



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“IDENTIFICACION DE LOS GENOTIPOS QUE  
CONFIEREN RESISTENCIA A ANTIMICOTICOS EN  
CEPAS DE *Candida albicans* DE ORIGEN VAGINAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**SELMA EUGENIA MEDINA GARCIA**

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Proyecto financiado por la DGAPA, UNAM, PAPIME PE200209.

México D.F., 2010.





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*... andéis como es digno de la vocación con que  
fuiste llamados, con toda humildad y  
mansedumbre, soportándoos con paciencia los  
unos a los otros en amor, ... Efe. 4:1-2*

## DEDICATORIA

A *Yolanda García Elizarrarás*, mi madre, la cual ha sido los cimientos de la persona que he logrado ser. Ha sido mi apoyo, mi pilar y con este escrito su esfuerzo y esmero se ve concluido. Porque me ha dado la mejor de las armas, mi educación. Y porque a partir de este momento, su responsabilidad social ha terminado al formar a una profesionista. Te amo mamá.

A Javier Medina Arrieta, mi padre, por haber apoyado económicamente a este desempeño.

A mi abuela Yolanda Elizarrarás por su constante preocupación y apoyo durante tanto tiempo. Te amo abu.

A Omar García por ponerle la chispa a mi vida y por dar palabras de aliento para ser mejor día a día. Te amo negro.

A toda esa gente especial con la cual compartí cuatro años de la mejor etapa de mi vida, a los que fueron mis hermanos, con quienes compartí noches enteras de risa, alegrías y tristezas, a mis amigos Felipe Martínez, José Torres, Diana Alvarado, Williams Chávez, Carmen Martínez, Adrian Navarro y Edgar Mancilla.

Y no menos importante, al contrario, a Dios, por darme las fuerzas y la capacidad. Por no soltar mi mano en momentos de angustia y por proveerme de lo indispensable incluso más de lo necesario para seguir adelante.

*Y todo lo que hagáis, hacedlo de corazón, como para el Señor y no para los*

*hombres; . . . Col. 3:23*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la M. en C. Gloria Luz Paniagua y al M. en C. Eric Monroy por asesorarme en esta parte de mi formación. A mis compañeros de laboratorio Miguel Núñez, Angélica Cetina y Stephanie Segura, por su complicidad y amabilidad. Y a las profesoras; Biol. Patricia Sánchez Yañez y a la Biol. Susana Esther González Almazán por su paciencia y amabilidad.

## INDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Características de <i>Candida albicans</i></b>	
<b>2.2. Candidosis vulvovaginal</b>	
<b>2.3. Factores de virulencia</b>	
<b>2.4. Tratamiento de la candidosis vulvovaginal</b>	
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>17</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>6.1. Selección de pacientes y toma de los productos</b>	
<b>6.2. Extracción de ADN</b>	
<b>6.3. Detección de <i>C. albicans</i> por PCR multiplex</b>	
<b>6.4. Detección de <i>HWP1</i> de <i>C. albicans</i> por PCR</b>	

- 6.5. **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de miconazol, 5- fluorocitosina y anfotericina B en las cepas de *C. albicans* por el método de microdilución en placa**
- 6.6. **Detección de los genes *CDR1*, *MDR1* y *ERG11* que confieren resistencia a los azoles**
- 6.7. **Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en geles de agarosa**

## **7. RESULTADOS.....29**

- 7.1. **Pacientes analizadas**
- 7.2. **Frecuencia de candidosis vulvovaginal (CVV) en las mujeres estudiadas**
- 7.3. **Identificación de *C. albicans* por PCR multiplex**
- 7.4. **Detección de *HWP1* de *C. albicans* por PCR**
- 7.5. **Determinación de la CMI a los antimicóticos**
  - 7.5.1.1.1. **Miconazol**
  - 7.5.1.1.2. **5- fluorocitosina**
  - 7.5.1.1.3. **Anfotericina B**



7.6.	Detección de los genes <i>CDR1</i> , <i>MDR1</i> y <i>ERG11</i> que confieren resistencia a los azoles	
8.	DISCUSIÓN.....	40
8.1.	Pacientes analizadas	
8.2.	Detección de <i>HWP1</i> de <i>C. albicans</i> por PCR	
8.3.	Determinación de la CMI a los antimicóticos	
	8.3.1.1.1.1. Miconazol	
	8.3.1.1.1.2. 5- fluorocitosina	
	8.3.1.1.1.3. Anfotericina B	
8.4.	Detección de los genes que confieren resistencia a los azoles	
9.	CONCLUSIONES.....	47
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	48

## 1. RESUMEN

La adhesión de las hifas de *Candida albicans* a la superficie de las células epiteliales vaginales se debe a la proteína de superficie Hwp1 (hyphal wall protein), codificada por el gen *HWP1*. En los últimos años el tratamiento de la candidosis vulvovaginal (CVV) se ha complicado debido a la selección de cepas resistentes a los azoles. El objetivo de este trabajo fue detectar la frecuencia de *HWP1*, la determinación de la concentración mínima inhibitoria de miconazol, 5-fluorocitosina y anfotericina B en las cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con vulvovaginitis crónica, así como la frecuencia en la que los genes *CDR1*, *MDR1* y *ERG11* que codifican la resistencia a los azoles se presentan. La identificación de *C. albicans* y de los genes *HWP1*, *CDR1*, *MDR1* y *ERG11* se realizó por PCR convencional. La determinación de la CMI a los antimicóticos en las cepas de *C. albicans* se realizó por el método de dilución en placa. La edad de las pacientes analizadas se encontró comprendida en el intervalo de 18-81 años. Se realizaron 264 exudados vaginales en mujeres que acudieron al Hospital Regional No. 72 del IMSS con signos y síntomas de CVV. *C. albicans* fue identificada por PCR en el 18.93% (n = 50) de las pacientes. El gen *HWP1* se detectó en el 92% (n = 46), *CDR1* en el 16% (n = 8) y *ERG11* en el 66% (n = 33). Los resultados mostraron que el marcador de virulencia *HWP1* de *C. albicans* y los genes que confieren resistencia a los antimicóticos *CDR1* y *ERG11* se encontraron asociados con la CVV de las pacientes, por lo que fue necesario prescribir el tratamiento médico correspondiente.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Características de *Candida albicans*

La primera descripción para *Candida albicans* fue *Oidium albicans*, propuesta por Robin en 1853. En 1890 Zopf la denominó *Monilia albicans*, y en 1923 Berkhout, fue quien propuso la denominación actual (Bial, 2002). *Candida albicans* es un hongo levaduriforme y diploide, Grampositivo, que puede formar pseudohifas, hifas y blastoconidios (Kravets *et al.*, 2010). Estos organismos asimilan y fermentan azúcares (Jawetz *et al.*, 1996). Presentan numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas con una pared gruesa (8-16  $\mu\text{m}$  de diámetro). *C. albicans* se encuentra asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente, es un comensal de las mucosas del tracto intestinal y vaginal (Odds, 1988).

*C. albicans* puede provocar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (SIDA, quimioterapia por cáncer, antibioticoterapia, diabetes mellitus, neutropenia, etc.) (Castrillón *et al.*, 2004) o infecciones en boca (algodoncillo), piel, uñas, pulmones, vulvovaginitis y otros órganos (Jawetz *et al.*, 1996).

*C. albicans* hoy en día se encuentra con la siguiente taxonomía (Bial, 2002): del phylum *Ascomycota*, subphylum *Ascomycotina*, de la clase *Ascomycete*, orden *Saccharomycetales* de la familia *Saccharomycetaceae* y del genero *Candida*.

## 2.2. Candidosis vulvovaginal

La candidosis vulvovaginal (CVV) es una de infecciones más comunes en mujeres de edad reproductiva (Foxman *et al.*, 1998; Reed 1992; Sobel *et al.*, 1998). Aproximadamente el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio de CVV durante su vida, con elevada morbilidad (Moreira & Paula 2006). En nuestro país las estadísticas de la CVV a nivel nacional son muy escasas, tan sólo se encuentran las reportadas por algunas instituciones de salud y por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el cual ha reportado que la vulvovaginitis se encuentra entre los 12 principales motivos de consulta en medicina familiar (Velasco *et al.*, 1999; Oviedo *et al.*, 2004), con una elevada incidencia por *Candida albicans* (Martínez *et al.*, 2007). En los EUA anualmente se reportan 13 millones de casos

de CVV (Sobel 1998; Ferrer J, 2000) *C. albicans* es el agente causal del 85-90% de los casos de CVV, mientras que el 20% son ocasionados por otras especies, como *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, entre otras (Furneri *et al.*, 2008; Sobel *et al.*, 1998). Existen varios factores externos que predisponen a la CVV, como el uso de antibióticos y anticonceptivos orales, la diabetes mellitus no controlada y los altos niveles de estrógenos durante el embarazo (Dorko *et al.*, 2005). En ausencia de estos factores de riesgo, la CVV ocurre frecuentemente en la fase lútea del ciclo menstrual, en la cual los niveles de estrógenos se encuentran elevados. En contraste las mujeres postmenopáusicas con bajos niveles de estrógenos raramente sufren de CVV (Fidel *et al.*, 2000). Los estrógenos favorecen la transición de células epiteliales de columna a células escamosas estratificadas, facilitando la adherencia y crecimiento de *C. albicans*, además de que las células levaduriformes poseen receptores para los estrógenos que permiten la formación de micelio (Nas *et al.*, 2008). De esta manera la asociación entre los altos niveles de estrógenos y la incidencia de colonización o de infecciones vaginales por *C. albicans* puede deberse a los efectos de los estrógenos en el hospedero (Cheng *et al.*, 2006).

### 2.3. Factores de virulencia

*C. albicans* posee varios factores de virulencia que incluyen la transición de levadura a hifa, cambio de fenotipo, secreción de enzimas hidrolíticas y adherencia celular (Cutler 1991; Odds 1994; Castrillón 2005).

El gen *HWP1* que codificada para la proteína Hwp1 (hyphal wall protein), involucrada en la adhesión a las células epiteliales, y que se encuentra presente en la pared celular de las hifas (Nas *et al.*, 2008). Hwp1 es una glicosilfosfatidilinositol (GPI), y juega un papel importante en la adherencia a las células epiteliales, pero no es requerida para su adhesión a las células endoteliales (Sundstrom *et al.*, 2002).

### 2.4 Tratamiento de la candidosis vulvovaginal (CVV)

Para el tratamiento médico de las infecciones ocasionadas por *C. albicans*, y de otras especies, se han desarrollado dos categorías

principales de antimicóticos; los Polienos (anfotericina B y nistatina), cuya unión al ergosterol de la membrana celular causa la formación de poros con la subsecuente liberación de componentes intracelulares y la muerte celular, y los Azoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, etc.) que inhiben la formación de la membrana celular al interferir con la síntesis del ergosterol (White, 1997). Otro antifúngico empleado contra *C. albicans* es la 5-fluorocitosina, cuya entrada a la célula es mediada por la citosina permeasa. Este compuesto es transformado a 5-fluorouracilo por la citosina deaminasa. El 5-Fluorouracilo es transformado en otros metabolitos que inhiben la síntesis de ADN y ARN fúngicos (Vermes, 2000). El desarrollo de estos antimicóticos ha aumentado las opciones terapéuticas, sin embargo el uso inadecuado e indiscriminado ha ocasionado con el tiempo que las cepas *C. albicans*, como de otras especies, se seleccionen como resistentes a los principales grupos de antifúngicos (Lee *et al.*, 2004; Perrea *et al.*, 2001). En *C. albicans* los mecanismos moleculares de resistencia a los Azoles incluyen la alteración de la enzima blanco citocromo P-450 lanosterol 14  $\alpha$ -demetilasa, ya sea por la sobreexpresión o por mutaciones puntuales del gene *ERG11* (Franz *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 2000; Manavathu *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1999;

Sanglard *et al.*, 1998). Un segundo mecanismo de resistencia a los Azoles es mediado por la expresión de proteínas transportadoras que funcionan como bombas de eflujo (bombas ABC), codificadas por los genes *CDR1* y *CDR2*, y también a proteínas facilitadoras codificadas por *MDR1* (Smith *et al.*, 2002). La expresión de *CDR* confiere la resistencia a múltiples azoles, mientras que la expresión de *MDR1* confiere solamente resistencia a fluconazol (Albertson *et al.*, 1996; López *et al.*, 1998; López *et al.*, 1999).

La selección de resistencia de cepas *C. albicans* a los antimicóticos ha tenido grandes repercusiones en los diferentes tipos de candidosis, incluyendo la vulvovaginal, en cuyo caso, las infecciones han pasado con el tiempo de simples candidosis vulvovaginal (CVV) a candidosis vulvovaginal recurrente (CVVR) o lo que es peor a candidosis vulvovaginal crónica (CVVC) (Pimentel, 2007).



### 3. ANTECEDENTES

- Arechavala y col. (2007) Evaluaron la sensibilidad al fluconazol y al albaconazol de 100 cepas de *Candida* spp. y aisladas de flujos vaginales de pacientes con candidosis.
- Perea y col. (2001) identificaron el gen *ERG11* que confiere resistencia a los azoles en cepas de *C. albicans* aisladas de muestras de pacientes con VIH (virus de la inmunodeficiencia humana).
- Innings y col. (2007) realizaron un estudio de PCR en tiempo real, para la detección de las ocho especies más comunes de *Candida* causantes de septicemia.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

- Detectar la frecuencia de los genes que confieren la resistencia a los antimicóticos en cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con vulvovaginitis, y determinar la concentración mínima inhibitoria de miconazol, 5-fluorocitosina y anfotericina B.

#### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificación de las cepas de *C. albicans* obtenidas de las mujeres con vulvovaginitis por PCR multiplex.
- Detección por PCR de el gen *HWP1* en las cepas de *C. albicans*.
- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de miconazol, 5-fluorocitosina y anfotericina B en las cepas de *C. albicans* por el método de dilución en placa.
- Identificación y detección de la frecuencia de los genes que confieren resistencia a antimicóticos *ERG11*, *CDR1* y *MDR1* en las cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con vulvovaginitis por PCR.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1. Selección de pacientes y toma de los productos

Para el desarrollo de este estudio se tomaron muestras vaginales de mujeres con patología de vulvovaginitis de la consulta de ginecología del Hospital General Regional 72 del IMSS, ubicado en el Municipio de Tlalnepantla, Edo. de México. Se incluyeron en este estudio a mujeres adultas; con y sin vida sexual activa, se excluyeron pacientes que se encontraban en tratamiento local o sistémico para vaginitis, que estuvieran menstruando, o con cáncer genital. A las pacientes seleccionadas, bajo firma de consentimiento informado se les realizó el interrogatorio y exploración física y obtención de muestras vaginales para estudios microbiológicos. Las muestras vaginales fueron tomadas por medio de hisopos estériles del cuello y de la pared del fondo del saco vaginal y se depositaron en el medio de transporte BHI (brain- heart- infusion). Las muestras vaginales fueron transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM. Las muestras vaginales contenidas en el medio BHI fueron incubadas a 37° C por 24 horas. Al término los

cultivos se sembraron en los medios sólidos; Agar sangre, eosina azul de metileno (EMB), S-110 y sabouraud y se incubaron a 37° C por 24 horas. El género *Candida* fue identificado por morfología colonial, microscópica (tinción de Gram).

## 6.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó por el método de ebullición. Para lo cual cada una de las cepas del género *Candida* fueron crecidas en agar Sabouraud a 37° C por 24 horas. Al término y por medio de asas estériles se tomaron varias colonias del crecimiento y se depositaron en tubos de rosca de 16 x 150 ml, que contenían 1 ml de agua desionizada estéril. Posteriormente los tubos fueron llevados a ebullición por 20 minutos, e incubados a 0° C durante 10 minutos posteriormente. Al término los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm/ 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y guardado a -20°C hasta su utilización para PCR.

### 6.3. Detección *C. albicans* por PCR multiplex

La detección de *C. albicans* y de otras especies del género (Tabla 1) por PCR multiplex se realizó por el método descrito por Luo & Mitchell (2002). Para lo cual primero se realizó un PCR sencillo de punto final con los oligonucleótidos universales para el grupo de hongos ITS1 e ITS4 (5 pmol). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25  $\mu$ l; 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido (TS1 y TS4), 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3  $\mu$ l de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Finalmente una extensión de 72°C por 15 minutos. Posteriormente se realizó el PCR multiplex con los oligonucleótidos CALB1 y CALB2 (5 pmol), CGL1 y CGL2 (7 pmol), CPA1e, CPA3f y CPA2 (6 pmol), y CTR1 y CTR2 (4 pmol). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25  $\mu$ l; 1  $\mu$ l de cada primer, 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3  $\mu$ l de ADN templado, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs

(PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del ADN se realizó bajo las mismas condiciones que para ITS1 e ITS4.

Espece	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')	Tamaños de los amplicones (pb)
Todos los hongos	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Variable
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>Candida albicans</i>	CALB1	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	273
	CALB2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	
<i>Candida glabrata</i>	CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT	423
	CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA1e	TTG GTA GGC CTT CTA TAT GGG	320
	CPA3f	GCC AGA GAT TAA ACT CAA CCA A	300
	CPA2	CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC	
<i>Candida tropicalis</i>	CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	357
	CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la detección de las distintas especies patógenas del género *Candida*.

#### 6.4. Detección de HWP1 de *C. albicans* por PCR

La detección de *HWP1* de *C. albicans* se realizó por el método descrito por Nas *et al.*, (2008). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25  $\mu$ l; 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido; Hwp1F (ATGACTCCAGCTGGTTC) y Hwp1R (TAGATCAAGAATGCAGC), 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa, 3  $\mu$ l de ADN molde, 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR beads). La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto; seguido de 45 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto. Finalmente una extensión de 72°C por 5 minutos.



#### 6.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de miconazol, 5-fluorocitosina y anfotericina B en las cepas de *C. albicans* por el método de microdilución en placa

La CMI de cada antimicótico se determinó por microdilución en placa de microtítulo de poliestireno (96 pozos), de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992). Para lo cual cada una de las cepas de *C. albicans* fueron crecidas en agar sabouraud (Bioxon, México) a 37° C por 24 horas. Obtenido el crecimiento óptimo, una colonia fue inoculada en 1 ml del medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) y se incubó a 37°C por 24 horas en atmosfera de CO<sub>2</sub>. Al término el cultivo fue diluido 1:100 en solución salina estéril y de nuevo 1:100 en RPM1640. La concentración final fue de 10<sup>4</sup> UFC/ml. Posteriormente se depositaron 100 µl del cultivo en cada pozo de la placa más 100 µl de las concentraciones dobles de miconazol (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.), 5-fluorocitosina (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) y anfotericina B (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) (Tabla 2). Como control positivo se depositaron 100 µl del

crecimiento de la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC 32354 y como control negativo 100  $\mu$ l del medio RPMI-1640. Las placas se incubaron a 37° C por 24 horas. Finalmente se efectuó la lectura de la absorbancia de las placas a 630 nm en un lector de ELISA, modelo Multiskan FC, marca Thermo (Labsystems, Helsinki, Finland).

Concentraciones de antimicóticos (ml)					
$\mu$ g/ml	Miconazol	$\mu$ g/ml	5-fluorocitosina	$\mu$ g/ml	Anfotericina B
25	0.125	8	0.040	0.250	1
12.5	0.062	4	0.020	0.120	0.500
6.25	0.031	2	0.010	0.062	0.250
3.12	0.015	1	0.0050	0.031	0.125
1.56	0.0075	0.50	0.0025	0.015	0.062
0.78	0.0037	0.25	0.0012		

Tabla 2. Concentraciones de antimicóticos utilizadas para la determinación de la CMI en las cepas de *C. albicans*.

## 6.6 Detección de los genes *CDR1*, *MDR1* y *ERG11* que confieren resistencia a los azoles

Los oligonucleótidos (Tabla 3) y el método que se utilizó para la detección de *CDR1*, *MDR1* y *ERG11* de *C. albicans* por PCR convencional fue el descrito por Lee *et al.*, (2004). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25  $\mu$ l; 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido (20 pmol), 3  $\mu$ l de ADN molde, 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.2  $\mu$ M de cada dNTPs. Las condiciones de amplificación fueron; 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Al término un ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
<i>CDR1</i>	forward primer	AAGAGAACCATTACCAGG
	reverse primer	AGGAATCGACGGATCAC
<i>MDR1</i>	forward primer	GGAGTTTAGGTGCTGT
	reverse primer	CGGTGATGGCTCTCAA
<i>ERG11</i>	forward primer	TGGAGACGTGATGCTG
	reverse primer	AGTATGTTGACCACCCATAA

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la detección de los genes que confieren resistencia a los antimicóticos por PCR convencional.

### 6.7. Análisis de las muestras amplificadas por electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación del ADN, 10 µl de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo las

siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con BrEt y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Pacientes analizadas

Para el desarrollo de este estudio se estudiaron 264 mujeres con patología de vulvovaginitis de la consulta de ginecología del Hospital General Regional 72 del IMSS. En la Figura 1 se observa que la edad de las mujeres estudiadas. El 30.30% (n = 80) de las pacientes tuvo una edad comprendida en el rango de 29-39 años, seguida de 18-28 con 28.78% (n = 76), de 40-49 con el 23.86% (n =63), 50-59 con el 12.12 % (n = 32) y 60-69 con 3.78% (n= 10). Los rangos minoritarios fueron de las edades que comprenden el rango de 70-79 y 80-89 años, teniendo 0.37% (n = 1) y 0.75% (n=2) respectivamente.

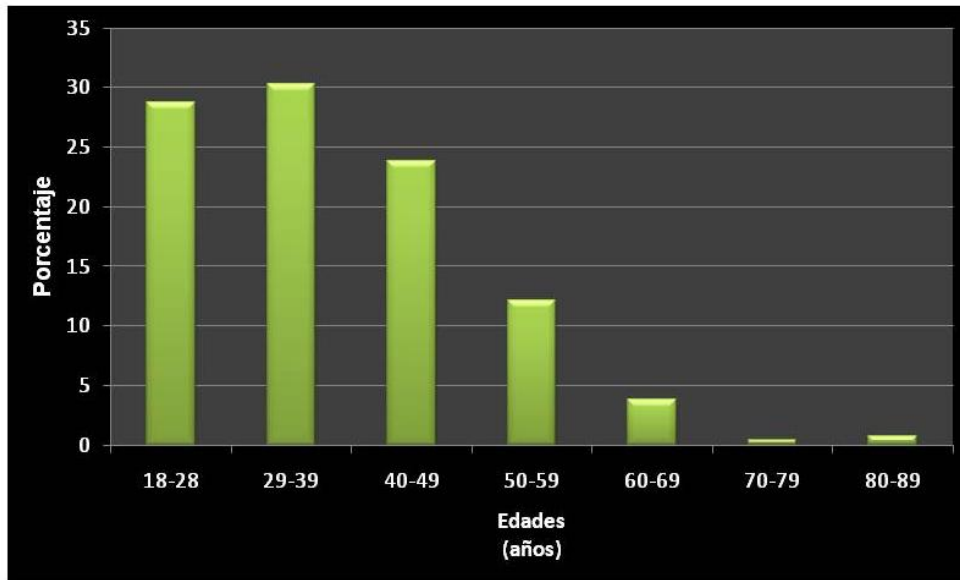


Figura 1. Distribución de las mujeres estudiadas por edad.

## 7.2. Frecuencia de candidosis vulvovaginal (CVV) en las mujeres estudiadas

El 18.93% (n = 50) de las mujeres presentó candidosis vulvovaginal y el 81.01% (n= 214) de las infecciones vaginales fueron ocasionadas por bacterias Gramnegativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y por Grampositivas como, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Figura 2).

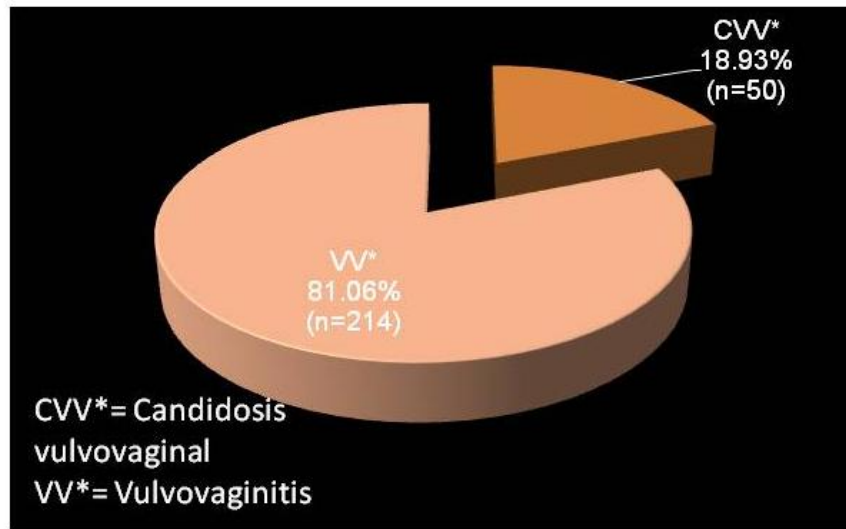
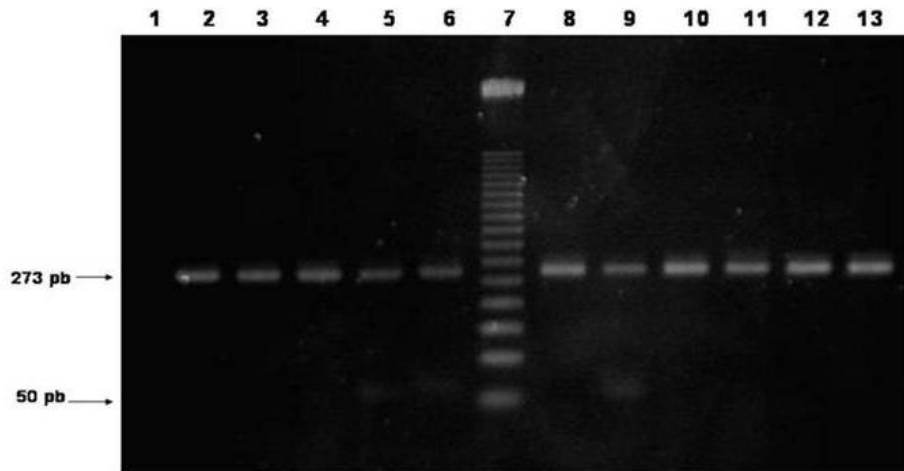


Figura 2. Frecuencia de candidosis vulvovaginal (CVV) en las pacientes estudiadas.

### 7.3. Identificación de *C. albicans* por PCR multiplex

Para la identificación de la especie *C. albicans* utilizamos un método de PCR multiplex que nos permitió amplificar regiones internas (ITS, internal transcribed spacer) del gen rRNA de las especies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicales* (Tabla 2). A partir de las 264 cultivos de las mujeres con patología de vulvovaginitis realizados, *C. albicans* fue identificado en el 18.93% (n = 50) de las mujeres. El tamaño esperado de los amplicones de *C. albicans* correspondió a 273 pb (Fotografía 1).

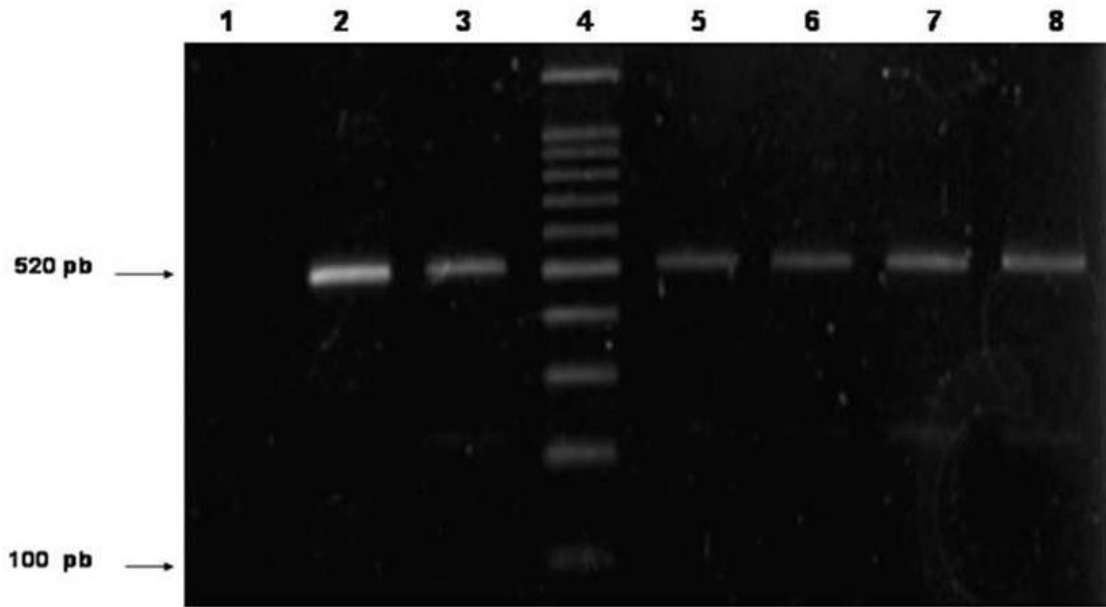




Fotografía 1. Gel de Agarosa al 2%. Detección por PCR multiplex de *C. albicans*. Línea 1, control negativo (sin ADN templado); línea 2, control positivo (*C. albicans* ATCC32354); líneas 3-6, 8-13, cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con CVV; línea 7, MWM (50 pb ladder)

#### 7.4. Detección de *HWP1* de *C. albicans* por PCR

El gen *HWP1* que codifica para la adhesina Hwp1 fue identificado en el 92% (n=46) de las cepas de *C. albicans* (Fotografía 2)



Fotografía 2. Gel de Agarosa al 2%. Detección por PCR de *HWP1* de *C. albicans*. Línea 1, control negativo (sin ADN templado); línea 2, control positivo (*C. albicans* ATCC32354); líneas 3, 5-8, *HWP1* en cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con CVV; línea 4, MWM (100 pb ladder)

## 7.5. Determinación de la CMI a los antimicóticos

### 7.5.1.1.1.1. Miconazol

En la Figura 3 se aprecia que la CMI de miconazol mostró una distribución trimodal, con una subpoblación de cepas susceptibles (10.9%) en la concentración  $\leq 0-1.56 \mu\text{g/ml}$ ; otro grupo (10.8%) con susceptibilidad intermedia (CMI =  $1.57- 6.25 \mu\text{g/ml}$ ), y el (78.2%) de cepas resistentes (CMI =  $6.26-50 \mu\text{g/ml}$ ). La CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> (que inhibe el 50% y 90% de las cepas, respectivamente) de miconazol fue de  $15.62 \mu\text{g/ml}$  y de  $22.5 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 4).

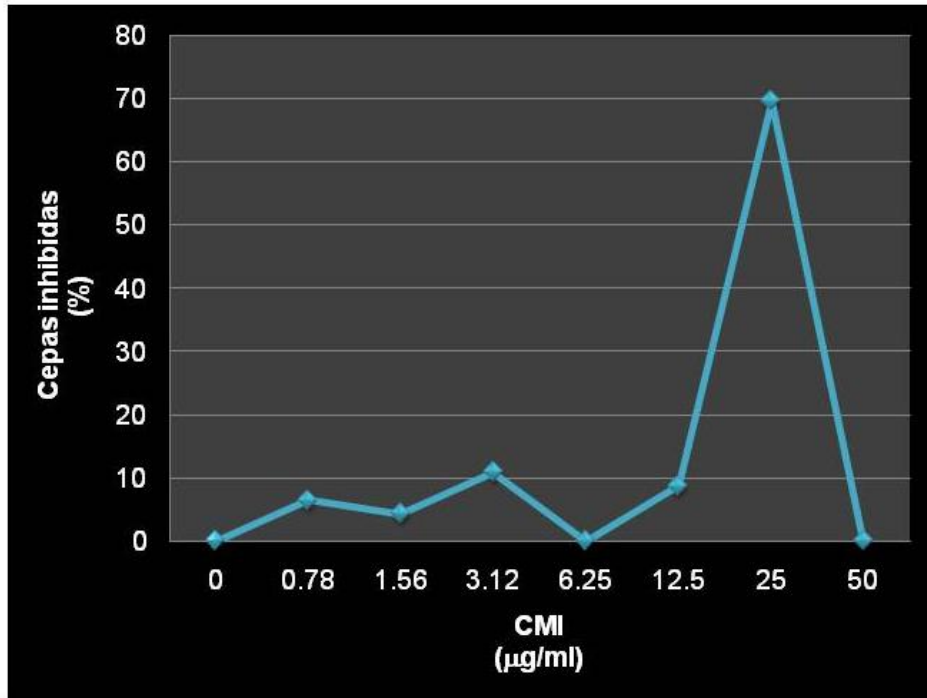


Figura 3. Susceptibilidad de las cepas de *C. albicans* a miconazol.

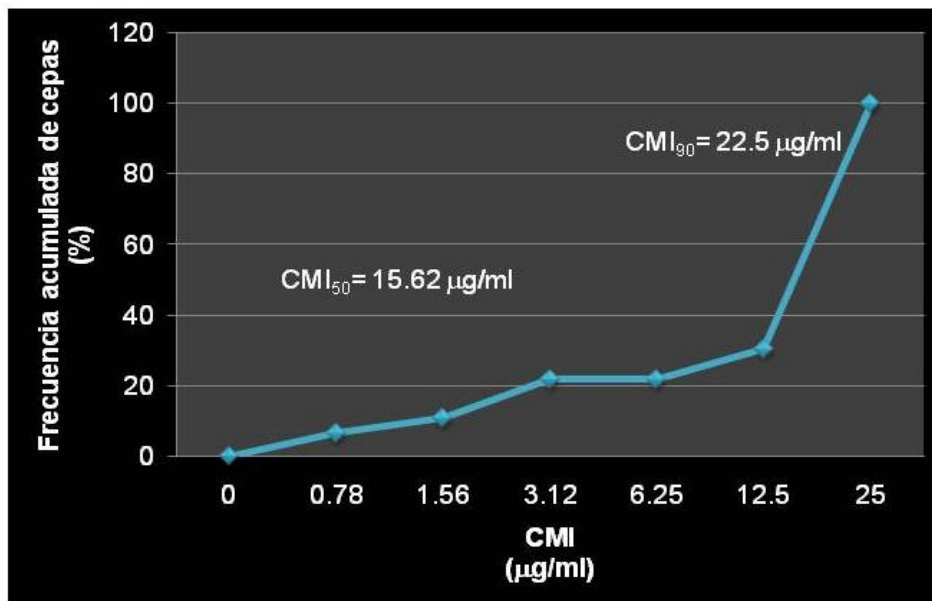


Figura 4. CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de miconazol en cepas de *C. albicans*.

#### 7.5.1.1.1.2 5-fluorocitosina

En la Figura 5 se aprecia que la CMI de 5-fluorocitosina mostró una distribución trimodal, con una subpoblación de cepas susceptibles (54.3%) en la concentración 0.25-0.99  $\mu\text{g/ml}$  y otros dos grupos con susceptibilidad intermedia a las concentraciones de 1- 3.99  $\mu\text{g/ml}$  (11%), y de 4-16  $\mu\text{g/ml}$  (34.7%). La CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> que inhibe el 50% y 90% de las cepas, fue de 0.46  $\mu\text{g/ml}$  y de 7.2  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 6).

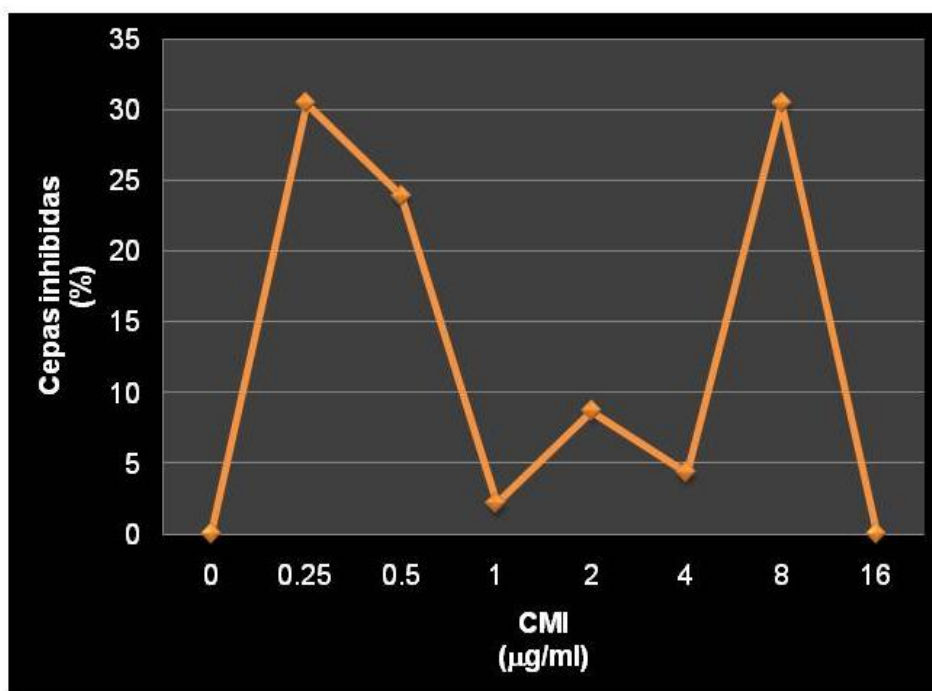


Figura 5. Susceptibilidad de las cepas de *C. albicans* a 5- fluorocitosina.

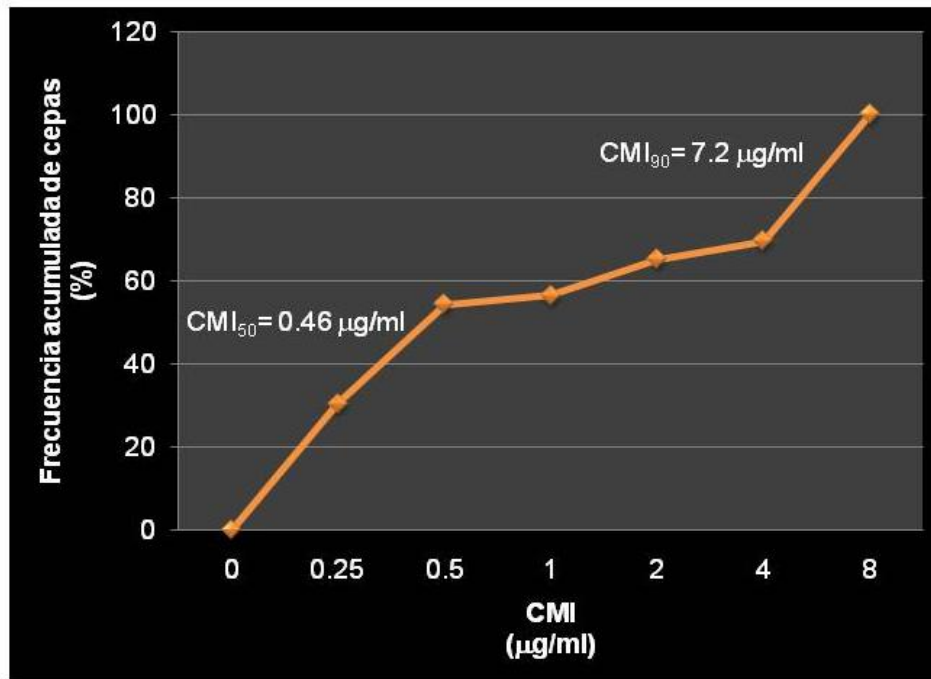


Figura 6. CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de 5- fluorocitosina en cepas de *C. albicans* .

#### 7.5.1.1.1.3. Anfotericina B

En la Figura 7 se aprecia que la CMI de Anfotericina B mostró una distribución bimodal, con una subpoblación de cepas susceptibles (8.6%) en el intervalo de concentración de 0.15-0.062 µg/ml y con un grupo de cepas con susceptibilidad intermedia en rango de concentración de 0.063-0.5 µg/ml (91.4%), La CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> (que inhibe el 50% y 90% de las cepas, respectivamente) de Anfotericina B fue de 0.15 µg/ml y de 0.22 µg/ml, respectivamente (Figura 8).

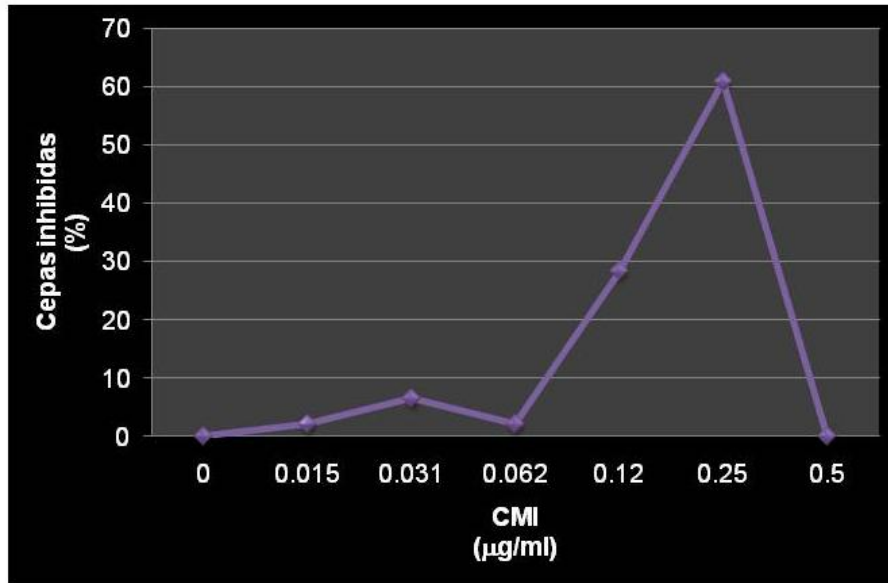


Figura 7. Susceptibilidad de las cepas de *C. albicans* a anfotericina B.

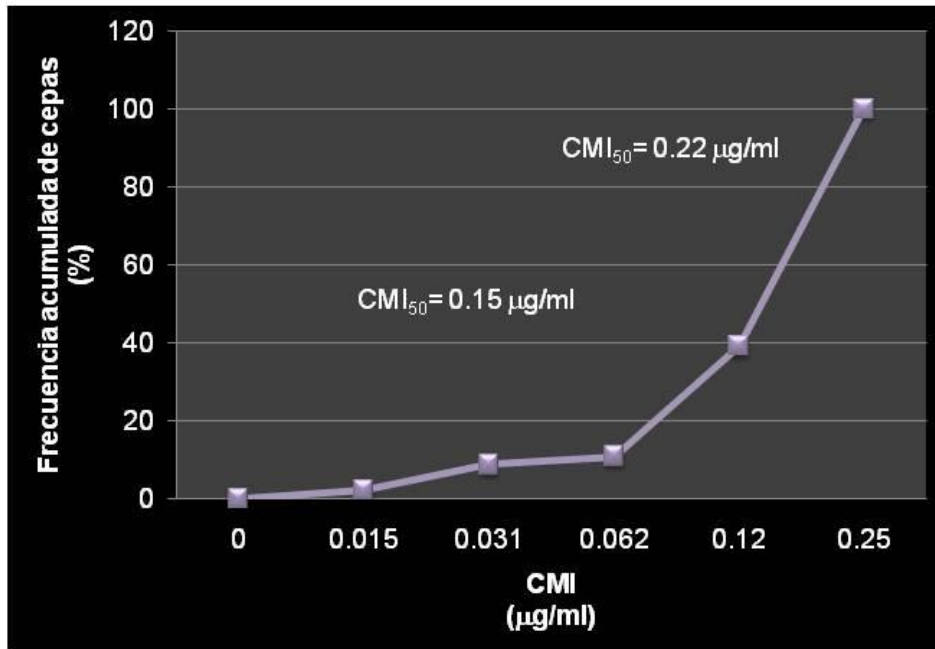


Figura 8. CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de anfotericina B en cepas de *C. albicans*.

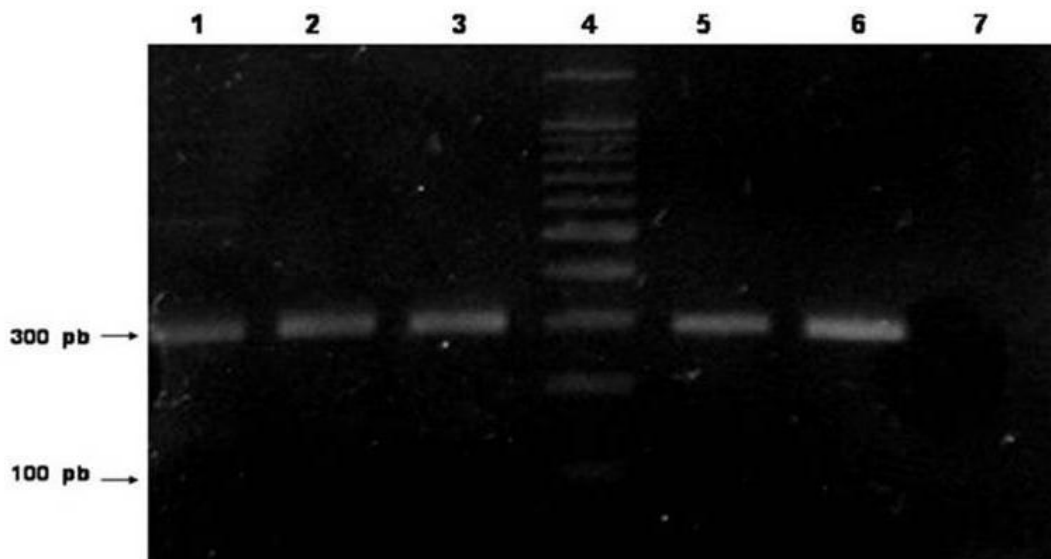
7.6. Detección de los genes *CDR1*, *MDR1* y *ERG11* que confieren resistencia a los azoles

En la Tabla 4 se observa que el gen *CDR1* se detectó en el 16% (n=8) de las cepas de *C. albicans*, *MDR1* no se encontró en ninguna cepa y *ERG11* se detectó en el 66% (n=33). La combinación *CDR1-ERG11* se encontró en el 16% (n=8) de las cepas estudiadas.

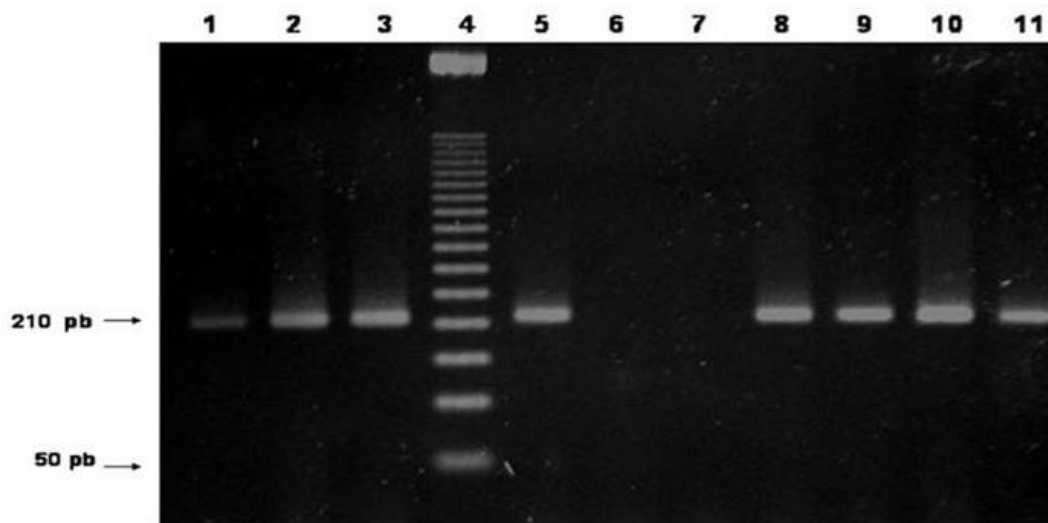
<b>GENES</b>	<b>% No.</b>
<i>CDR1</i>	16 (8)
<i>MDR1</i>	0 (0)
<i>ERG11</i>	33 (66)
<i>CDR1-ERG11</i>	16 (8)

Tabla 4. Frecuencia de los genes que codifican para la resistencia a los azoles en *C. albicans*.

En la Fotografía 3 se aprecia que el tamaño de los amplicones para *CDR1* correspondió a 300 pb y para *ERG11* de 210 pb (Fotografía 4).



Fotografía 3. Gel de Agarosa al 2%. Detección por PCR de *CDR1* de *C. albicans*. Línea 1-3,5, *CDR1* en cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con CVV; línea 6, control positivo (*C. albicans* ATCC32354); líneas 7, control negativo (sin ADN templado); línea 4, MWM (100 pb ladder)



Fotografía 4. Gel de Agarosa al 2%. Detección por PCR de *ERG11* de *C. albicans*. Línea 1-3,8-11, *ERG11* en cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con CVV; línea 5, control positivo (*C. albicans* ATCC32354); líneas 6, control negativo (sin ADN templado); línea 7, muestra negativa; línea 4, MWM (50 pb ladder)



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Pacientes analizadas

En este estudio describimos que a partir de las 264 mujeres de la consulta del Hospital General Regional 72 del IMSS con patología de vulvovaginitis crónica y recurrente, encontramos que el 18.93% (n = 50) presentó CVV (Figura 2) ocasionada por la especie de *C. albicans* (Fotografía 1), principalmente en enfermas con edad en el intervalo de 18-39 años (Figura 1). Se ha descrito que la CVV ocasionada por alguna de las distintas especies de *Candida* es muy frecuente en mujeres de edad reproductiva y es la segunda causa de vaginitis en adolescentes (Pimentel *et al.*, 2007). Se estima que el porcentaje de infección vaginal por *Candida* spp. se encuentra entre el 40 y 75% de las mujeres con vida sexual activa (Rivera *et al.*, 2006). Pimentel *et al.*, (2007) reportaron que el 80% de la CVV es ocasionada por la especie de *C. albicans*. Por ejemplo en un estudio realizado en Perú a 100 mujeres de entre 23 hasta 43 años de edad que presentaban leucorrea, prurito, eritema, e inflamación vaginal, se encontró que el 50% de las CVV fue causada por *C. albicans*, el 25% por *C. tropicalis*, 16% por *C. famata* y el 1% correspondió a *C. glabrata* y *C. kruseii*, en cada caso (Guevara *et al.*, 2000). Existen varios factores que

predisponen a la CVV, como los niveles elevados de estrógenos durante el embarazo, los anticonceptivos orales y la diabetes mellitus (Hamad *et al.*, 2004). Por el contrario se ha descrito que la incidencia CVV en mujeres postmenopausicas es baja, debido a los bajos niveles de estrógenos, sin embargo no están exentas de presentar un episodio (Pimentel *et al.*, 2007). El uso del dispositivo intrauterino (DIU) como control anticonceptivo, favorece también la colonización ascendente de *Candida* spp. (Braun *et al.*, 2003), proliferando hasta las paredes vaginales, en donde puede alcanzar el torrente sanguíneo e infectar otros órganos (Braun *et al.*, 2003). Otro factor de riesgo existente es el uso inmoderado de antibióticos, los cuales disminuyen la cantidad de bacterias de la flora vaginal, favoreciendo el crecimiento de *C. albicans* y otras especies (Kligman, 1952). Las infecciones por la especie de *C. albicans* tiende a presentarse con mayor frecuencia en la población de un nivel socioeconómico bajo (Spinillo *et al.*, 1995), sin embargo, en los EUA se reportan anualmente cerca de 13 millones de episodios de CVV al año (Kwok *et al.*, 1998). En México la vaginitis es uno de los 20 motivos principales de consulta en medicina familiar de las unidades médicas

del IMSS (Velasco *et al.*, 1999), el porcentaje de casos de CVV se encuentra entre el 15 y 19% (Oviedo *et al.*, 2004).

En este estudio nosotros reportamos también que el 81.01% (n= 214) de las infecciones vaginales fueron ocasionadas por bacterias Gramnegativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y por Grampositivas como, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Figura 2). La cavidad vaginal alberga una gran cantidad de especies bacterianas (anaerobias, anaerobias facultativas, etc), que se encuentran en equilibrio, sin embargo por factores internos como los cambios hormonales y de pH durante la menstruación, o externos como el uso de anticonceptivos orales, antibióticos, etc, provocan que este equilibrio se rompa, ocasionando infecciones cervicovaginales.

## 8.2. Detección de HWP1 de C. albicans por PCR

En este trabajo nosotros describimos que el gen *HWP1* fue identificado en el 92% (n=46) de las cepas de *C. albicans* (Fotografía 2). El gen *HWP1* codificada para la proteína Hwp1 (hyphal wall

protein) situada en la pared celular de las hifas (Nas *et al.*, 2008), y que juega un papel importante en la adherencia a las células epiteliales, pero no es requerida para su adhesión a las células endoteliales (Sundstrom *et al.*, 2002). La elevada frecuencia de *HWP1* detectado en nuestras cepas, contrasta con el encontrado en un estudio realizado en 92 cepas de *C. albicans* recuperadas de mujeres (embarazadas, postmenopáusicas y de edad reproductiva) que acudieron al departamento de ginecología y obstetricia de la Facultad de Medicina, en Ankara, Turquía, por presentas signos y síntomas de vaginitis. Estos autores detectaron por PCR el gen *HWP1* en el 62% (n=18) de las cepas de *C. albicans* (Nas *et al.*, 2008).

### 8.3. Determinación de la CMI a los antimicóticos

Nosotros en este trabajo describimos que la CMI de miconazol mostró una distribución trimodal (Figura 3), con una subpoblación de cepas susceptibles (10.9%) en la concentración  $\leq 0-1.56 \mu\text{g/ml}$ ; otro grupo (10.8%) con susceptibilidad intermedia (CMI =  $1.57- 6.25 \mu\text{g/ml}$ ), y el (78.2%) de cepas resistentes (CMI =  $12.5-50 \mu\text{g/ml}$ ). Estos resultados son semejantes a los reportados por Paniagua *et al.*, (2002) en un

estudio de susceptibilidad a los antimicóticos realizados sobre 80 cepas de *C. albicans* aisladas de la orofaringe de pacientes no inmunocomprometidos. Estos autores encontraron una distribución trimodal; susceptibles (CMI = 1.56 µg/ml), susceptibilidad intermedia (CMI = 3.125-12.5 µg/ml) y resistentes (CMI = 25-50 µg/ml). Las CMIs valuadas para subpoblaciones susceptibles, susceptibilidad intermedia y resistentes fueron  $\leq 8$  µg/ml, 8.1-32 µg/ml y  $> 32$  µg/ml, respectivamente (Radetsky *et al.*, 1986).

Para el antimicótico 5-fluorocitosina nosotros describimos una distribución trimodal (Figura 5), con una subpoblación de cepas susceptibles (54.3%) en la concentración 0.25-0.5 µg/ml y otros dos grupos con susceptibilidad intermedia a las concentraciones de 1-2 µg/ml (11%), y de 4-8 µg/ml (34.7%). Nuestros datos contrastan a los de reportados en un estudio previo realizado en 84 cepas de *Candida* spp. (63 *C. albicans*), en donde el 53.3% de las cepas fue susceptible a 5-fluorocitosina (CMI  $\leq 1$  µg/ml), 32.4% susceptibilidad intermedia (CMI = 1.1-16 µg/ml) y 14.3% resistentes (CMI  $> 16$  µg/ml) (Radetsky *et al.*, 1986).

Para el caso de Anfotericina B la CMI fue bimodal (Figura 7), con una subpoblación de cepas susceptibles (8.6%) en el intervalo de concentración de 0.15-0.031  $\mu\text{g/ml}$  y con un grupo de cepas con susceptibilidad intermedia en rango de concentración de 0.062-0.26  $\mu\text{g/ml}$  (91.4%). Nuestros datos son semejantes a los reportados por Paniagua *et al.*, (2002), en donde el 100% de las cepas de *C. albicans* (n=80) analizadas fue susceptible a la anfotericina B (CMI =0.0156-0.125  $\mu\text{g/ml}$ ). Se ha descrito que las cepas susceptibles a la anfotericina B se encuentran en el rango de 0-0.8  $\mu\text{g/ml}$ , las de susceptibilidad intermedia en el intervalo de 1.6-3.2  $\mu\text{g/ml}$  y las resistentes en el intervalo de  $> 6.4 \mu\text{g/ml}$ . (Vazquez *et al.*, 1998).

#### 8.4. Detección de genes que confieren resistencia a los azoles

Nosotros describimos que el gen *CDR1* (Tabla 4) se detectó en el 16% (n=8) de las cepas de *C. albicans*, *MDR1* no se identificó en ninguna cepa y *ERG11* se encontró en el 66% (n=33). La combinación *CDR1-ERG11* se encontró en el 16% (n=8) de las cepas estudiadas. Se ha descrito que la resistencia a los Azoles por *C. albicans* se debe a la alteración de la enzima blanco citocromo P-

450 lanosterol 14  $\alpha$ -demetilasa, ya sea por la sobre expresión o por mutaciones puntuales del gene *ERG11* (Franz *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 2000; Manavathu *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1999; Sanglard *et al.*, 1998). Un segundo mecanismo de resistencia a los Azoles es mediado por la expresión de proteínas transportadoras que funcionan como bombas de eflujo (bombas ABC), codificadas por los genes *CDR1* y *CDR2*, y también a proteínas facilitadoras codificadas por *MDR1* (Smith *et al.*, 2002). El hecho de que ninguna de las cepas de *C. albicans* analizadas en este estudio haya sido portadora de *MDR1* (confiere resistencia a fluconazol), puede deberse a que este antimicótico no se utiliza con frecuencia para tratar la CVV, en cuyo caso, las cepas todavía no se han seleccionado como resistentes a este agente.

La elevada frecuencia de los genes *CDR1* (16%) y *ERG11* (66%) detectada en las cepas de *C. albicans*, refleja probablemente que la Candidosis Vaginal Crónica y Recurrente de las pacientes analizadas, podrían deberse a la expresión de estos genes, por lo que se propone el uso de otros antimicóticos para tratar las infecciones ocasionadas por este microorganismo.

## 9. CONCLUSIONES

1. *C. albicans* fue el agente causal del 18.93% de las infecciones vulvovaginales.
2. La edad de las mujeres infectadas por *C. albicans* oscila entre los 18- 39 años (edad reproductiva).
3. El 81.01% de la infecciones fueron causadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas.
4. El 92% de las cepas de *C. albicans* presentó el gen *HWP1*.
5. El 78.2% de las cepas de *C. albicans* fue resistente al miconazol, y el 100% susceptibles a la 5-fluorocitosina y anfotericina B.
6. El gen *CDR1* fue identificado en el 16% y *ERG11* en el 66% de las cepas de *C. albicans*.
5. La elevada frecuencia de *CDR1* y *ERG11* en las cepas de *C. albicans* refleja una asociación directa con la Candidosis Vaginal Crónica y Recurrente de las pacientes analizadas, por lo que se propone el uso de otros antimicóticos para tratar las infecciones ocasionadas por este hongo.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. 1996. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*40:2835-2841.
- Arechavala, A., Bianchi, M., Robles, A., Santiso, G. y Negroni, R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 305-308.
- Bial, A. 2002. *Candida albicans* (Robin) Berkhout. *Rev Iberoam Micol.* 1: 25-26.
- Braun H, Vera C, Belmar C, Carvajal JA. Consecuencias perinatales de la infección intrauterina por cándida. *Rev. Chil Obstet Gineco. (Serial online)* 2003. 64 (4)
- Castrillón RLE, Ramos PA, Degarenes PC. 2004. Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* spp. *Dermatología Rev Mex.* 48:140-150.
- Castrillón RLE, Ramos PA, Desgarenes PC. 2005. Factores de virulencia de *Candida* sp. *Dermatología Rev Mex.* 49: 12-27.

- Cheng G, Yeater KM, Hoyer LL. 2006. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eucariotic Cell*. 5:180-191.
- Cutler JE. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 45:187–218.
- Dorko E, Baranová Z, Jencá A, Kizek P, Pilipcinec E, Tracikova L. 2005. Diabetes mellitus and candidiasis. *Folia Microbiol*. 50:255-262.
- Ferrer J. 2000. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet*. 71(Suppl 1):S217.
- Fidel P, Cutrigh J, Steele C. 2000. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 68:651-657.
- Foxman B, Marsh JV, Gillespie B, Sobel JD. 1998. Frequency and response to vaginal symptoms among white and African American women: results of a random digit dialing survey. *J Womens Health*. 7:1167–1174.
- Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschha J. 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise

development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3065-3072.

- Furneri PM, Corsello S, Masellis G, Salvatori M, Cammarata E, Roccasalva LS, Mangiafico A, Tempera G. 2008. Econazole-polycarbophil, a new delivery system for topical therapy: microbiological and clinical results on vaginal candidiasis. *J Chemother*. 20(3): 336-340.
- Guevara, J., Béjar, V., Cáceres, A., Valencia, E. 2000. Variedades de *Candida* en mujeres con flujo vaginal anormal. *Anales de la Facultad de Medicina*. 61(001): 51-54.
- Hamad M, Abu-Elteen KH, Ghaleb M. Estrogen-dependent induction of vaginal candidosis in naive mice. *Mycoses* 2004; 47: 304–9.
- Innings, A., Ullberg, M., Johansson, A., Rubin, C., Noreus, N., Isaksson, M. & Herrmann, B. Multiplex Real-Time PCR Targeting the RNase P RNA Gene for Detection and Identification of *Candida* Species in Blood. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. Vol. 45, No. 3: 874–880.

- Jawetz E, Melnick JL, Alberg EA; Brooks GF, Batel J, Ornston LN. 1996. Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno, 20<sup>a</sup> Ed. P. 675-677
- Kelly S, Lamb DC, Loeffler J, Einsele H, Kelly DE. 1999. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 - demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. Biochem Biophys Res Commun. 262:174-179.
- Kligman, A. M.: Are fungus infections increasing as a result of antibiotic therapy? J.A.M.A., 149:979-983, July 12, 1952.
- Kravets, A., Quin, H., Ahmad, A., Bethlenny, G., Gao, Q. 2010. Widespread Occurrence of Dosage Compensation in *Candida albicans*. PLoS One : 5(6): e10856.
- Kwok YK, Tay YK, Goh CL, Kamarudin A, Koh MT, Seow CS. Epidemiology and in vitro activity of antimycotics against candidal vaginal/ skin/ nail infections in Singapore. Int J Derm 1998; 37(2): 145-9
- Lamb DC, Kelly DE, White TC, Kelly SL. 2000. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 -demethylase caused drug resistance through reduced affinity. Antimicrob Agents Chemother. 44:63-67.

- Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington SBA. 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 53:217-224.
- Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Lee LN, Kirkpatrick WR, White TC, Sanglard D, Patterson TF. 1998. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:2932-2937.
- Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Perea S, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. 1999. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1621-1630.
- Luo Guizhen, Mitchell GT. 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40:2860-2865.
- Manavathu EK, Kallakuri S, Arganoza MT, Vazquez JA. 1999. Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14-

demethylase (CYP51A1) from fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 16:198-203.

- Martínez O, Saldaña GJ, Sánchez HMA. 2007. Criterios para el diagnóstico de cervicovaginitis aplicados en el primer nivel de atención. Correlación con la norma oficial mexicana. Rev Med IMSS. 45 (3): 249-254.
- Moreira D, Paula CR. 2006. Vulvovaginal candidiasis. Internat J Gynecol Obstet. 92:266-267
- Nas T, Kalkanci, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E. 2008. Expression of *ALS1*, *HWP1* and *SAP4* genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis. Folia Microbiol.:2;179-183.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Odds, F. C. 1988. *Candida* and candidosis. W. B. Saunders, London.
- Odds FC. 1994. *Candida* species and virulence. ASM News. 60:313-318.

- Oviedo-Morales MA, Reyes-Morales H, Flores HS, Pérez CR. 2004. Fundamentos de las guías clínicas basadas en evidencia. En: Reyes MH, Pérez Cuevas R, Trejo y Pérez JA, editores. Guías de práctica clínica para medicina familiar. México: El Manual Moderno. 9-13.
- Oviedo-Morales MA, Reyes-Morales H, Flores HS, Pérez CR. Fundamentos de las guías clínicas basadas en evidencia. En: Reyes MH, Pérez Cuevas R, Trejo y Pérez JA, editores. Guías de práctica clínica para medicina familiar. México: El Manual Moderno; 2004. p. 9-13.
- Paniagua- Contreras, G.L., Monroy- Perez, E., Negrete, Erasmo, Vaca-P., S. Susceptibility to 5-Fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS patients. 2002. Rev. Lat. De Microbiologia.vol 44 (2), pp 65-68.
- Perrea S, López-Ribot JL., Kirkpatrick William R, Mcatee RK, Santillan RA., Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human

immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:2676-2684.

- Pimentel, S.B., Reynolds, M.E. 2007. Candidiasis vaginal. *Rev. Pacea Med. Fam.* 4(6): 121-127.
- Radetsky, M., R.C. Wheeler, M.M. Roe and J.K. Todd. 1986. Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome. *J. Clin. Microbiol.* 24:600-606.
- Reed BD. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol Surv* 1992; 47: 551– 60.
- Rivera-Sanchez R, Flores Paz R, Arriaga Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en población mexicana. *Enferm. Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 634-636.
- Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:241-253.
- SmithWL, Edlind TD. 2002. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related



antifungals: correlation with reduction in *CDR* and *ERG* upregulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 46;3532-3529.

- Sobel JD, Faro S, Force RW. 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol.*178:203-211.
- Spinillo A, Capuzzo E, Egbe TO, Incola S, Piáis G. *Torulopsis glabrata* vaginitis. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 993-8.
- Sundstrom P, Cutler JE, Staab JF. 2002. Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the *ENO1* locus. *Infect Immun.* 70:3281-3283.
- Vázquez, J.A., M.T. Arganoza, D. Boikov, S. Yoon, J.D. Sobel and R.A. Akins.1998. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. *J. Clin. Microbiol.* 36:2690-2695.
- Velasco-Murillo V, Pozos-Cavanzos JL, Cardona- Pérez JA. Enfermedades infecciosas del cérvix uterino, vagina y vulva: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med IMSS* 1999; 37(3): 185-191.

- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 46:171-179.
- White TC. 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR* and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:1482-1487.