homogenizó evitando la formación de burbujas. Las cúpulas que contienen diferentes carbohidratos se llenaron con la suspensión preparada de cada aislamiento; estas se incubaron a 30° C por 48-72 h. Se observó el crecimiento de cada aislamiento en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva (desarrollo del hongo levaduriforme) (Fig. 8) que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los diferentes nutrientes están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno, en caso de ser positivo, un valor diferente: 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar. Sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico (Fig.9). La identificación debe hacerse mediante el catálogo analítico o el programa informático de identificación.

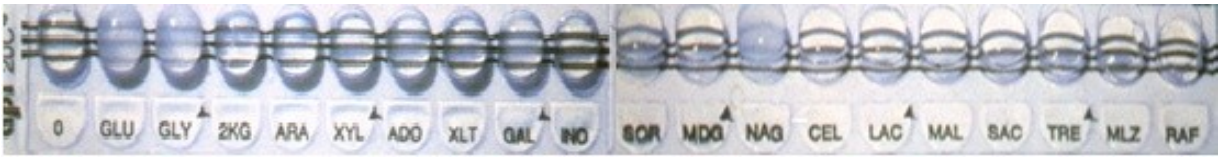


Figura 8. Prueba API YEAST 20C. Veinte cupulas con 19 carbohidratos y una cupula que indica el control negativo (0), si presentan turbidez a comparacion del control es prueba positiva, es decir, indica asimilacion de carbohidratos dependiendo de la especie de *Candida*.

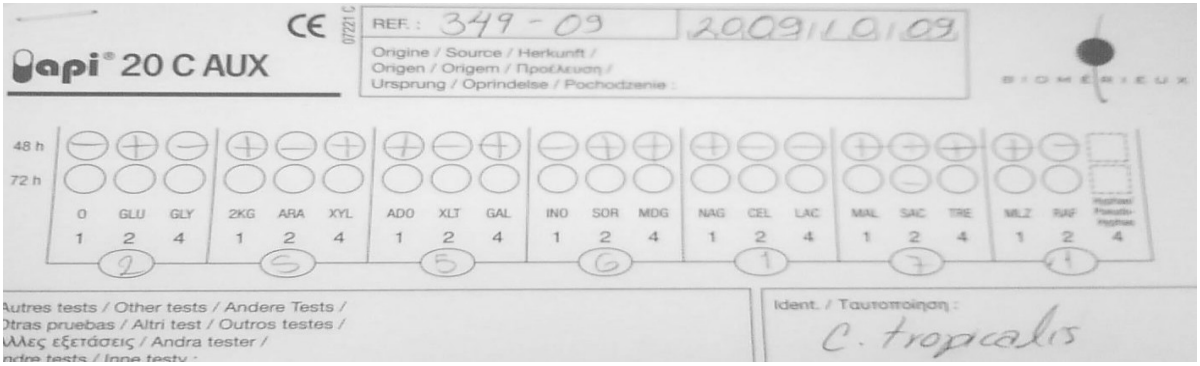
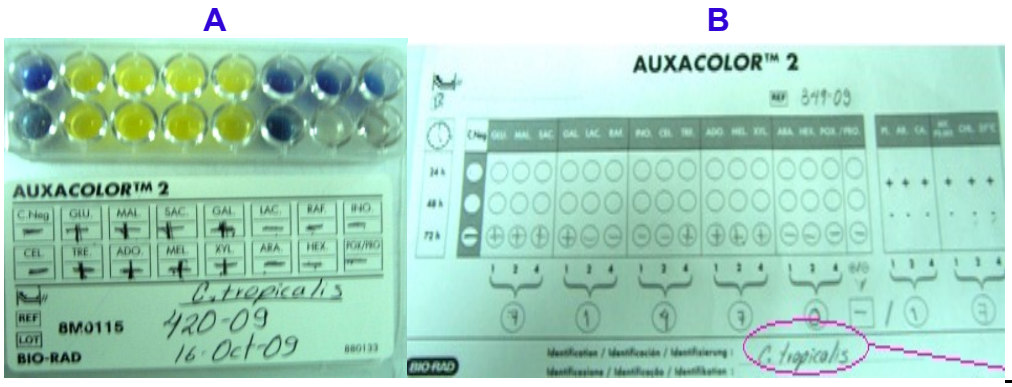


Figura 9. Hola de resultados de API YEAST 20C. Se vacian los datos, de acuerdo al valor positivo o negativo según corresponda la asimilacion de carbohidratos; dando un perfil nùmerico, que proporciona el nombre de la especie de *Candida* que corresponda.

Auxocolor TM 2 (Bio Rad)**:** Es un sistema de identificación basado en la asimilación de 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras. Se realizó en el vial con una suspensión equivalente al tubo No. 1 de McFarland aproximadamente, con un cultivo joven (24-48 h) del aislamiento a identificar, se inoculó la galería de la microplaca y se cubrió con papel adhesivo. Se incubó por 48-72 h a 30º C. El cambio de color (amarillo) se interpreta como crecimiento positivo para el azúcar en cuestión, y si mantienen el color azul es negativo (Fig.10-A). Los 15 caracteres bioquímicos de la galería se agrupan en tripletes para obtener un código numérico. Para ello, se adjudica un valor de 1 para la posición 1ª del triplete, 2 para la 2ª y 4 para la 3ª. La identificación de la levadura se consigue comparando el código numérico resultante con los suministrados por el fabricante (Fig. 10-B).



C tropicalis.

Figura 10. Prueba bioquímica Auxacolor TM 2. A) Crecimiento de *Candida*, basado en el cambio de color si asimila el azúcar; B) Hoja de resultados, obteniendo un código numérico que corresponde a una especie de *Candida*.

Identificación genética

Extracción de ADN

Rompimiento enzimático de la pared celular del hongo con la enzima liticasa (Sigma). A partir de las colonias crecidas en YEPD se preparó una suspensión celular en 1mL de NaCl 0.15M. Las células se centrifugaron (Centrifuge, 5415 C) a 9000 rpm por 5min. La pastilla se resuspendió en 400µL de Sorbitol 1M amortiguado con TE, 10µL de βMe EtOH (Sigma Aldrich) agente antioxidante que reduce los puentes disulfuro de las proteínas y que junto con 10 U ml de liticasa, degradan la pared de los hongos y forman esferoplastos. La suspensión celular se incubó a 37ºC por 1.5 h. Los esferoplastos formados se lavaron con 200µL de Sorbitol 1M. La pastilla se resuspendió con 200µL de amortiguador de lisis (1% SDS + TE); se agregaron 10µL de Proteinasa K, el lisado celular se incubó a 65º C por 1h. Posteriormente se agregaron 0.3 vol. de acetato de potasio 5M, se incubó en hielo por 1h y se centrifugó a 12000 rpm por 8 min. El acetato de potasio y la centrifugación precipitan fragmentos de membrana, pared o células no rotas así como proteínas.

El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 2 vol. de EtOH frío, este paso precipita el ADN y ARN. Se almacenó a -20º C toda la noche. El precipitado se centrifugó a 12000 rpm por 10 min., se decantó el ETOH y la pastilla se resuspendió en 50µL de TE. Para hidrolizar el ARN se agregó 1µL de RNAsa, esta suspensión se incubó a 37ºC por 1h y se agregaron 100 µl de TE. Para purificar el ADN se utilizó fenol equilibrado con Tris-HCl pH 8.0. Se hizo una mezcla fenol-cloroformo 1:1 y se agregó un volumen de está mezcla a la suspensión de ADN, se homogenizó mecánicamente con el vortex y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min., se recuperó el sobrenadante que es donde se particiona el ADN. Para eliminar los restos de fenol, se agregó 1 vol. de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se homogenizó en el vortex y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se le agregaron 0.3 vol. de acetato de amonio y 2 vol. de EtOH. Esta mezcla se dejó toda la noche a −20ºC, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min., para precipitar al ADN. El etanol se decantó, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 50µL de TE. El ADN se almacenó a menos 20º C hasta ser utilizado. Se verificó la integridad del ADN por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio, el ADN se visualizó en un transluminador de luz UV (BioRad 2000).

Amplificación PCR-RFLP

La reacción de PCR-RFLP se lleva a cabo, en un tubo eppendorf (epp.) que contiene una mezcla de reactivos (Tabla 7) con los cebadores específicos para especies de *Candida* (Tabla 8). Se utilizó guantes y un equipo totalmente estériles, que eviten la contaminación e inhiban la reacción.

TABLA 7. Mezcla de reacción para PCR –RFLP

Reactivos	Volumen reacción 1x
Buffer 10X (BioTecMol)	2µL
dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 100mM Fermentas)	2 µL
$MgCl_2$ (*C. albicans y C. parapsilosis* c/u; 30mM BioTecMol) $MgCl_2$ (*C. glabrata y C. tropicalis* c/u; 30mM BioTecMol)	1µL 0.6µL
Cebador 5´(ITS1-F Sigma Aldrich)	1µL
Cebador 3´ (ITS4-R Sigma Aldrich)	1µL
ADN (30ng/ µl)	1µL
Taq polimerasa (5U/µL Fermentas)	0.25µL
H_2O estéril	Llevar a un volumen final de 20µl.

Tabla 8. Secuencia de los cebadores ITS1-F e ITS4-R

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (ºC)	%GC
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	68.4	63.16
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	61.5	45

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (iCycler de Bio Rad), que con ciertas condiciones de incubación de PCR: desnaturalización inicial del DNA a 95º C 4 min y 30 ciclos de: 95ºC/30seg., alineamiento de los cebadores al ADN a 58.5º C/30 seg., y elongación a 72º C/30 seg., almacenamiento a 4° C (Fig. 11); da como resultado productos de amplificación, los cuales se analizaron en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio para después visualizarlo en el transluminador de luz UV.

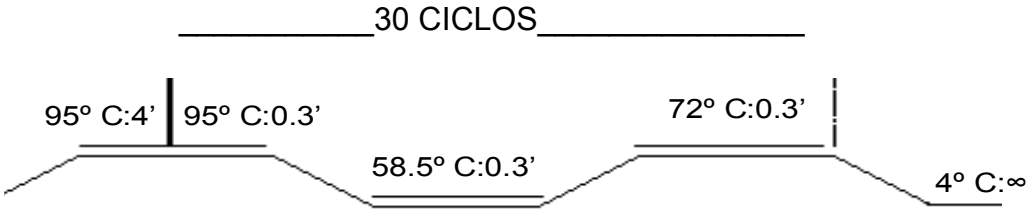


Figura 11. Condiciones de incubación de la mezcla de reacción de PCR-RFLP.

Digestión del ADN amplificado con la enzima Msp 1 (Hpa II)

El ADN de los productos de amplificación obtenidos en el proceso anterior, se utilizaron para hacer una nueva mezcla de reacción que permitirá la digestión de los mismos (Tabla9).

Tabla 9. Mezcla de reacción para la digestión con Msp 1.

Reactivos	Volumen reacción 1x
Buffer 10X (Fermentas)	2.5 µL
Enzima Msp 1 (10u/µl, Fermentas)	1 µL
ADN	10 µL
H_2O estéril	6.5µl.

La mezcla de reacción se incubó a 37º C por 3 h. Los productos de la digestión del ADN se analizaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La visualización se hizo en un transiluminador con luz UV.

Amplificación (PCR) del microsatélite CAI especifico de *C. albicans*.

Para analizar la variabilidad de los aislamientos de *C. albicans*, se utilizó un microsatélite específico de esta especie (CAI). La amplificación de este microsatélite por PCR, requirió de una mezcla de reacción (Tabla 10), que incluye iniciadores específicos o mejor conocidos como cebadores (Tabla 11); que permiten el proceso adecuado a ciertas condiciones de reacción de PCR: desnaturalización inicial de 95ºC/5 minutos, después 30 ciclos de: 95ºC-30 seg., 60ºC-30 seg., y 72ºC-1 min., y con una extensión final de 72º C/ 10min, por ultimo se almacenan a 4º C (Fig. 12).

TABLA 10. Mezcla de reacción para PCR con microsatélites.

Reactivos	Volumen reacción 1x
Buffer 10X (BioTecMol)	1µL
dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 100Mm Fermentas)	2 µL
$MgCl_2$ (30mM BioTecMol)	0.33µL
Cebador 5´- 3´(CAI-F, Sigma Aldrich)	1µL
Cebador 3´- 5´(CAI-R) Sigma Aldrich)	1µL
ADN (30ng)	1µL
Taq polimerasa (5U/µL Fermentas)	0.25µL
H_2O inyectable estéril	Volumen final de 20µl.

Tabla 11. Secuencia de los cebadores CAI-F y CAI-R

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tm (ºC)	%GC
CAI-F	ATGCCATTGAGTGGAATTGG	64.6	45
CAI-R	AGTGGCTTGTGTTGGGTTTT	63.3	45

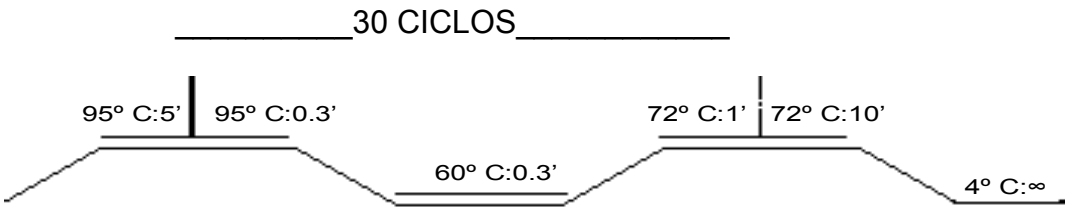


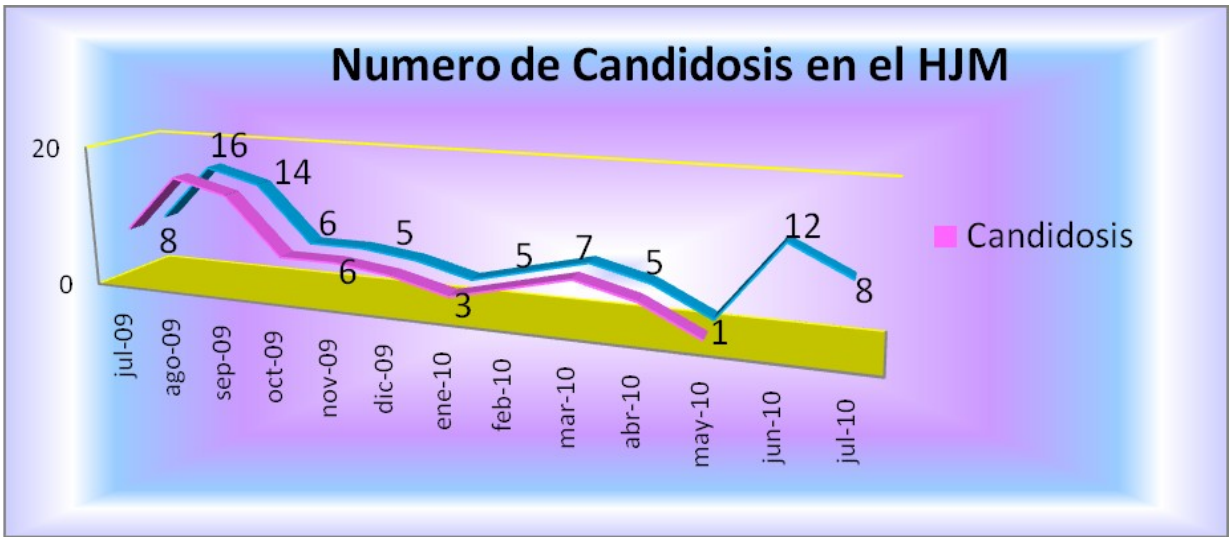
Figura 12. Condiciones de PCR utilizando los microsatélites específicos de *C.albicans.*

Las bandas del microsatélite, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 2.5% con bromuro de etidio y se observaron en un transluminador de luz UV. Utilizando un peso molecular (PM) llamado "Escalera" de 100pb (Fermentas).

PARTE 5. RESULTADOS

1. Identificación de infecciones micóticas.

Se analizaron muestras sospechosas de candidosis durante el periodo de julio del 2009 a mayo del 2010 (Grafica 3) de pacientes del HJM. El total de muestras sospechosas de infecciones micóticas fueron 808, de los cuales el 73.1% son negativos y el 26.9% fueron positivos para hongos. De las muestras positivas para infecciones fúngicas, el 57.1% corresponde a candidosis.



Grafica 3. Número de casos con candidosis que presentan los pacientes en el Hospital Juárez de México. La línea de color rosa muestra el periodo de estudio de éste trabajo de julio del 2009 a mayo del 2010; y la línea de color azul indica el año completo de julio del 2009 a julio del 2010, para observar el incremento y descenso por mes de esta micosis.

En la grafica 3 se muestran específicamente los casos de candidosis, durante el periodo de estudio se observo el aumento cíclico de la enfermedad. El primer ciclo de infección se dio en agosto (21%) y septiembre (18%) del 2009, el segundo en marzo (9.2%) y el tercero en junio (16%) del 2010 (Grafica 3). El 64% de los pacientes fueron masculinos y e 36% fueron femeninos.

La edad promedio fue de 45 años (1 mes - 83 años). El mayor porcentaje de muestras fueron de esputo (expectoración) en un 57%; que se asocia a otras patologías, como neumonía bacteriana y tuberculosis, entre otras; mientras que otros tipos de muestras, fueron: orina 18%, cavidad oral 11%, LCR (liquido cefalorraquídeo) 4%, otico 4%, sangre 4%, exudado faríngeo 2% y uñas 2%. Estas micosis estuvieron asociadas a padecimientos como: NAC (neumonía adquirida en la comunidad), VIH (virus de inmudeficiencia humana), TB (tuberculosis), LLA (leucemia linfocitica aguda), LMA (leucemia monocitica aguda), DM II (diabetes mellitas tipo II), Sepsis (infección diseminada), OMC (otitis media crónica), IVU (infección en vías urinarias), NN (neumonía nosocomial), Mieloma (cáncer en las células del plasma de la medula ósea), Síndrome febril (aumento de temperatura espontáneo y anormal), Urosepsis, Meningitis, Pancreatitis, Derrame pleural y Pancitopenia, etc.

La mayoría de los pacientes provienen del D. F. (53%), seguido del Estado de México (43%), Veracruz (2%) y Guanajuato (2%).

A diferencia de las diversas formas clínicas de la candidosis, la oral, presenta signos muy característicos y visibles como se observa en la Fig. 13-A; caracterizada por placas blanquecinas pseudomembranosas en lengua. La Fig. 13-B presenta candidosis oral hipotrofica, mientras que el tercer paciente presentaba leucoplacas en lengua, pústulas y ulceras en labio inferior, debido a que este presentaba SIDA (Fig. 13-C)

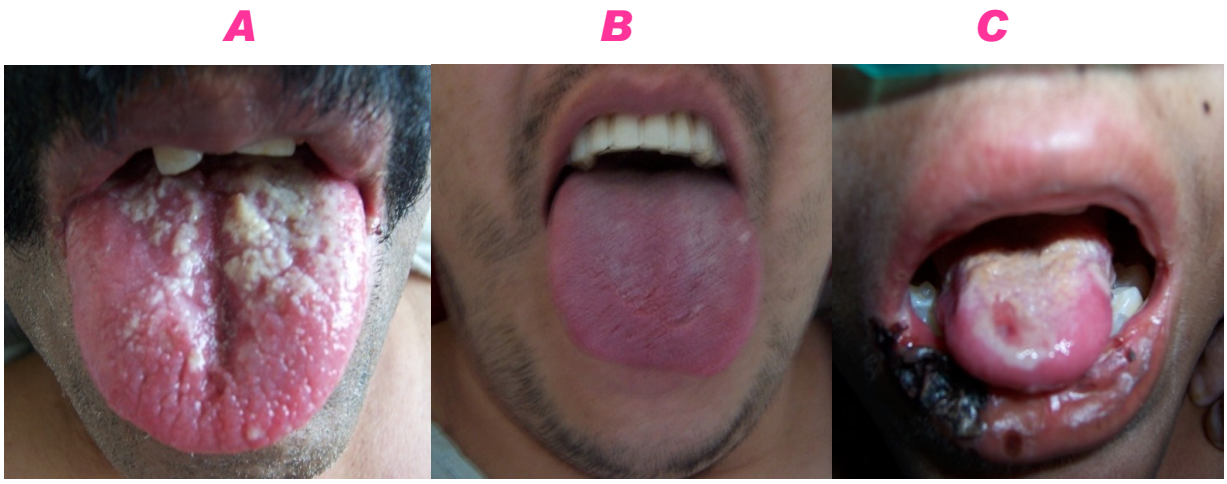


Figura 13. Tres manifestaciones clínicas diferentes de candidosis oral.

Debido a lo anterior, es muy importante conocer los síntomas y signos de esta micosis, que junto con un buen examen directo con KOH al 20%. El aislamiento e identificación fenotípica de la especie hacen un excelente diagnostico.

a) Fenotípicos:

En la identificación fenotípica, se obtuvieron los resultados de la figura 14 de las diferentes especies.

Especie	E.D. con KOH 20%	Tinción de Gram	Cultivos	Clamidoconidias	Tubo germinativo
C. albicans	Blastoconidios + pseudohifas (+++)	Blastoconidios 4-6 µm	Colonias cremosas de aspecto mucoide.	Clamidoconidios 8-12µm	
C. tropicalis	Blastoconidios + pseudohifas (++)	Blastoconidios 4-6 µm	Colonias rugosas, de aspecto mucoide	_____	_____
C. glabrata	Blastoconidios pequeños (+++)	Blastoconidios 2-3 µm	Colonias lisas blancas.	_____	_____
C. parapsilosis	Blastoconidios pocos mas pseudohifas (+++)	Blastoconidios 4-6 µm	Colonias cremosas de aspecto mucoide	_____	_____

FIGURA 14. Análisis morfológico de las cuatro especies de *Candida* tipificadas por métodos fenotipicos.

Inicialmente la identificación se realizo con un examen directo de cada aislamiento, se observó la forma parasitaria patognomónica de *C. glabrata* (Fig. 15), la cual presenta abundantes blastoconidios pequeños, a diferencia de *Candida sp.* que presenta pseudohifas más blastoconidios (Fig. 16).

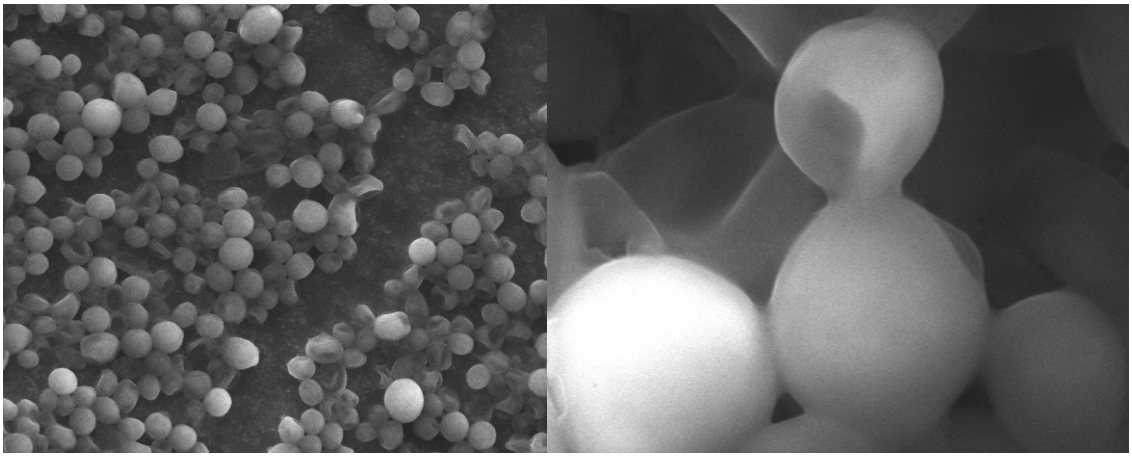


Figura 15. Blastoconidios pequeños de *Candida glabrata* (Imagen izquierda esta en microscopio de barrido a 1000 X y el de la derecha 10000X).

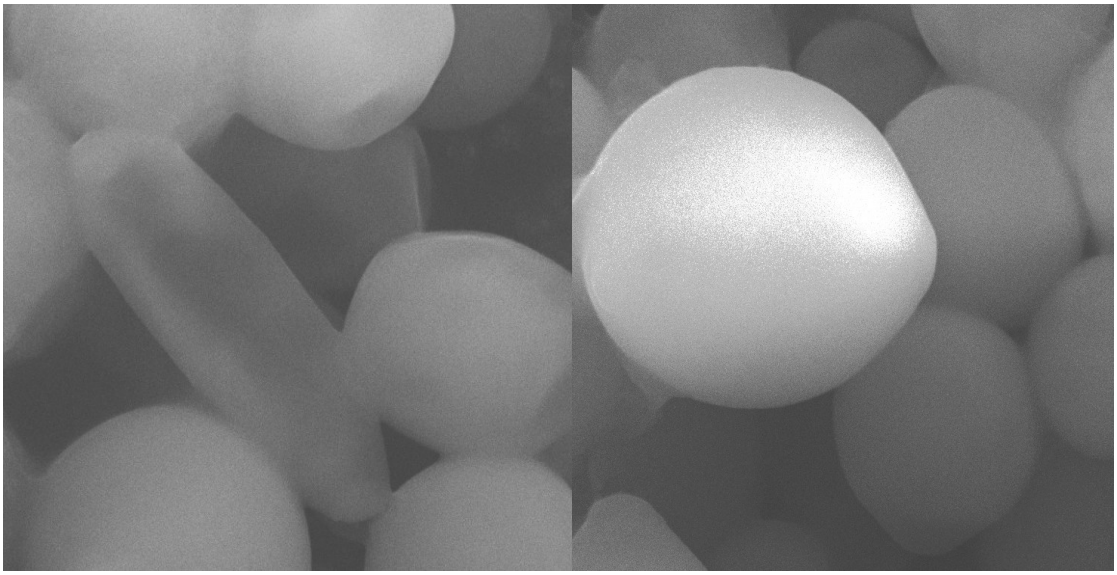


Figura 16. Pseudohifas (izquierda) mas blastocodios (derecha) de *Candida albicans (*Imagen izquierda esta en microscopio de barrido a 4000 X y el de la derecha 7500X).

Las pruebas fenotípicas básicas para diferenciar a *C. albicans* de las demás especies; se realizó la siembra en medio agar de Micosel donde solo crece ésta especie; mientras que en medio agar Harina de Maíz produce clamidoconidios e induce en suero humano la formación de tubo germinativo.

Para confirmar la identificación fenotípica de las especies, se utilizaron las pruebas bioquímicas, principalmente el kit comercial API YEAST 20 C para probar la asimilación de carbohidratos. Por este método se identificaron 5 especies: *C.albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. parapsilosis y C. paratropicalis* (Tabla 12).

TABLA 12. Asimilación de carbohidratos de las diferentes especies de *Candida.*

	Glucosa	Glicerol	2-ceto-Gluconato de	Arabinosa	Xylosa	Adonitol	Xylitol	Galactosa	Inositol	Sorbitol	Metil α Glucopiranosida	Acetil Glucosamina	Celobiosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Trealosa	Melezitosa	Rafinosa
C. a.	+	-	+	+/-	+	+/-	+/-	+	-	+	+/-	+	-	-	+	+	+	-	-
C. t.	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	-
C. g.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C. pp.	+	+/-	+/-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
C.pt.	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-

Estas pruebas fenotipicas (E.D., siembra en medios de cultivos como ADS y agar Micosel, producción en clamidoconidios e inducción de tubo germinativo, y por ultimo pruebas bioquímicas principalmente kit comerciales como API YEAST 20C) son las que se realizan básicamente en el hospital para identificación de especies, pero a veces solo se conforman los médicos con un diagnostico hasta género y no especifican la especie.

En estas pruebas, existieron algunas inconsistencias; por ejemplo, en un aislamiento "X", se sospechaba de una posible mezcla de especies diferentes: *C. albicans y C.tropicales*, debido a que en el medio agar de Micosel se obtuvo un crecimiento escaso en un tiempo un poco mas de una semana (>13 días), donde se observó colonia blanca de aspecto mucoide, húmeda, lisa y no aislada. Esté crecimiento indica la presencia de *C. albicans,* pero se dudaba por su el desarrollo escaso que aparecía en el medio agar de Micosel. Por lo que se prosiguió a realizar las pruebas biológicas y se obtuvo resultados negativos para clamidoconidias, pero para la producción de tubo germinativo los resultados arrojaron un falso positivo, porque presentaba pseudohifas largas con blastoconidios (Fig. 17).

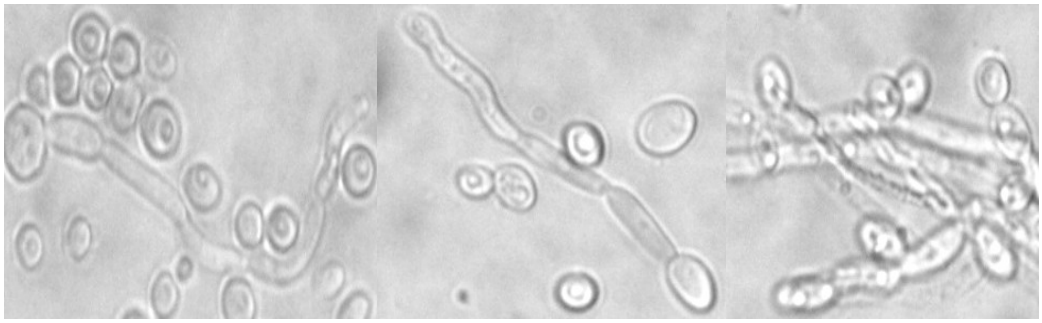


Figura 17. Imágenes representativas de falsos positivos para tubo germinativo.

Los resultados no lograron discriminar acertadamente la presencia de *C. albicans:* por lo que se utilizo el método bioquímico API YEAST 20 C y el kit comercial Auxacolor ™ 2, estas pruebas identificaron a este aislamiento como *C. paratropicalis*.

Una tercera prueba que se utilizó para corroborar la asignación de especies de los diferentes aislamientos, fue en CHROMagar ™ *Candida*; este medio permite diferenciar *C. albicans, C. tropicalis, C.parapsilosis* y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan (Fig. 18).

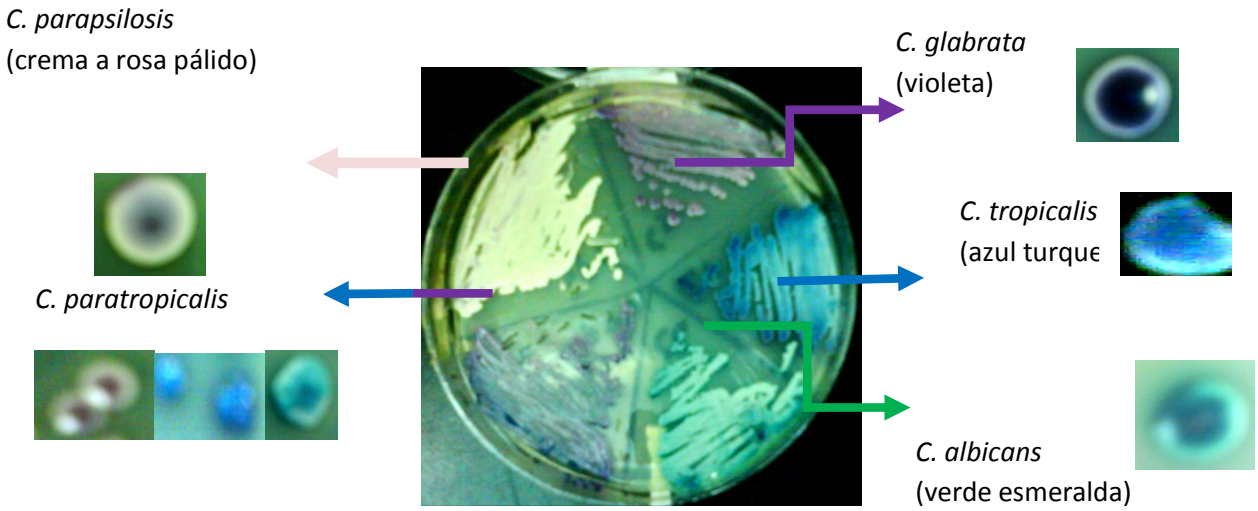


Figura 18. Identificación de especies en CHROMagar ™ *Candida*. Las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea, *C.glabrata* manifiesta un color violeta morado.

Los resultados obtenidos en CHROMagar ™ *Candida,* permitieron entender los problemas que se presentaron al tipificar bioquímicamente los diferentes aislamientos, ya que las colonias de algunos de estos presentaron 3 coloraciones lo que significa que existe una mezcla de especies.

Uno de los aislamientos problema se identificó inicialmente con las pruebas bioquímicas como *C. paratropicalis* sin embargo la siembra en CHROMagar ™ *Candida,* resalto la presencia de *C. glabrata*, *C. tropicalis y C. albicans.*

Para que la identificación de las especies de *Candida* sea acertada se necesitan realizar un conjunto de pruebas cuyos resultados sean consistentes con las características especificas de cada especie. Debido a las variaciones encontradas con los métodos fenotipicos se utilizaron herramientas moleculares.

b) Genético

Extracción de ADN

La obtención del ADN de cada uno de los aislamientos se hizo a partir de esferoplastos. Después de purificado se observo la integridad del ADN (que no este degradado). Una alícuota de ADN de cada muestra se analizó en geles de agarosa al 1%: En la figura siguiente (Fig. 19), muestra el ejemplo de dos aislamientos de *Candida*, en la parte superior se observa bandas de ADN de alto peso molecular y en la parte inferior el ARN; esté ADN se utilizó en los estudios de identificación molecular de especies (PCR-RFLP) y de variabilidad genética (PCR).

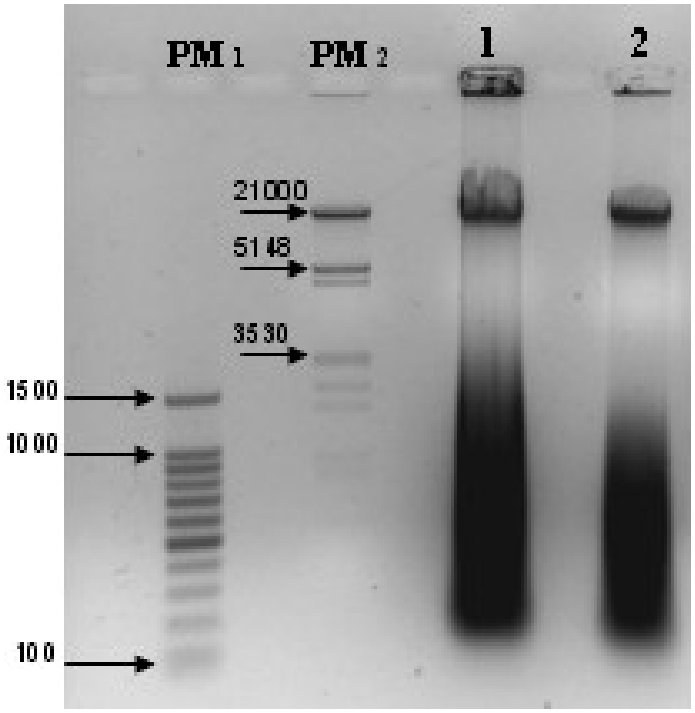


Figura 19. Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1%. Marcador de bajo (peso molecular) PM1) Escalera de 100pb; PM 2) Lambda EcoR1/HindIII; 3) 5µl de ADN de *C. albicans*, 4) 5µl de ADN de *C.tropicalis.*

PCR-RFLP

A partir del ADN purificado se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando como cebadores las secuencias de ITS-1 e ITS-4. Se amplificaron fragmentos de ADN que varían de 510 a 879 pb. (Fig. 20-A). En esta figura 19, las muestras del carril 2 y 3 tienen un peso molecular similar por lo que fue necesario hacer la digestión con la enzima Msp I. Todos los productos de amplificación fueron digeridos con la enzima. Estos patrones de digestión fueron analizados en un gel de agarosa al 2% (Fig. 20-B) y se observo que estos son característicos de cada especie lo que permite identificar sin ningún margen de duda cada especie de *Candida* (Mirhendi et al. (2006). Los productos de restricción varían de 184pb a 557pb (Tabla 13).

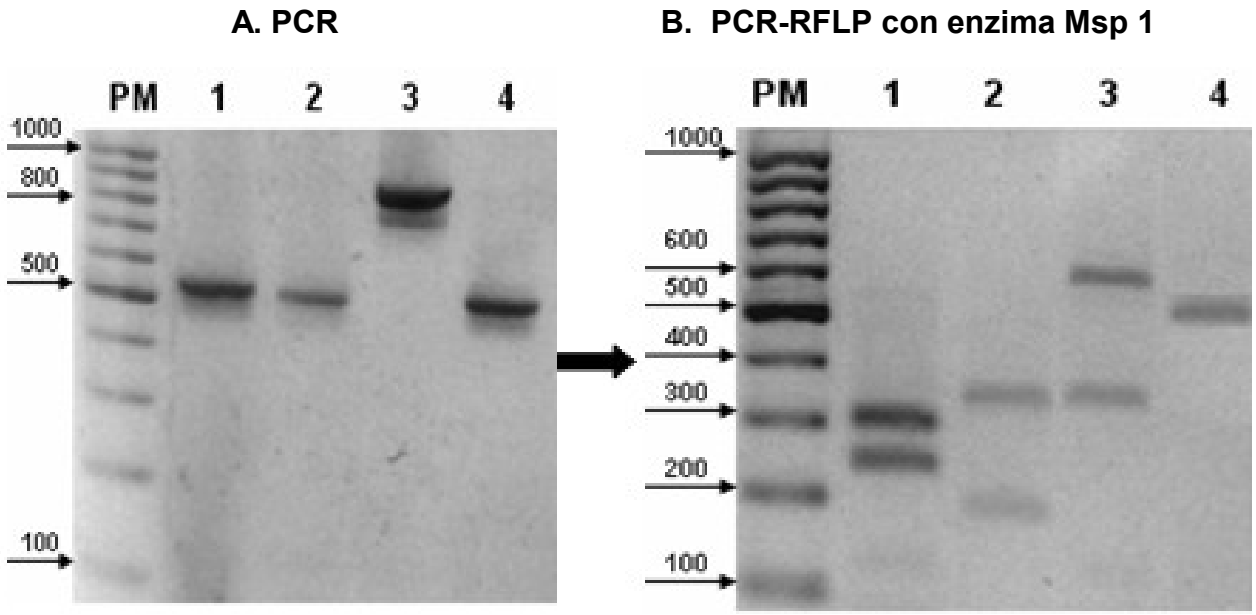


Figura 20. Gel de Agarosa al 2% **A)** Productos de PCR de 4 especies de *Candida.* PM, Escalera de 100 pb; 1) *C. albicans;* 2) *C. tropicalis*, 3) *C. glabrata*; 4) *C. parapsilopsis*. **B)** Productos de restricción Msp 1. PM Escalera de 100pb; 1) *C. albicans;* 2) *C.tropicalis*; 3) *C. glabrata*; 4) *C. parapsilopsis.*

Tabla. 13. Tamaño de los productos de ITS1-ITS4 de especies de *Candida* antes y después de la digestión con Msp 1.

Especies de Candida	Tamaño de ITS1-ITS4	Tamaño de productos de restricción
C. albicans	535	**297, 238**
C. tropicalis	524	**340, 184**
C. glabrata	871	**557, 314**
C. parapsilopsis	**520**	**520**

2. Variabilidad genética de *C. albicans*

Candida albicans fue la especie mas abundante en los aislamientos estudiados, para analizar las similitudes genéticas entre éstos, se utilizaron como cebadores las secuencias del microsatélite CAI específicos de *C albicans.* Los resultados q se obtuvieron fueron: productos de amplificación que varían en tamaño de 170 a 300 pb (gel de agarosa al 2.5%). La variación se basa en el número de repeticiones del trinucleotido CAA. El tamaño del fragmento depende de la cantidad de repeticiones. De los 45 aislamientos de *C. albicans*, se obtuvieron 11 diferentes alelos (el alelo mas pequeño es de 170pb, designado alelo 1; mientras que el alelo mas grande corresponde a 300pb, designado como alelo 11). La combinación de algunos de los alelos dio origen a 18 genotipos en total, de los cuales 16 cepas son homocigotas (28% genotipos) (Fig.21) y 29 cepas son heterocigotas (72% genotipos) (Fig. 22).

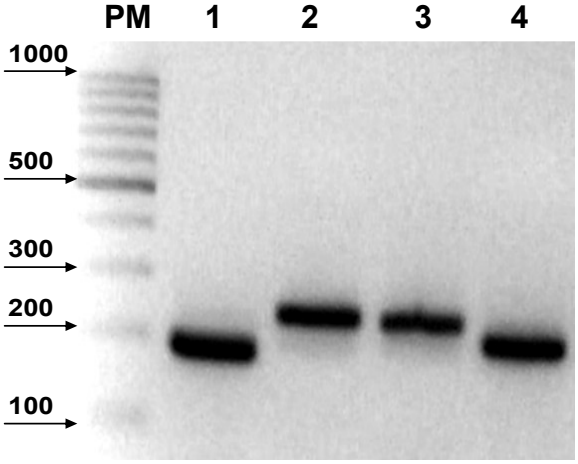


Figura 21. Imagen representativa de la amplificación de locus CAI homocigotos. PM Escalera de 100 pb; 1) Cepa no. 1 de *C. albicans*; 2) Cepa no. 2 de *C. albicans*; 3) Cepa no. 9 de *C. albicans*; 4) Cepa no. 13 de *C. albicans*.

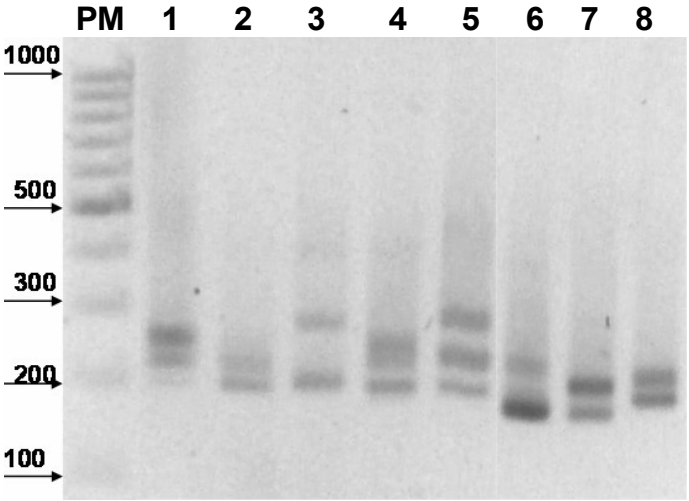


Figura 22. Amplificación de locus CAI heterocigotos de CAI. PM Escalera de 100 pb; 1)Cepa no. 24; 2) Cepa no. 25; 3) Cepa no. 26; 4) Cepa no. 27; 5) Cepa no. 28; 6)Cepa no. 30; 7) Cepa no.31; 8) Cepa no. 32 .

En la tabla 14 se colocaron todos los resultados del análisis de variación de *C.albicans*, asignándole a cada alelo un número. Este número corresponde a los pesos moleculares aproximados de los diferentes tipos de alelos, que tienen diferente número de repeticiones.

Tabla 14. Asignación de número de los diferentes alelos de *C. albicans*

Rotulación	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*
Tipo de alelo (pb)	170	180	190	200	230	250	260	270	280	290	**300**
No. de repeticiones	**57**	**60**	**63**	**67**	**77**	**83**	**87**	**90**	**93**	**97**	**100**

Candida se reproducirse de forma clonal por lo que se espera que los diferentes aislamientos tomados de los pacientes tengan un genotipo diferente entre ellos. Los genotipos mas frecuentes fueron; 4,6 (27%), 4,4 (11%), I 6,6 (11%), 5,5 (9%), 2,4

(7%), los menos representados equivalen al 5% y 2%, de los 45 aislamientos de *Candida albicans* (Tabla 15 y 16).

Tabla 15. Frecuencia de genotipos identificados por amplificación de microsatélites de las cepas homocigotas

Genotipo	Frecuencia
(2, 2)	1
(3, 3)	1
(4, 4)	5
(5, 5)	4
(6, 6)	5
	TOTAL =16

Tabla 16. Frecuencia de genotipos identificados por amplificación de microsatélites de las cepas heterocigotas

Genotipo	Frecuencia
(2, 4)	3
(4, 8)	1
(4, 6)	12
(4, 8, 10)	1
(4, 6, 11)	2
(4, 5)	2
(5, 7)	1
(4, 9)	1
(3, 5, 9)	1
(5, 1)	1
(1, 4)	1
(5, 10)	1
(6, 11)	2
	Total = 29

La presencia de un mismo genotipo aislamientos provenientes de diferentes pacientes, sugiere que la clona fue transferida de un paciente a otro por factores externos.

En la tabla 17 se muestran los datos de los 12 pacientes que tienen el mismo genotipo 4,6 (frecuencia al 27%); es decir que los 12 diferentes pacientes tienen la misma la misma cepa, y no se sabe como se adquirió. Por lo que se analizó los datos del paciente registrados en el protocolo, como es el tiempo de recepción de la muestra. También en la tabla 17, se observa que el 50% de los pacientes con enfermedades pulmonares adquirieron *C. albicans;* lo que se desconoce, es el momento que adquirieron esta micosis, si al ser hospitalizados o durante su estancia en el hospital.

Tabla 17. Diferentes pacientes con el mismo genotipo.

Paciente	Fecha	Enfermedad
8	14-08-09	VIH + TB
11	20-08-09	DM II
15	7-09-09	NN
17	24-09-09	TB pulmonar
18	24-09-09	Sx Febril
19	28-09-09	NAC
21	1-10-09	Sepsis
22	2-10-09	IVU
23	4-11-09	NAC +
27	_____	NAC
38	24-03-10	Mieloma
40	24-03-10	----------

Un hallazgo interesante fue encontrar pacientes infectados con más de una especie de *Candida* como el paciente 18 del cual se aislaron a partir de la misma muestra a *C. albicans y C. glabrata*. Así como el paciente 57 del que se aislaron *C. glabrata, C.albicans y C. tropicales*. También se identifico que los pacientes 6 y 36 fueron infectados con 3 genotipos diferentes mientras que los pacientes 5 y 20 presentaron dos diferentes genotipos. En general, se identificaron 56/76 aislamientos como *Candida sp.*, dando como resultado la más frecuente fue *C.albicans*, como se ilustra en la siguiente tabla:

TABLA 18. Especies del género *Candida* identificadas en el HJM.

Especies	Cantidad	Porcentaje (%)
C. albicans	45	80.3
C. tropicalis	5	8.9
C. glabrata	3	5.4
C. parapsilosis	3	5.4

PARTE 6. DISCUSION

A través de los Sistemas de Vigilancia de Enfermedades Nosocomiales, se ha reportado en diversos países el aumento de infecciones fúngicas de origen nosocomial (Sague y Jarvis, 1993). El incremento de estas micosis, se produce principalmente en las unidades médicas de cirugía, servicios de terapia intensiva, así como en la zona de mantenimiento de los recién nacidos (Pfaller et al., 1998).

La candidosis invasiva produce aproximadamente el 8% de todas las infecciones nosocomiales y de estas, *C. albicans* es la principal especie de enfermedad (50-70%); generalmente pone en riesgo la vida del paciente, por lo que es muy importante el diagnostico de laboratorio de está levadura patógena (Anaissie, 1992; Pfaller, 1995; Pfaller et al., 1996; Pfaller et al., 1998; Pfaller et al., 1998).

Candida sp. es un comensal de la microbiota del cuerpo humano, por lo que se debe considerar que hay diferentes posibles orígenes de está micosis. Por un lado se ha demostrado que la mayoría de los individuos inmunocompetentes (sanos) son portadores de *Candida sp*. (Soll, 1991*);* y por otro lado es mas frecuente en inmunocomprometidos. Los nichos anatómicos donde se porta más frecuentemente a *Candida* son la cavidad oral y el canal vaginal. Por lo que es importante determinar cuando se encuentra como comensal y cuando esta actuando como patógeno.

La identificación de las especies de *Candida* en los hospitales se hace a partir de pruebas morfológicas y bioquímicas: asimilación de carbohidratos, utilización de sustratos específicos y en ocasiones pigmentación diferencial en medios

cromogénicos. Generalmente es necesario realizar más de un método de identificación ya que estos tienen sensibilidad media.

Es de suma importancia identificar el género y la especie, lo que significa llegar a la identificación acertada del patógeno para hacer un diagnostico y tratamiento adecuado, debido a que las diferentes especies de *Candida* poseen una resistencia diversa a los antimicóticos.

Por lo que en éste trabajo del HJM, se observó que la micosis más abundante en los pacientes hospitalizados es candidosis (59%) y que la especie mas frecuente es *C.albicans* (80.3%). Sin embargo se tuvieron diferentes problemas en la identificación de las especies. Por ejemplo, la prueba morfológica para identificar a *C.albicans* es la inducción de tubo germinativo durante 2.30 h, pero esto varía de acuerdo a las condiciones que se manejan en cada laboratorio como: la fuente de suero humano, control de temperatura y la observación de las muestras montadas en portaobjetos inmediatamente, ya que el tubo germinativo se forma en las diferentes especies después del tiempo establecido (>2.30 h).

Con las pruebas bioquímicas se obtuvieron resultados confusos por las diferencias que se observaron durante la identificación, pueden deberse a que no hay control del inoculó del aislamiento al principio de la prueba y tampoco una medición cuantitativa del fenotipo en estudio (fermentación de carbohidratos, utilización de sustratos específicos etc.). Debido a estos errores e inconsistencias, se utilizó otro método de identificación colorimétrico que es el medio comercial CHROMagar ™ *Candida*. Este tuvo la mayor sensibilidad y especificidad para todas las especies

analizadas (100%), sin embargo se tienen reportes en la literatura de diferentes grados de sensibilidad (Martinez y cols.; 2008); esto se debe, a que el inoculo y el tiempo de incubación varían de laboratorio a laboratorio y el resultado se interpreta subjetivamente viendo la tonalidad de los colores lo cual varia dependiendo del observador.

Los métodos de identificación molecular han sido utilizados en los últimos 15 años con gran éxito en la identificación de hongos levaduriformes patógenos oportunistas. El método que se elija depende del conocimiento que se tenga del genoma del hongo y no de la expresión de un fenotipo que varía por las condiciones ambiéntales. Algunos autores han reportado la identificación de especies de Candida (Williams et al., 1995; Mirhendi et al., 2006), por el método de PCR-RFLP, en este trabajo se identificaron las diferentes especies e inclusive la mezcla de especies. Si bien, las pruebas fenotípicas son fáciles de realizar y se cree que la mayoría de los hospitales tienen los recursos y el personal que no requiere estar altamente especializado. Sin embargo, hay altas probabilidades de una mala interpretación, ya que se basa en criterios cualitativos que dependen de cada observador y que requieren de un tiempo prolongado (aproximadamente 3-8 días, hasta 13 días).

En este trabajo se observó que es necesario realizar toda una batería de análisis para llegar a la identificación de las especies de *Candida,* lo que es costoso en tiempo y material utilizado, además de que retrasa el diagnostico el diagnostico y tratamiento. Los estudios moleculares requieren de menor tiempo y son específicos de especie lo que permite un diagnostico mas rápido que beneficia al paciente.

Cada día hay mas evidencia genética que sugiere que la mayoría de las levaduras comensales establecidas en el paciente en el momento de la hospitalización son la fuente de infección posterior (Walsh y Merz, 1986; Reagan et al., 1990; Voss et al., 1994). Pero así como los pacientes tienen este tipo de microbiota, también lo tiene el personal médico que interactúa con el paciente y los parientes que lo visitan. Por lo tanto existe la posibilidad de que estos hongos levaduriformes se transfieran de terceras personas a pacientes susceptibles (Sadhu et al.,. 1991, Ruiz et al., 1997;).

El análisis sobre la diversidad genética en aislamientos de hospitales ha sugerido que hay cepas mas altamente concentradas en áreas geográficas particulares; por lo que se sugiere que hay aislamientos endémicos en algunos hospitales. Se ha observado que alguno de estos aislamientos es el responsable de brotes de candidosis.

El estudio del HJM, no se pudo analizar correctamente la epidemiología de infecciones nosocomiales por *C. albicans,* porque es compleja y el mecanismo por el cual los pacientes adquirieron esta infección secundaria a su padecimiento no es clara.

En este estudio todos los aislamientos fueron obtenidos después de que los pacientes fueran hospitalizados por lo que es difícil saber con certeza si la cepa que originó la infección es de la microbiota del paciente o adquirida en el hospital. Sin embargo, el haber encontrado el mismo genotipo en varios de los pacientes (27%), sugiere que la candidosis resultó de una fuente exógena, ya sea de cepas endémicas en el hospital o transmitidas por el personal paramédico o médico que atiende al paciente.

Debido a los resultados de este estudio, se sugiere que es muy importante realizar la vigilancia epidemiológica para determinar el origen de la enfermedad nosocomial, establecer la relación que existe entre los organismos comensales antes de presentar síntomas en el momento de la hospitalización (tomar muestra y genotipificar a la especie de *Candida).* Esto nos permitirá compararlas con los aislamiento cuando presenta la infección, definir la frecuencia de infección a partir del personal médico y paramédico; y como es la microevolución de las cepas endémicas en las instalaciones hospitalarias.

PARTE 7. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 4 especies de *Candida*, de las cuales *C. albicans* es la mas frecuente con un 80.3% en pacientes con candidosis del Hospital Juárez de México-OPD-Ssa.

2. La identificación fenotípica producen en ocasiones inconsistencias: tiempo mas prolongado para diagnostico seguro de candidosis, falsos positivos, etc.

3. Por métodos bioquímicos se identifico a 5 especies de *Candida: C. albicans, C.tropicalis, C. glabrata, C. parapsilosis y C. paratropicalis*. Por métodos moleculares se identificaron y corroboraron 4 especies: *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata y C.parapsilosis.*

4. La identificación molecular de las especies es más rápida y acertada, debido a que la identificación de género-especie se realiza aproximadamente en un tiempo de 3-5 días (incluye extracción de ADN, amplificación de los productos con los ITS`s, y restricción de los mismos). Mientras que la identificación fenotípica requiere de un tiempo aproximado de 11-13 días por las observaciones del Examen Directo, Cultivos, pruebas biológicas, pruebas bioquímicas, y CHROMagar.

5. La presencia del mismo genotipo (4,6) en diferentes pacientes, sugiere que en algunos casos hubo infección intrahospitalaria.

6. Un paciente puede presentar de un solo aislamiento, mezcla de diferentes especies de *Candida* y episodios recurrentes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS

Aguchmi S, Iommah C, Hiban I. and Anaka K. *"Isolation and characterization of a repeated sequence (RPS1) of Candida albicans"*, Journal of General Microbiology (1992) **138:** 1893-1900.

Anaissie E. J. "*Opportunistic mycosis in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review".* Clin. Infect. Dis. (1992). **14:** S43–S51.

Arancia S, Sandini S, Cassone A, De Bernardis F, *"Use of 65kDa mannoprotein gene primers in PCR methods for the identification of five medically important Candida species"* Molecular and Cellular Probes (2009), **23**: 218-226.

Arenas R. "*Micología medica*" ilustrada 3a edición ed. Mc Grw hill Interamericana México. D. F. (2008).

Barada G. Basma R. and Khalaf R. *"Microsatellite DNA Identification and Genotyping of Candida albicans from Lebanese Clinical Isolates"* Mycopathologia (2008) **165:**115–125.

Bonifaz T.A. *"Micología medica básica"* Ed. Méndez México D.F. (2010); **21**: 279-300.

Botterel F., C. Desterke, C. Costa and S. Bretagne, "*Analysis of microsatellite markers of Candida albicans used for rapid typing*". *J. Clin. Microbiol*. (2001), **39:** 4076–4081.

Brown AJ, Odds FC, Gow NA *"Infection-relatedgene expression in Candida albicans". Curr Opin Microbio* (2007) **10**: 307–313.

Butler G. Rasmussen M., Lin M., Santos M., Sakthikumar S.,Fitzpatrick, Groot P., Florian F. Schmitzberger F., Berriman M. etc. *"Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes"* Nature (2009) **459**: 657-662.

Caprilesa C., Essayag S., Abate T., Waard J., Pérez C., Olaizola C., Roselló A., Colella Ma. "*Extracción simplificada de ADN en especies de Candida"* Rev. Soc. Ven. Microbiol. (2005) **25**: 2.

Castaño I, Cormack B, De las Peñas A, "*Virulence of the opportunistic pathogen mushroom Candida glabrata*" Rev Latinoam Microbiol. (2006); **48**(2):66-9.

Castrillón L, Palma A, Desgarennes Ma. *"Importancia de las biopelículas en la práctica médica"* Dermatología Rev Mex (2010) **54**:14-24.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP., *"Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression."* Microbiol Mol Biol Rev (1998) **62**: 130–180.
Chávez-Galarza Julio, **Célia Pais and Paula Sampaio** "*Microsatellite typing identifies the major clades of the human pathogen Candida albicans"* Infection, Genetics and Evolution (2010); **10**: 697-702.

Clement K.M. Tsui, Heide-Marie Daniel, Vincent Robert, Wieland Meyer. "*Re-examining the phylogeny of clinically relevant* Candida *species and allied genera based on multigene analyses",* FEMS Yeast Research (2008); **8:** 511-666.

Colombo A, Melo A, Robert F, Crespo R, Salomão R, Briones M, Hollis R, Messer S and Pfaller M. *"Outbreak of Candida rugosa candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy"* Elsevier (2003) **46**: 253-257.

Dietmaier W., Wallinger S., Bocker T., Kullmann F., Fishel R. and Ruschoff J. "*Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression*". Cancer Res. (1997); **57:** 4749-4756.

Ellegren H. "*Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution"* Reviews (2004) **5**.**Enache-Angoulvant A, Bourget M, Brisse S, Stockman-Pannier C, Diancourt L, François N, Rimek D, Fairhead C, Poulain Daniel and Hennequin C.** ***"****Multilocus Microsatellite Markers for Molecular Typing of Candida glabrata: Application to Analysis of Genetic Relationships between Bloodstream and Digestive System Isolates"* Journal of Clinical Microbiology (2010) **48**: 4028-4034.

Fitzpatrick TB. "*Invasive candidiasis",* Infect. Dis. Clin. (2006) **20** (3): 485–506.

Foulet F., Nicolas N., Eloy O., Botterel F., Gantier J., Costa J., and Bretagne S. *"Microsatellite Marker Analysis as a Typing System for Candida glabrata"* Journal of Clinical Microbiology (2005) **43:** 4574-4579.

Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti M., Sutcliffe J.S., Richards S., Verkerk A.J., Holden J.J., Fenwick R.G. Jr., Wamen S.T., Oostra B.A., Nelson D.L. and Caskey C.T. *" Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Shermna paradox"* Cell (1991); **67**: 1047-1058.

Georgy A., Vishwas S., Gopalkrishna B., Shalini S. and Shivananda P. *"Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by Candida albicans causing candidiasis in diabetic patients"* Revista Iberoamericana de Micologia (2009); **26**(3): 202–205.

Hawser S. P. and Douglas L J., *"Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro."* Infect Immun. (1994), **62(3):** 915–921.

Hermoso D., MacCallum D., Lott T., Sampaio P., Serna Ma., Grenouillet F., Klaassen C., and Bretagne S. *"Multicenter Collaborative Study for Standardization of*

Candida albicans Genotyping Using a Polymorphic Microsatellite Marker" J. Clin. Microbiol. (2010) **48**: 2578-2581.

Hornby J., Jensen E., Lisec A., Tasto J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P. and Nickerson K. *"Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus Candida albicans Is Mediated by Farnesol",* American Society for Microbiology (2001) **67**: 2982-2992.

Jarne, P., Lagoda, P.J.L., "*Microsatellites, from molecules to populations and back."* Trends Ecol. Evol (1996),**11:** 424–429.

Karkowska J., Rapala M., Kozik A., *"Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus."* Acta Biochim Pol. 2009; **56**(2):211-24.

Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K and Soll*. "Frequency, intensity, species, and strains of oral Candida vary as a function of host age"* Journal of Clinical Microbiology (1996) **34**: 2246-2254.

Kojic E. and Darouiche R. "*Candida Infections of Medical Devices".* Clinical Microbiology Reviews (2004) **17:** 255-267.

Kuleta J., Kozik Ma., and Kozik A. "*Fungi Pathogenic to humans: molecular bases of virulence of candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus"* Review (2009) **56**: 211–224.

Laffey S. and Butler G. "*Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis"* Microbiology (2005), **151**: 1073–1081.

Leaw SN; Chang HC; Sun HF; Barton R; Bouchara GP; Chang TC. *"Idnetification of medically important Candida and no- Candfida Yeast Species by Secquence analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions"*. Joural of Clinical Mycrobilogy (2006) **44:** 693-699.

Li J. and Bai F. *"Single-strand conformation polymorphism of microsatellite for rapid strain typing of Candida albicans"* Medical Mycology (2007) **45**: 629-635.

Lim S., McRobb L., Lim M., Carter D. *"A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes"* Fungal Genetics and Biology, Elsevier (2004) **41**:1025–1036.

López MR; Méndez TLJ; Hernández HF; Castañón ER. "*Micología medica, procedimientos para el diagnostico de laboratorio"*- Editorial Trillas. Mex. D.F. (2006) **7**: 99-107.

López MR; Méndez TLJ; Gayosso M.P., Hernández HF. *"Micología medica, clínica, diagnostico y terapéutica*".- Editorial Méndez. Mex. D.F. (2009) **13**: 131-139.

Maristela B., Souza I., Abreu C., Martinna B., Holandino C., Alviano C., *"Effect of serine-type protease of Candida spp. isolated from linear gingival erythema of HIV-positive children: critical factors in the colonization",* J Oral Pathol Med. (2010); **39**: 753-760.

Martinez E., Garcia J., Calvo M., Carrasco R., Padilla F., Lòpez Z., Mayorga J, Arenas R. *"Candidiasis cuatena:utilidad del CHROMagar Candida en la identificación de especies"* Dermatologia Rev Mex. (2008) **52**: 121-6.

Matsukod OI, T-Michioh Omma, Ariyac Hind, Dam Porn and Kenjit Anaka. *"Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important Candida species"* Journal of General Microbiology (1992), **138:** 2243-2251.

Méndez TLJ; López MR; Hernández HF. "*Actualidades en Micologia medica: VIII Diplomado en micología medica Dr. Teofilo Herrera".* Facultad de Medicina, UNAM. (2010); **36:** 233-258.

Mirhendi H., Makimura K., Khoramizadeh M. Yamaguchi H. *"A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida Species"* Jpn. J. Med. Mycol (2006) **47**: 225-229.

Mitchell A.P., *"Dimorphism and virulence in Candida albicans "* Elsevier Science (1998) **1**: 687-692.

Mohammed A. Al-Fattani and Douglas J. *"Penetration of Candida Biofilms by Antifungal Agents"* Clinical Microbiology Reviews (2004) **48**: 3291-3297.

Molina R. "*Morbilidad de la candidiasis urogenital*" SUIVE, Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica (2009) **26**.

Mujica M., Finquelievich J., Jewtuchowicz V., Iovannitti C. "*Prevalencia de Candida albicans y Candida no albicans en diferentes muestras clínicas* Período 1999-2001*"* Rev. argent. microbiol (2004) **36**: 1851-7617.

Negri M., Martins A., Henriques M., Svidzinski TI., Azeredo J., Oliveira R.; *"Examination of potential virulence factors of Candida tropicalis clinical isolates from hospitalized patients"* Mycopathologia. (2010) **169:**175-82.

Nielsen, R., Palsboll, P.J., *"Single-locus tests of microsatellite evolution: multi-step mutations and constraints on allele size."* Mol. Phylogen. Evol. (1999), **11:** 477–484.

Walsh, T. J. and Merz, W. G. *"Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of Candida tropicalis". Am J Clin Pathol* (1986); **85**: 498–502.

Palsboll J., Bérubé M. and Hanne J. "*Multiple Levels of Single-Strand Slippage at Cetacean Tri- and Tetranucleotide Repeat Microsatellite Loci*" Genetics. (1999); **151:** 285-296.

Pfaller, M. A. "*Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing".* Clin. Infect. Dis. (1995) **20:** 1535–1539.

Pfaller, M. A., Jones R. N., Doern G. V., Sader H. S. and Hollis R. J. *"Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission".* Clin. Infect. Dis. (1996) **22:** S89–S94.

Pfaller, M. A., Jones R. N., Doern G. V., Sader H. S., Hollis R. J., and Messer S. A.. *"International surveillance of bloodstream infections due to Candida species: frequency of occurrence and antifungal susceptibility ofisolates collected in 1997 in the United States, Canada and South America for the SENTRY Program*". J. Clin. Microbiol. (1998) **36**: 1886–1889.

Pfaller, M. A., Jones R. N., Messer S. A., Edmond M. B., Wenzel R. P. and SCOPE Participant Group. "*National surveillance of nosocomial blood stream infections due to species of Candida other than Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility* "(1998).

Portela MB, Souza IP, Abreu CM, Bertolini M, Holandino C, Alviano CS, Santos AL, Soares RM. *"Effect of serine-type protease of Candida spp. isolated from linear gingival erythema of HIV-positive children: critical factors in the colonization".* Oral Pathol Med. (2010); **39** (10):753-60.

Reagan, D. R., Pfaller M. A., Hollis R. J., and Wenzel R. P. *"Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe"*. J. Clin. Microbiol. (1990) **28:** 2733–2738.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. *"Nosocomial Infections in Pediatric Intensive Care Units in the United States"* Pediatrics (1999) **103:** 39.

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP ***"****Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States"* Infect Control Hosp Epidemiol. (2000) **21:** 510-5.

Rosehart K., Richards M. and Bidochka M. *"Microsatellite analysis of environmental and clinical isolates of the opportunist fungal pathogen Aspergillus fumigatus"* J. Clin. Microbiol. (2002) **51**:1128-1134.

Ruiz-Diez, Martínez B., V., Álvarez M., Rodríguez-Tudela J. L., and Martínez-Suarez J. V. "*Molecular tracking of Candida albicans in a neonatal intensive care unit: long-term colonizations versus catheter-related infections*". J. Clin. Microbiol. (1997) **35:** 3032–3036.

Rupinder Kaur, Renee Domergue, Margaret L Zupancic and Brendan P Cormack *"Candida glabrata and its interaction with the host",* Microbiol. (2005); **8(**4):378-84.

Sabino Raquel, Paula Sampaio, Laura Rosado, David A. Stevens, Karl V. Clemons, and Célia Pais. "*New Polymorphic Microsatellite Markers Able To Distinguish among Candida parapsilosis Sensu Stricto Isolates*" Journal of Clinical Microbiology, (2010); **48**: 1677-1682.

Sadhu, C., McEachern M. J., Rustchenko-Bulga E. P. c, Schmid J., Soll D. R., and Hicks J. *"Telomeric and dispersed repeat sequences in Candida yeasts and their use in strain identification".* J. Bacteriol. (1991) **173**: 842 –850.

Sague C. M., and Jarvis W. R*. "National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990"* J. Infect. Dis. (1993) **167**: 1247–1251.

Sampaio P., Gusmao L., Alves C., Piña-Vaz C., Amorim A., and Pais C. *"Highly Polimorphic Microsatellite for Candida albicans Strains".* J. Clin. Microbiol. (2003) **41**: 552-557.

Sampaio P., Gusmao L., Correia A., Alves C., Rodrigues A., Piña-Vaz C., Amorim A., Pais C. *"New Microsatellite Multiplex PCR for Candida albicans Strain Typing Reveals Microevolutionary Changes"* J. Clin. Microbiol. (2005) **43**: 3869-3876.

Sampaio P., Correia A., Gusta L., Amorim A., and Pais C. *"Sequence analysis reveals complex mutational processes for allele length variation at two polymorphic microsatellite loci in Candida albicans"* Comunicating Current Research and Educational Toipcs and Trends in Applied Microbiology (2007) 926-935.

Scannell Devin R., Butler Geraldine, Wolfe Kenneth H*." Yeast genome evolution—the origin of the species"***.** YEAST, (2007) **24:** 929-942.

Schofield D, Westwater C., Warner T., Balish E*., "Differential Candida albicans lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection"* Microbiology (2005) 359–365.

Sendid B., Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D, Poulain D. "*Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic Candida species"*. J. Med. Microbiology (2002); **51**: 433-442.

Silva S., Henriques M., Martins A., Williams D., Azeredo J. and Oliveira R. *"Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition" Medical Mycology* (2009) **47**:681–689.

Sinden R.R. "*Biological implications of the DNA structures associated with diseased causing triplet repeats*" Am. J. Hum. Genet. (1999); **64**: 346-353.

Sinden R.R., Potaman V.N., Oussatcheva E.A., Pearson C.E., Lyubchenko Y.L. and Shlyakhtenko L.S. *"Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA".* J. Biosci. (2002); **27**: 53-65.

Sobel, J. D. *"The emergence of non-albicans Candida species as causes of invasive candidiasis and candidemia"*. Current. Infection. Disease Rep. (2006) **8:**427–433.

Soll, D. R., Galask R., Schmid J., Hanna C., Mac K., y Morrow B. "*Genetic dissimilarity of commensal strains carried in different anatomicallocations of the same healthy women".* J. Clin. Microbiol. (1991) **29:** 1702–1710.

SUIVE, Secretaria de Salud. (2009); FALTA.

Quindós G., Vidal Ma. y Eraso E. *"Actividad de la micafungina contra las biopelículas de Candida"* Rev. Iberoam. Micol. (2009) **26**:49-55.

Tavanti A., Hensgens L., Mogavero S., Majaros L., Senesi S., Campa M. *"Genotypic and phenotypic properties of Candida parapsilosis sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites"* Microbiology (2010) **10**:203.

Verkek A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F.P., Eussen B.E., van Ommen G.J.B., Blonden L.A.J., Riggins G.J., Chastain J.L., Kunst C.B., Galijaard H., Caskey C.T., Nelson D.L., Oostra B.A. y Wamen S.T. *"Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat conincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome".* Cell. (1991); **65**: 905-914.

Voss, A., Hollis R. J., Pfaller M. A.,. Wenzel R. P, y Doebbling B. N. *"Investigation of the sequence of colonization and candidemia in non-neutropenicpatients".* J. Clin. Microbiol. (1994) **32:** 975–980.

Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. "*Identification of Candida species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA".* J Clin Microbiol. (1995); **33**:2476–2479.

Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. *"Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study"* Arch Intern Med. (1989) **149**:2349-53.

Yu S., Pitchard M., Kremer E., Lynch M., Nancarrow J.,Baker E., Holman K., Mulley J.C., Wamen S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R. y Richards R.I. *"Fragile X*

genotype characterized by an unstable región of DNA". Science. (1991); **252:** 1179-1181.

Yu S., Mangelsdorf M., Hewett D., Hobson L., Baker E., Eyre H.J., Lapsys N., Le Paslier D., Doggett N.A., Sutherland G.R. y Richards R.I. *"Human chromosomal fragile site FRA168 is an amplified AT-rich minisatellite repeat".* Cell. (1997); **88**: 367-374.

Paginas de Internet:

www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf

www.elsevier.es/reviberoammicol

www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-12-2005/.../07.pdf

www.vi.cl/foro/topic/7490-genetica-teoria-apuntes/page__st__60

www.dibico.com

www.bd.com/ds/technicalCenter/

www.bd.com/resource

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8522/

www.elsevier.es/reviberoammicol

www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromoeuc/cromoeuc.htm

9. APENDICE

EXAMEN DIRECTO (ED) con KOH 20%. Disuelve rápidamente las células permitiendo digerir el material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación. Adicionalmente, se puede emplear colorantes para impegmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización Formula: Hidróxido de potasio 20 g, Glicerol 20 ml, Agua destilada 60 ml. Otra alternativa es la tinción de Azul de lactofenol: Fenol, concentrado 20 ml, Acido láctico 20 ml, Glicerol 40 ml, Azul de lactofenol.0.50 g, Agua destilada .20 ml.

TINCION DE GRAM. Se basa en la composición y estructura de la pared celular, que determina que unos microorganismos retengan el primer colorante, en tanto que otros lo pierdan, lo que les permite reaccionar con el colorante de contraste. Su composición es:

Cristal violeta: Colorante primario e imparte su color a todos los microorganismos. Cristal violeta 2.0 g, Etanol (95%) 20,0 mL.

Solución de Yodo, Lugol: Actua como mordente (aumenta o refuerza la union entre el coorante y el sustrato, formando un complejo cristal violeta-iodo-ribonucleato de magnesio). Yodo 1,0 g, Yoduro de potasio 2,0 g, Agua 300,0 mL.

Alcohol-acetona: Actua como decolorante, disolviendo y arrastrando fuera de las celulas (la decoloracion solo se lleva a cabo en las bacterias Gram negativas) al colorante primario. Etanol (95%) 700,0 mL, Acetona 300,0 mL.

Solución de Safranina: Imparte el color solo a las bacterias que durante a la decoloracion perdieron al colorante primario. Safranina 0,25 g, Etanol (95%) 10,0 mL, Agua 100,0 mL

Procedimiento:

-Fijar el frotis en un portaobjetos (marca CORNING) directamente a la flama

-Teñir con cristal violeta (GOLDEL DELL) ante 1 minuto

-Lavar ligeramente con agua

-Cubrir la preparación con lugol durante (marca GOLDEN BELL) por 1 minuto

-Lavar ligeramente con agua

-Teñir con alcohol acetona (marca: GOLDEN BELL) por 20 segundos

- Lavar ligeramente con agua

-Teñir de contraste con safranina (marca: GOLDEN BELL) ante 1 minuto
-Lavar ligeramente con agua y dejar secar

MEDIOS

ADS (Agar Dextrosa de Sabouraud, Bio Rad): Medio rutinario para el primoaislamiento y conservación de diversos hongos principalmente para el cultivo de hongos patógenos. La alta concentración de dextrosa y la acidez del pH hacen a éste un medio selectivo para hongos. En este medio las peptonas proveen la fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos, la dextrosa actúa como fuente de energía y el agar es agregado como agente solidificante.
Dextrosa 20g. Peptona 10g. Agar bacteriológico 20g. Agua destilada 100ml.
pH = 6.5. Se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 minutos.

Micosel: Medio selectivo para aislamiento de especies de hongos patógenos de lento crecimiento a partir de diversas muestras que puedan tener alto contenido de flora bacteriana. La peptona y la dextrosa proporcionan la fuente de nutrientes utilizadas para el crecimiento de los hongos. Se pueden sembrar medios inclinados en tubo o en cajas de Petri estériles por duplicado. Agar 15.5g, Dextrosa 10g, Peptona de soya 10g, pH=6.5incubar a 25º y a 35ºC.

Agar Harina de maiz tween 80 %*l.* Su uso se basa en el cultivo de hongos, pero también particularmente se usa para observar la morfología de *Candida* debido a ala capacidad que tiene para estimular a las especies de *Candida* y producir calmidoconidia. La harina de maíz contiene suficientes nutrientes para ayudar al crecimiento de hongos: Agar 20 g, Harina de maíz 62 g, Glucosa 20 g, Agua destilada 1000 ml.

CHROMagar *TM Candida:* Medio Cromogenico para el aislamiento y diferenciación de las especies mas importantes de *Candida*. Peptonas suministran los nutrientes. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de

confirmación. El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos. Formula: Cromopeptona 10,0 g, Glucosa 20,0 g, Mezcla cromógena, 2,0g, Cloranfenicol 0,5g, Agar 15,0g, pH 6,0 ± 0,3.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

API YEAST 20 C (*bioMèriux*): Sistema para identificación precisa de levaduras que se encuentran más frecuentemente. Esta galería esta constituida por 20 cúpulas que contienen carbohidratos deshidratados y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación.

Auxocolor TM 2 (*Bio Rad*)**:** Sistema colorimétrico basado en la asimilación de diferentes azucares característico de las diferentes levaduras. Cada azúcar se deshidrata en presencia de un medio básico y de un indicador de pH (púrpura de bromocresol).

REACTIVOS PARA EXTRACCION DE ADN:

Buffer de lisis:

1 % SDS (10 %) = 1ml
10 mM EDTA (0.5 M) = 2ml
10 mM Tris (1M) = 1ml
Aforar con agua MQ estéril a 100ml

Bromuro de etidio 1 mg/ml: Añadir 1g de bromuro de etidio a 100ml de agua. Colocarlo en un contenedor de alumnio y mantenerlo en obscuridad y mantenerlo a 4ªC**.**

NaCl 5M: Disolver 87.6 g de NaCl en 920ml de H2O, Ajustar el volumen a 1litro. Esterilizar en autoclave.

Acetato de amonio 5M Disolver 385 g de acetato de amonio en 800ml de agua ajustar el volumen a 1 L. Esterilizar por filtración.

Acetato de potasio 5M: A 60mL de Acetato de potasio 5M y añadir acido acético glacial y 28.5 ml de agua. El resultado es solución 3M de potasio y 5M de acetato.

Proteinasa K: La concentración de la reacción es de 50 microgramos/ mL, almacenar a – 20 º C , el buffer de reacción es : 0.01M Tris (pH 7.8), 0.005M EDTA, 0.5% SDS. La solución stock es 20 mg/ml de agua.

RNAsa. Disolver RNAasa pancreatico a una concentración de 10mg/ml en 10mM Tris.Cl (pH 7.5) y 15 mM NaCl. Calentar a 100ºC por 15 min y después que se enfrié a temperatura ambiente lentamente y almacenar a -20 º C.

TE pH 8 : Tris 10mM + EDTA 5mM

Tris (1M): Disolver 121.1 g de Tris en 800ml de agua. Ajustar el pH 8 adicionando 42ml de HCl. Esterilizar en autoclave

EDTA 0.5M (pH 8): 186.1 Disodico ácido etilendiaminotetraacético en 800ml de agua. Ajustar el pH 8 con NaOH (aproximadamente 20g de patilla de NaOH)

Distribuir en partes alícuotas y esterilizar por autoclave

SDS al 1 %

SDS 10 g

Agua desionizada 990 ml

Ajustar a pH 7.2 adicionando gotas de HCl Ajustar el volumen a 1 L

Almacenar a temperatura ambiente

Características de la enzima Msp 1.

Moraxella sp. Es una bacteria gram negativa en forma de diplococo	Sitios de corte de la enzima 5'...CCGG...3' 3'...GGCC...5' Se inactiva a 65ºC/15 minutos