



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“CARACTERIZACIÓN DEL GEN *ERG11* EN  
CEPAS DE *Candida albicans* DE ORIGEN  
VAGINAL”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
JESÚS PÁRAMO AGUILA

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. ERIC MONROY PÉREZ**

México, 2013





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.

## **DEDICATORIAS.**

Una vez culminado el objetivo principal de esta etapa de mi vida, quiero Dedicarles este trabajo, que con tanto esfuerzo hemos realizado, como un reconocimiento de gratitud.

### A mis padres.

David Velázquez y Ma. Guadalupe Aguila, seres maravillosos a los que siempre he admirado. Por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, una vida de sacrificios, esfuerzos y amor. Quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlos fue su gran apoyo.

*Con cariño y agradecimiento infinito.*

### A mi esposa.

Cinthia G. Valadez. Por el cariño y apoyo que siempre he recibido de ti, por tus comentarios, sugerencias y opiniones que me han sido de gran ayuda para tomar algunas decisiones y con ellas culminar mis esfuerzos, terminando así mi carrera profesional, que es para mí la mejor prueba de cariño y agradecimiento para vos.

*Con mucho amor que emana de mi corazón.*

### A mi hijo.

Christopher “mi León”. Porque lo que hace que tenga corazón no es la piel ni la sangre, sino mi hijo que lo hace latir todos los días. Porque me das esa alegría que toda persona debe sentir, brindándome sonrisas, abrazos y mil besos, aunque en ocasiones también me das disgustos. Mil gracias porque muchas cosas de mi cambiaron con tu llegada.

*Te amo, a tu lado siempre estaré.*

A mis hermanas.

Jacqueline, Mayumi S. y Eriadne G. con quienes pase momentos de tristeza y compartí momentos de felicidad, de quienes recibí apoyo y consejos, y con quienes tuve batallas de pequeños y que conforme paso el tiempo más nos fueron uniendo como hermanos, para ellas que siempre confiaron en mí.

*Con cariño por siempre.*

Y para todos aquellos en quien ahora soy una fuente de inspiración y un ejemplo a seguir. Nunca es tarde, no importa lo que se haya vivido, los errores que se hayan cometido, las oportunidades que se hayan dejado pasar, no importa la edad, siempre estamos a tiempo para empezar y obtener la llave de nuestro futuro.

*Sinceramente.*

*SI CAES ES PARA LEVANTARTE, SI TE LEVANTAS ES PARA SEGUIR, SI SIGUES ES PARA LLEGAR A DONDE QUIERES IR Y SI LLEGAS ES PARA SABER QUE LO MEJOR ESTA POR VENIR.....*

*ELBANO MENDOZA*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi director de tesis Dr. Eric Monroy y a la Dra. Gloria Luz Paniagua por su apoyo y asesoría para culminar con esta última parte de mi formación profesional.

Al M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo por su apoyo y asesoría en la secuenciación de los amplicones estudiados en este trabajo, así como de los programas Chromas y Clustal.

A la Biol. Susana Esther y a la Biol. Patricia Sánchez por su apoyo y asesoría durante mi estancia en el laboratorio de Análisis Clínicos.

A mis amigos más que compañeros de clase, por su complicidad y apoyo, por las experiencias que compartimos y los desafíos que superamos durante este tiempo que juntos recorrimos.

A mi familia (Abuelo, Tíos/as, Suegros), porque gracias a su apoyo he llegado a realizar uno de mis grandes anhelos en la vida, fruto de la confianza que en mí se depositó y por lo cual les doy mis más sinceros agradecimientos. Con cariño y respeto.

Para todos ustedes que creyeron en mí.

Como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por ayudarme a hacer posible un logro más; el cual no será el último pero quizá el más importante. Gracias por la fe que depositaron en mí y por dárme todo sin esperar a cambio más que el orgullo de hacer de mí un triunfador. ¡Gracias!.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad que me brindó para desarrollarme profesionalmente (mi casa de estudios durante estos últimos 7 años).

## ÍNDICE.

|   |    |
|---|----|
| 1. RESUMEN.....   | 7  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....  | 9  |
| 2.1. Características de <i>Candida albicans</i> .   |    |
| 2.2. Factores de virulencia.  |    |
| 2.3. Candidosis vulvovaginal.   |    |
| 2.4. Epidemiología.   |    |
| 2.5. Compuestos antifúngicos.   |    |
| 2.6. Resistencia de <i>C. albicans</i> a los antimicóticos.   |    |
| 3. ANTECEDENTES.....  | 18 |
| 4. OBJETIVO GENERAL.....  | 21 |
| 5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....   | 21 |
| 6. JUSTIFICACIÓN.....   | 22 |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 23 |
| 7.1. Selección de los pacientes y toma de los productos.  |    |
| 7.2. Identificación de las levaduras y de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas.                                    |    |
| 7.3. Extracción del ADN de las levaduras para la identificación de <i>Candida albicans</i> .                              |    |
| 7.4. Identificación de las distintas especies de <i>Candida</i> por PCR multiplex.  |    |
| 7.5. Determinación de la susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> al miconazol por el método de microdilución en placa. |    |
| 7.6. Identificación de <i>CDR1</i> y <i>MDR1</i> de <i>C. albicans</i> por PCR.   |    |
| 7.7. Amplificación de cinco segmentos del gen <i>ERG11</i> en las cepas de <i>C. albicans</i> .                           |    |
| 7.8. Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.                           |    |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 7.9. | Secuenciación de los segmentos de <i>ERG11</i> .   |    |
| 8.   | RESULTADOS.....  | 32 |
| 8.1. | Pacientes estudiadas.  |    |
| 8.2. | Porcentaje de la Candidosis vulvovaginal (CVV) en las mujeres estudiadas.  |    |
| 8.3. | Identificación de <i>C. albicans</i> por PCR multiplex.  |    |
| 8.4. | Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas de <i>C. albicans</i> al Miconazol.                                      |    |
| 8.5. | Identificación por PCR convencional de los genes que confieren resistencia a los azoles en las cepas de <i>C. albicans</i> . |    |
| 8.6. | Amplificación de 5 segmentos del gen <i>ERG11</i> .  |    |
| 8.7. | Secuenciación de los segmentos de <i>ERG11</i> .   |    |
| 8.8. | Detección de Mutaciones (sustitución de bases en la secuencia del Gen <i>ERG11</i> ).  |    |
| 9.   | DISCUSIÓN.....   | 43 |
| 9.1. | Pacientes analizadas.  |    |
| 9.2. | Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria al Miconazol.   |    |
| 9.3. | Identificación por PCR convencional de los genes que confieren resistencia a los azoles en las cepas de <i>C. albicans</i> . |    |
| 9.4. | Detección de Mutaciones (sustitución de bases en la secuencia del Gen <i>ERG11</i> ).  |    |
| 10.  | CONCLUSIONES.....  | 52 |
| 11.  | BIBLIOGRAFÍA.....  | 53 |

## 1. RESUMEN.

*C. albicans* es un patógeno oportunista que puede ocasionar candidosis oral, vulvovaginal y sistémica. Los tratamientos con antifúngicos orales; los Polienos (anfotericina B y nistatina) y los Azoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, etc.), son habituales. Sin embargo, algunas levaduras son resistentes a estos agentes o poseen sensibilidad disminuida al mismo. Los mecanismos moleculares de resistencia a los azoles incluyen la alteración de la enzima blanco (lanosterol $14\alpha$ -demetilasa), que inhibe la síntesis del ergosterol, alterando la estructura y funcionalidad de la membrana celular. El gen que codifica esta proteína es *ERG11*. Un segundo mecanismo de resistencia a los azoles es mediado por la expresión de proteínas transportadoras que funcionan como bombas de flujo (bombas ABC), codificadas por los genes *CDR1* y *CDR2*, y también a proteínas facilitadoras codificadas por *MDR1*. El objetivo principal en este estudio fue la Identificación de las mutaciones puntuales en el gen *ERG11* en cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con vulvovaginitis. De las 40 cepas del género *Candida* se seleccionaron 3 cepas resistentes al miconazol y que no presentaron el gen *CDR1*, para posteriormente amplificar por PCR los 5 segmentos del gen *ERG11*. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados y ensamblados individualmente por medio del software Chromas, para posteriormente realizar una comparación entre las secuencias obtenidas de

las cepas 188, 191, ATCC32354 y una de referencia establecida en la base de datos del GENBANK (GenBank adhesión no. X13296.1) a través del software Clustal. Un total de 18 mutaciones distintas (cambios en la secuencia de aminoácidos) fueron detectadas a lo largo de los 5 segmentos del gen *ERG11* en las tres cepas estudiadas. La resistencia al miconazol por las cepas de *C. albicans* carentes de *CDR1*, probablemente pueda deberse a las diferentes combinaciones de las mutaciones identificadas en el gen *ERG11*.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. Características de *Candida albicans*.

*Candida albicans* es una levadura oval Grampositiva que mide de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho x 4 a 6  $\mu\text{m}$  de largo, fermenta la glucosa y maltosa, produciendo ácido y gas, es miembro de la flora normal de las mucosas de los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. *C. albicans* presenta morfogénesis (involucrada en la invasión de los tejidos), mediante la cual ocurre la transición de levadura a hifa (Allistair *et al.*, 1999). Esta transición puede darse a temperatura de 37°C y pH 7.0; en presencia de suero y a temperatura menor de 34°C; también la fagocitosis por macrófagos, o el estrés por ayuno de hierro favorecen la transición de levadura a hifa. Las condiciones que favorecen el crecimiento en forma de levadura son temperatura inferior a 30°C, pH 4.0 o densidad celular  $>10^6$  células/mL.

La fase filamentosa (hifa) es esencial para su patogenicidad, ya que cepas mutantes incapaces de formar hifas no son virulentas (Lo *et al.*, 1997); los filamentos recién formados se adhieren más que las levaduras a células de mamífero, y las levaduras fagocitadas por macrófagos forman micelio y los lisan (Mitchell, 1998). Las células en forma de levadura son redondas u ovoides, se reproducen por gemación y las células madre e hija se separan rápidamente. Las células que crecen en forma de hifas son más grandes y alargadas, tienen lados paralelos y no muestran constricciones obvias entre

célula y célula. Se originan por crecimiento de un tubo germinativo en la célula madre, en el que se forma un septo a 2  $\mu\text{m}$  del cuello. El septo está constituido por una proteína, llamada septina, que forma un anillo de filamentos de 10 nm asociado a la membrana. El septo inicial se desorganiza posteriormente y desaparece; más adelante se forma un segundo septo a 12  $\mu\text{m}$  de la unión del tubo germinativo con la célula madre (Sudbery, 2001).

Existe un gen hifa-específico, que codifica una proteína de la pared celular (hyphal wall protein 1; *HWP1*).

Las cepas de *C. albicans* tienen cariotipos variables, debido a la plasticidad de su genoma. La cepa tipo SC5314 contiene 8 pares de cromosomas; los numerados del 1 al 7 son de tamaño constante y el cromosoma designado por la letra R es polimórfico con un tamaño de 3.2 a 4.0 Mb (megapares de bases) debido al distinto número de genes de rRNA presentes en tándem. El genoma completo de esta cepa es de alrededor de 16 Mb. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genomeprj?Db=genomeprj&cmd=ShowDetail&TermToSearch=9526>).

*C. albicans* es un patógeno oportunista que puede ocasionar candidosis oral, vulvovaginal y sistémica (Odds *et al.*, 2006).

## **2.2. Factores de virulencia.**

*C. albicans* posee varios factores de virulencia que incluyen la formación de hifa (Sobel *et al.*, 1984), cambio de fenotipo (phenotypic switching) (Soll *et al.*, 1987; Hellstein *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2000), secreción de enzimas hidrolíticas (Hube, 1998; Ghannoum, 2000) y adherencia celular (Gaur & Klotz, 1997) (Tabla 1).

| <b>Factor de virulencia</b>  | <b>Mecanismo de virulencia</b>   |
|--|--|
| Producción de Hifa   | Adhesión, invasión, y destrucción de los tejidos   |
| Cambio de fenotipo   | Adhesión y evasión de la respuesta del hospedero.  |
| Adhesinas (familia Als, Hwp1, Int1) <sup>a</sup>                           | Adhesión y colonización  |
| Enzimas hidrolíticas extracelulares (familias Sap, Plb y Lip) <sup>b</sup> | Adquisición de nutrientes, invasión, destrucción de los tejidos y evasión de la respuesta del hospedero. |

**Tabla 1.** Principales factores de virulencia de *C. albicans*.

<sup>a</sup>Als= agglutinin-like sequence; Hwp1= hyphal cell wall protein 1; Int1= integrin-like protein.

<sup>b</sup>Sap= secreted aspartyl proteinases; Plb= phospholipases; Lip= Lipasas.

### **2.3. Candidosis vulvovaginal.**

La vagina de la mujer adulta por lo general es ligeramente ácida y contiene cantidades importantes de glucógeno. La fermentación de este polisacárido por *Lactobacillus acidophilus*, una bacteria que forma parte de la flora normal de la vagina, produce ácido láctico, lo que disminuye el pH. La flora normal de la vagina adulta incluye, además de *L. acidophilus*, especies de *Candida*, *Streptococcus* spp. y en ocasiones *Escherichia coli*. Los organismos que forman parte de la flora normal pueden, ocasionalmente, actuar como patógenos oportunistas en respuesta a un cambio en el microambiente; por ejemplo, ante la alcalinización del pH local que propicia su multiplicación. Antes de la pubertad la vagina es alcalina, no produce glucógeno y *L. acidophilus* no está presente. Después de la menopausia no hay glucógeno, el pH aumenta y la flora normal formada principalmente por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *E. coli* y *Candida* spp. es similar a la encontrada antes de la pubertad (Madigan *et al.*, 2003).

La candidosis vulvovaginal (CVV) se define por los signos y síntomas de inflamación en presencia de *Candida* y en ausencia de infección de otra etiología (Sobel *et al.*, 1998). La infección de la vagina por *Candida* produce un conjunto de signos y síntomas, de los cuales el más específico es el prurito; todos los demás pueden presentarse en infecciones causadas por

otros microorganismos. En ocasiones se presenta descarga vaginal blanquecina, cuya consistencia puede ser acuosa o espesa, semejante al queso cotagge. La paciente puede experimentar dolor vaginal, irritación y ardor en la vulva. También se puede presentar eritema e inflamación de los labios y la vulva, con lesiones periféricas en forma de fisuras. Los síntomas se exacerban una semana antes de la menstruación.

La candidosis vulvovaginal es una de las infecciones más comunes en mujeres en 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 (Sobel, 1997; Sobel, 1998). En nuestro país el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ha reportado que la vulvovaginitis a nivel nacional se encuentra entre los 12 principales motivos de consulta en medicina familiar (Velasco *et al.*, 1999), con una elevada incidencia por *Candida albicans* (Martínez *et al.* 2007). En los EUA anualmente se reportan 13 millones de casos de CVV, los cuales originan 10 millones de visitas al ginecólogo (Weisberg, 1988; Sobel, 1999; Xu & Sobel, 2003). *C. albicans* es el agente causal del 85-90% de los casos de CVV, mientras que el restante es 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 embarazo, los anticonceptivos orales, la diabetes mellitus y el uso de antibióticos (Sobel, 1985; Sobel *et al.*, 1998).

#### **2.4. Epidemiología.**

En México durante el 2008 (datos más recientes) la candidosis vaginal femenina ocupó el lugar número 9 (286,803 casos, con una incidencia de 529 por cada 100 mil féminas) entre las 20 principales causas de enfermedad nacional de mujeres (23,249,497), (Fuente: SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos-2008).

#### **2.5. Compuestos antifúngicos.**

Para combatir a *Candida* y otros hongos patógenos se utilizan compuestos que interaccionan con el ergosterol o inhiben su síntesis. El ergosterol sustituye en la mayoría de los hongos, incluida *Candida*, al colesterol que se encuentra en las membranas de las células eucariontes. El ergosterol es esencial para mantener la integridad y la función de la membrana de *C. albicans*.

El ergosterol es sintetizado a partir del lanosterol por efecto de la 14-alfa demetilasa de lanosterol, o CYP51A1, enzima que forma parte de la familia citocromo P450 y que está codificada por el gen *ERG11*.

Los polienos son un grupo de antifúngicos, producidos por especies de *Streptomyces* que se unen al ergosterol y alteran la permeabilidad de la

membrana, lo cual causa la muerte del hongo. Entre los polienos más utilizados para combatir las candidosis se encuentran la anfotericina B, obtenida en 1955 a partir de una cepa de *Streptomyces nodosus* aislada del suelo del río Orinoco, Venezuela, la nistatina y la filipina (polieno aislado en 1955 a partir de una cepa de *Streptomyces filipensis* obtenida de una muestra de suelo de Filipinas (Whitfield *et al.*, 1955).

Entre los compuestos que impiden la síntesis del ergosterol, por inhibición de CYP51A1 (14-alfa demetilasa de lanosterol), se encuentran los azoles, administrados por vía oral (fluconazol, ketoconazol) o tópica (clotrimazol, miconazol) y las alilaminas, como la terbinafina (alilamina sintética, que inhibe a la monooxigenasa del escualeno, enzima que participa en la síntesis de ergosterol) administrada oralmente.

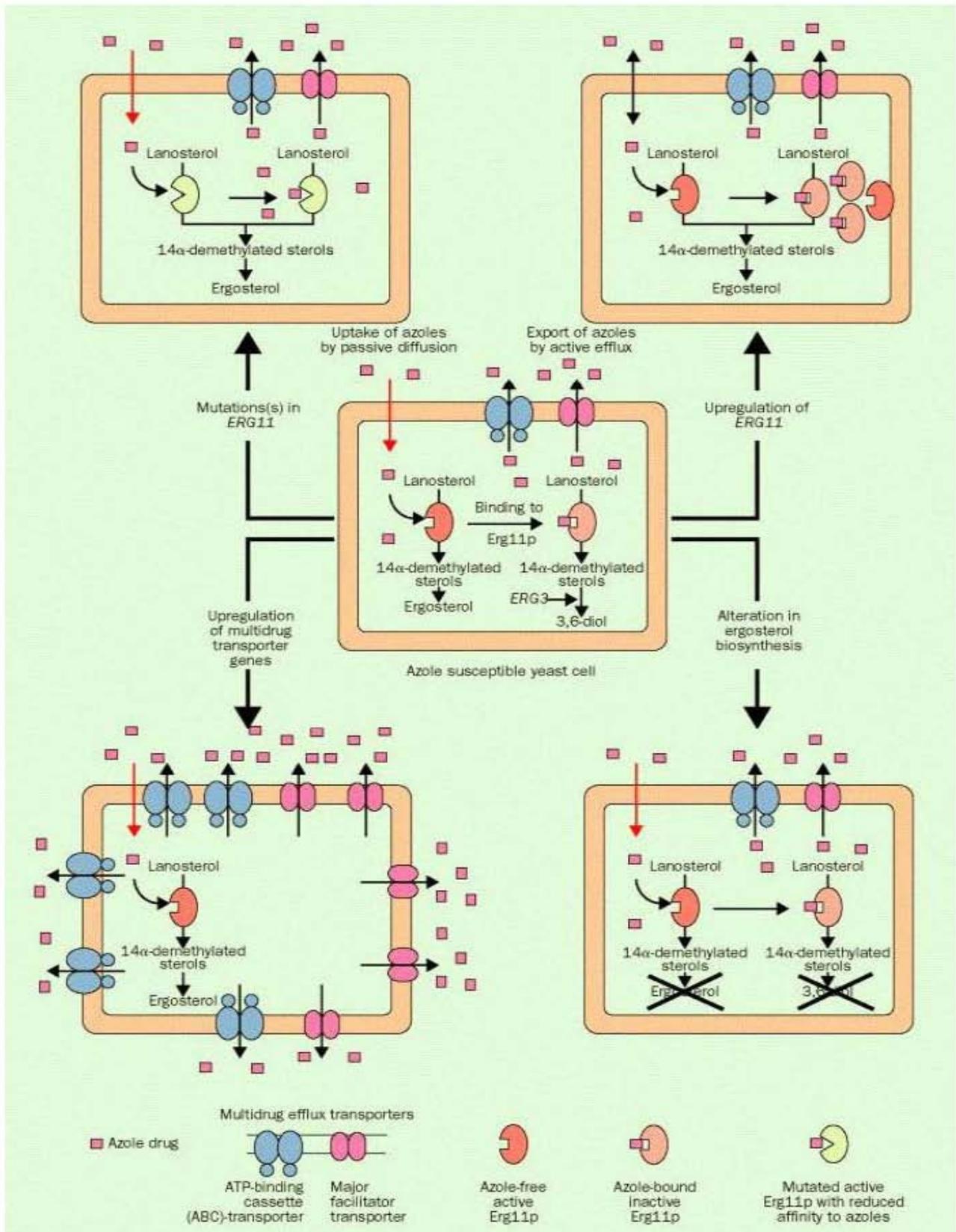
## **2.6. Resistencia de *C. albicans* a los antimicóticos.**

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* (Martel *et al.*, 2010). Adicionalmente, *CDR1* y *CDR2* (candida drug resistance) codifican para proteínas transportadoras que funcionan como bombas de eflujo de azoles (*ABC*) y *MDR1* (mayor drug resistance) codifica para proteínas facilitadoras, por lo que le confieren a *C. albicans*

resistencia a estos antimicóticos (Alberston *et al.*, 1996; Basso *et al.*, 2010) (Tabla 2).

Las infecciones por *Candida* también se tratan con Flucitosina (o 5-Fluorocitosina). Este es un antimicótico sintetizado por primera vez en 1957. La flucitosina no tiene actividad antifúngica por sí misma, pero una vez que se introduce a las células susceptibles se convierte en 5-Fluoruracilo, el cual es transformado a su vez en otros metabolitos que inhiben la síntesis de RNA y DNA del hongo (Vermes *et al.*, 2000).

Sin embargo, el mal uso y el abuso de los compuestos antifúngicos ha causado la selección de cepas de hongos resistentes, las cuales requieren de tratamientos combinados para erradicarlas de las pacientes.



**Figura 1.** Mecanismos de resistencia a los azoles (Tomada de Podust *et al.*, 2001).

### 3. ANTECEDENTES.

En los últimos años se han realizado estudios para correlacionar la resistencia a los azoles con la presencia de los genes *CDR*, *MDR* y con las mutaciones en el gen *ERG11* en cepas clínicas de *C. albicans*.

En el año 2002 Paniagua *et al.*, realizaron un estudio para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 5-fluorocitosina, miconazol y anfotericina B en cepas de *Candida albicans* aisladas de la orofaringe de pacientes no inmunodeprimidos. Estos autores encontraron que las cepas sensibles al miconazol se encontraron en el rango de 0.5-8 µg/ml, las cepas con susceptibilidad intermedia en el intervalo de 8-32 µg/ml y las cepas resistentes por arriba de 32.1 µg/ml.

Díaz *et al.*, en el 2004 realizaron un estudio con 32 aislamientos clínicos de *Candida* spp, mediante la técnica de SSCP para la identificación de variantes del gen *ERG11* de *Candida* spp. provenientes de la cavidad oral de pacientes oncológicos y su posible relación con la susceptibilidad a los azoles Itraconazol, Ketoconazol y fluconazol empleados con mayor frecuencia en el tratamiento de este tipo de candidosis. Estos autores no encontraron mutaciones puntuales en el gen *ERG11*.

Lee *et al.*, en el 2004 reportaron dos mutaciones que no habían sido descritas anteriormente, en un estudio realizado a partir de doce

aislamientos de *C. albicans* con diferentes susceptibilidades in vitro de fluconazol, estas mutaciones son V404I y V509M encontradas en cepas con dosis susceptible dependiente (SDD) y resistentes (R).

Arechavala *et al.*, en el 2007 realizaron un trabajo para determinar la susceptibilidad (CMI) a fluconazol y albaconazol en 100 cepas de levaduras aisladas de 94 pacientes con vulvovaginitis. Las especies con mayor resistencia a fluconazol fueron *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. inconspicua*, en tanto que todas las cepas de *C. albicans* fueron sensibles. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de albaconazol fue mucho menor en todos los aislamientos.

En el 2009 Lerzan *et al.*, realizaron un estudio para investigar Y132H y otras mutaciones en el genotipo *ERG11* que confiere resistencia a fluconazol en diecisiete cepas de *Candida albicans*. Estos autores describieron que las mutaciones K143R, G464S, G465S, V488I, S412T y R469K en el gen *ERG11* fueron mecanismos eficaces en la resistencia a fluconazol en las cepas *C. albicans*.

Pam *et al.*, realizaron un trabajo publicado en el 2012, en el cual analizaron 28 cepas clínicas de *Candida* spp. previamente obtenidos de los alumnos de una Escuela de Enfermería en Lagos, Nigeria. De los cuales 14 cepas fueron identificadas como *C. albicans*, de estas, 12 fueron susceptibles y

una mostró resistencia de alto nivel. El gen *ERG11* se detectó en tres especies sensibles dependientes de la dosis de *Candida*.

#### 4. OBJETIVO GENERAL.

- Identificación de las mutaciones puntuales en el gen *ERG11* en cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres con vulvovaginitis.

#### 5. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) al miconazol en cepas de *C. albicans* por el método de dilución en placa.
- Identificación de los genes *CDR1* y *MDR1* que confieren la resistencia a los azoles en cepas de *C. albicans*.
- Correlacionar la presencia de los genes *CDR1*, *MDR1* y las mutaciones en *ERG11* con la resistencia de las cepas de *C. albicans* al miconazol.

## 6. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que en nuestro país la candidosis vulvovaginal es una de las principales patologías que afectan a mujeres de edad reproductiva, y la información referente al incremento de la resistencia a los azoles por *C. albicans* es muy escasa, en el presente estudio se correlacionará la resistencia al miconacol con los genes *CDR1*, *MDR1* y las mutaciones puntuales de *ERG11* en un grupo de cepas *C. albicans* aisladas de infecciones vaginales.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **7.1. Selección de los pacientes y toma de los productos.**

Para el desarrollo de este estudio se seleccionó un grupo de 264 mujeres con los síntomas de vulvovaginitis, como ardor, comezón y/o disuria con presencia de una descarga espesa a partir de los servicios de ginecología del Hospital General Regional 72 (segundo nivel de atención) del IMSS, ubicado en el Municipio de Tlalnepantla, Estado de México. Se incluyeron en este estudio a mujeres adultas; con y sin vida sexual activa, y se excluyeron pacientes con cáncer cervicouterino, embarazadas, que se encontraban en tratamiento con antibióticos o que habían tomado antifúngicos en los últimos 30 días. Después de obtener el consentimiento informado de cada paciente se tomaron dos muestras del saco vaginal por medio de hisopos estériles, una se utilizó para corroborar la presencia de levaduras, pseudohifas y/o hifas por examinación directa al microscopio y la otra se depositó en el medio de transporte Stuart. Las muestras vaginales fueron transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la FES Iztacala, UNAM. Posteriormente las muestras fueron sembradas en el medio líquido de BHI (infusión-cerebro-corazón, Bioxon, México) y se incubaron a 37° C por 24 horas. Finalmente los cultivos se sembraron en agar sabouraud (Bioxon, México) que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol y en los medios sólidos; Agar sangre (Bioxon, Mexico), eosina azul de metileno (EMB,

Bioxon, México) y S-110 (Bioxon, México) y se incubaron a 37° C por 48 horas.

## **7.2. Identificación de las levaduras y de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas.**

A partir de los cultivos puros crecidos en agar sabouraud, las levaduras fueron identificadas mediante la prueba del tubo germinativo en BHI (Bioxon, México) suplementado con 10% de suero de caballo y por API 20C AUX (BioMerieux). La cepa de *C. albicans* ATCC32354 fue utilizada como control positivo. Las bacterias Gramnegativas fueron identificadas mediante las prueba bioquímicas: kligler, sacarosa, manitol, SIM (ácido sulfídrico, indol, movilidad), citrato y urea.

Las bacterias Grampositivas fueron identificadas mediante la fermentación del manitol y la prueba de la coagulasa.

## **7.3. Extracción del ADN de las levaduras para la identificación de *Candida albicans*.**

El ADN de las cepas del género *Candida* fue extraído por el método de ebullición, para lo cual las cepas fueron crecidas en placas de agar sabouraud a 37°C durante 24 horas. Al término de este tiempo se tomaron varias colonias por medio un asa estéril y se depositaron en un tubo de 16 x 150 que contenía 2 ml de agua desionizada estéril. Se agitó en un vortex

durante 30 segundos y se colocó a baño maría durante 20 minutos. Posteriormente el tubo con la muestra fue colocado en hielo por 10 minutos. Finalmente la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante (contenía el ADN) se transfirió a otro tubo estéril y se guardó a -20°C hasta su utilización.

#### **7.4. Identificación de las distintas especies de *Candida* por PCR multiplex.**

La identificación de las diferentes especies de *Candida* fue realizada por PCR multiplex de acuerdo al método descrito por Luo & Mitchell (2002). Para establecer primero, si todas las cepas de *Candida* pertenecían al grupo de los hongos se realizó un PCR sencillo utilizando los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (internal transcribed spacer regions) diseñados del gen ARNr 18S (Tabla 2), y perlas PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE Healthcare), que contenían 1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs, para un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl; 1 µl de cada oligonucleótido TS1 y TS4 (5 pmol), 20 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 3 µl (20 ng) de ADN templado. 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 para la identificación específica de cada especie (Tabla 2), utilizando los oligonucleótidos CALB1 y CALB2 (5 pmol), CGL1 y CGL2 (7 pmol), CPA1e, CPA3f y CPA2 (6 pmol), y CTR1 y CTR2 (4 pmol), y las perlas PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs) (GE Healthcare), en un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl; 1 µl de cada oligonucleótido, 13 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasa y 3 µl de ADN molde (20 ng). La amplificación del ADN se realizó bajo las mismas condiciones que para ITS1 e ITS4.

| Especie                     | Nombre del oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5´a 3´) | Tamaños de los amplicones (pb) |
|-----------------------------|----------------------------|--|--------------------------------|
| Todos los hongos            | ITS1                       | TCCGTAGGTGAACCTGCGG                    | Variable                       |
|                             | ITS4                       | TCCTCCGCTTATTGATATGC                   |                                |
| <i>Candida albicans</i>     | CALB1                      | TTTATCAACTTGTCACACCAGA                 | 273                            |
|                             | CALB2                      | ATCCCGCCTTACCACTACCG                   |                                |
| <i>Candida glabrata</i>     | CGL1                       | TTATCACACGACTCGACACT                   | 423                            |
|                             | CGL2                       | CCCACATACTGATATGGCCTACAA               |                                |
| <i>Candida parapsilosis</i> | CPA1e                      | TTGGTAGGCCTTCTATATGGG                  | 320                            |
|                             | CPA3f                      | GCCAGAGATTAA ACTCAACCAA                |                                |
|                             | CPA2                       | CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC               |                                |
| <i>Candida tropicalis</i>   | CTR1                       | CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT                 | 357                            |
|                             | CTR2                       | TGGCCACTAGCAAATAAGCGT                  |                                |

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en la detección de las distintas especies patógenas del género *Candida*.

### **7.5. Determinación de la susceptibilidad de *Candida albicans* al miconazol por el método de microdilución en placa.**

La concentración mínima inhibitoria al miconazol (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) se determinó por microdilución en placa de poliestireno (96 pozos) (Galgiani *et al.*, 1985). Para lo cual el antimicótico fue primero diluido en Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) y a partir ésta se prepararon diluciones en el medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) para obtener las diferentes concentraciones (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/ml).

Para el ensayo de susceptibilidad al miconazol, las cepas de *C. albicans* fueron crecidas en placas de agar sabouraud (Bioxon, México) a 37°C por 24 horas. Obtenido el crecimiento, 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>. Después el cultivo fue diluido 1:100 en solución salina estéril y posteriormente 1:100 en RPM1640. La concentración final requerida de 10<sup>4</sup> UFC/ml fue verificada por crecimiento en placa de agar sabouraud. Posteriormente se depositaron en diferentes pozos 100 µl del cultivo de cada una de las cepa *C. albicans* (10<sup>3</sup> UFC/ml) más 100 µl del medio RPM1640 con las diferentes concentraciones del antimicótico. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC32354 (portadora del gen *CDR1*), y como control negativo

medio RPMI-1640 solo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Finalmente se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA, modelo Multiskan FC, marca Termo (Labsystems, Helsinki, Finland). Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera: cepas resistentes (OD<sub>630</sub> ≥ 0.26), cepas con susceptibilidad intermedia (OD<sub>630</sub> = 0.21-0.25) y cepas susceptibles (OD<sub>630</sub> < 0.20).

#### **7.6. Identificación de *CDR1* y *MDR1* de *C. albicans* por PCR.**

Los oligonucleótidos (Tabla 3) y el método que se utilizó para la identificación de *CDR1* y *MDR1* en *C. albicans* por PCR de punto final fueron los descritos por Lee *et al.*, (2004). Para el método se utilizaron perlas PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs) (GE Healthcare), en un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl; 1 µl de cada oligonucleótido (10 pmol) y 3 µl de ADN molde (200 ng). Las condiciones de los ciclos fueron de 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')  | Tamaño de los amplicones (pb) |
|-------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| <i>CDR1</i> | CDRF                       | AAGAGAACCATTACCAGG | 300 pb                        |
|             | CDRR                       | AGGAATCGACGGATCAC  |                               |
| <i>MDR1</i> | MDRF                       | GGAGTTTAGGTGCTGT   | -                             |
|             | MDRR                       | CGGTGATGGCTCTCAA   |                               |

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en la PCR para la identificación de los genes que confieren resistencia a los antimicóticos.

### **7.7. Amplificación de cinco segmentos del gen *ERG11* en las cepas de *C. albicans*.**

Los oligonucleótidos (Tabla 4) y el método de PCR por separado que se utilizó para la amplificación de los segmentos de *ERG11* en las cepas de *C. albicans* fueron los descritos por Lee *et al.*, (2004). Para el método se utilizaron las perlas PuRetaq™ Ready-To-Go™ PCR (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs) (GE Healthcare), en un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl; 1 µl de cada oligonucleótido (10 pmol), 20 µl de agua libre de nucleasas y 3 µl de ADN molde (200 ng). Las condiciones de los ciclos fueron de 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 durante 7 minutos.

| Nombre | Oligonucleótido | Secuencia (5'-3')        |
|--------|-----------------|--------------------------|
| SEG 1  | forward primer  | ATTCTTTCCATATTACTTGTCTTC |
|        | reverse primer  | AGCAGAAACATCAGATAATTTAG  |
| SEG 2  | forward primer  | TATGACGGTTTATTTAGGTCC    |
|        | reverse primer  | AATATAGTTGAGCAAATGAACG   |
| SEG 3  | forward primer  | GCTTCAAGATCTTTATTTGGTG   |
|        | reverse primer  | TCACCTAAATGTAACAAGAACC   |
| SEG 4  | forward primer  | CTTATGGGTGGTCAACATAC     |
|        | reverse primer  | AGTATCCCATCTAGTTGGATC    |
| SEG 5  | forward primer  | GGTTATGCTCATACTAGTGAAAG  |
|        | reverse primer  | AACAATCAGAACACTGAATCG    |

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los segmentos del gen *ERG11* por PCR.

### **7.8. Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.**

Después de la amplificación del ADN, 8  $\mu$ l de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliampers por 120 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fueron fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

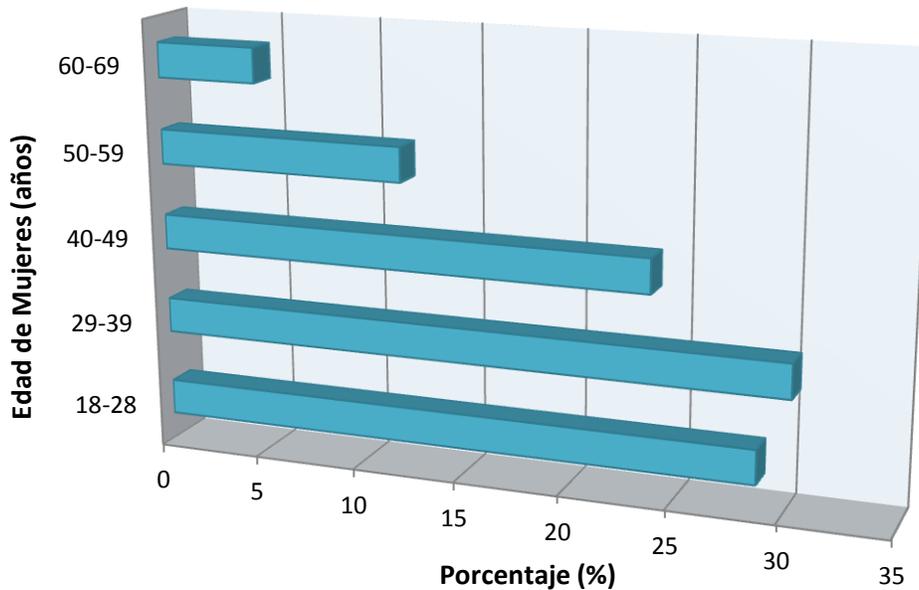
### **7.9. Secuenciación de los segmentos de *ERG11*.**

Finalmente los amplicones obtenidos de los 5 segmentos del gen *ERG11* fueron secuenciados en el servicio de secuenciación de la UBIPRO, FES Iztacala, Las secuencias fueron ensambladas individualmente por medio de software Chromas, para posteriormente realizar una comparación entre las secuencias obtenidas de las cepas ATCC32354, 188, 191 y una de referencia establecida en la base de datos del GENBANK (GenBank adhesión no. X13296.1) a través del software Clustal.

## 8. RESULTADOS.

### 8.1. Pacientes estudiadas.

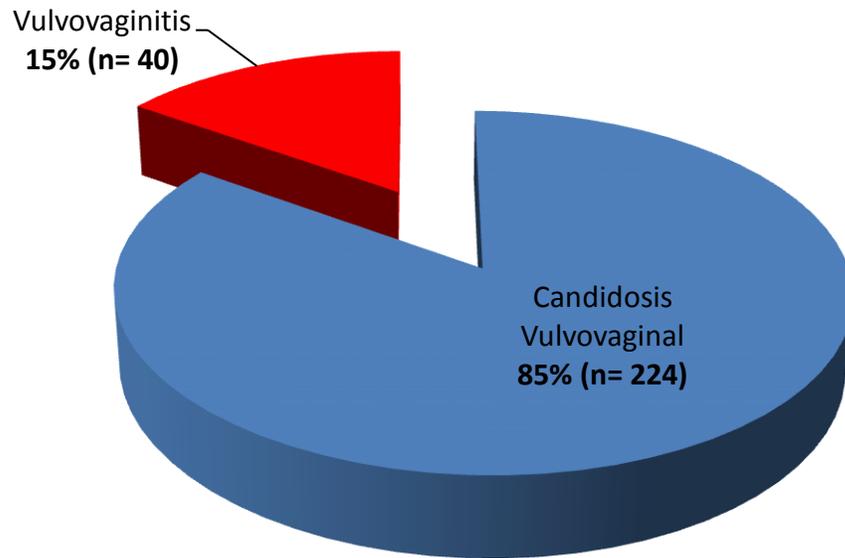
Para el desarrollo de este trabajo se analizaron 264 mujeres con patología de vulvovaginitis de la consulta de ginecología del Hospital General Regional 72 del IMSS. En la Figura 2, se observa que el 30.3% (n= 80) de las pacientes presentó una edad comprendida en el rango de 29-39 años, seguido por el de 18-28 con el 28.8% (n= 76), de 40-49 con el 23.9% (n= 63), de 50-59 con el 12.1 % (n= 32) y de 60-69 con el 4.9% (n= 13).



**Figura 2.** Distribución de las pacientes estudiadas por rango de edad.

## **8.2. Porcentaje de la Candidosis vulvovaginal (CVV) en las mujeres estudiadas.**

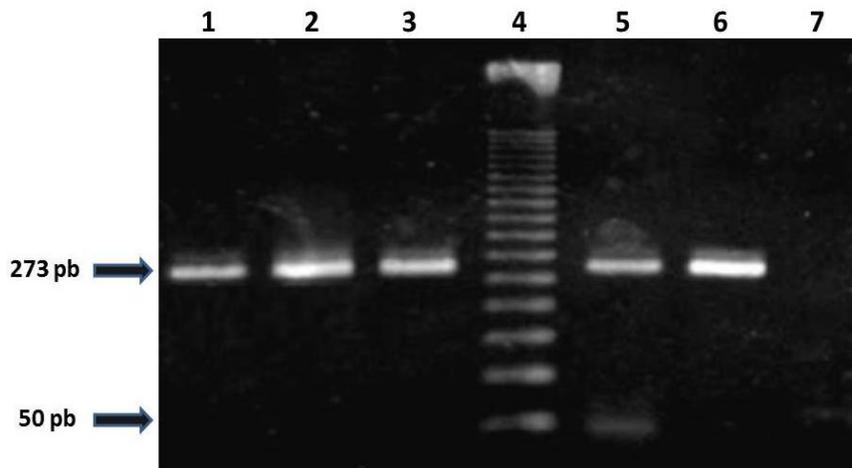
A partir de las 264 mujeres con patología de vulvovaginitis, la candidosis vulvovaginal (presencia del género *Candida* en los cultivos) fue detectada en el 15.1% (n= 40) de las mujeres y la vulvovaginitis ocasionada por bacterias Gramnegativas como; *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y por Grampositivas como; *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fue identificada en el 84.9% de los cultivos (n= 224) (Figura 3). El 100% (n= 40) de las infecciones vaginales por *Candida* spp fueron crónicas. La cronicidad fue establecida de acuerdo a los criterios establecidos por el sector salud, los cuales se caracterizaron por presentar los síntomas de vulvovaginitis (ardor, comezón y/o disuria con presencia de una descarga espesa) por un periodo de tiempo de más de dos meses.



**Figura 3.** Porcentaje de la candidosis vulvovaginal (CVV) en las pacientes estudiadas.

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

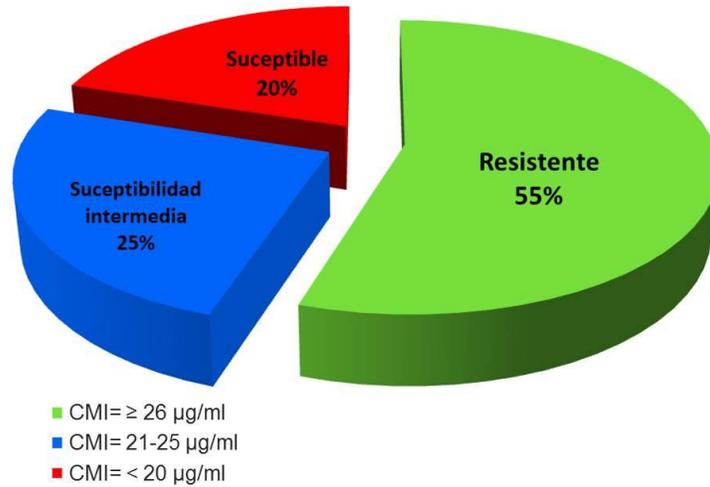
Se analizaron únicamente las 40 cepas del género *Candida* obtenidas de las mujeres con candidosis vulvovaginal. Para la identificación de las distintas especies del género *Candida* se utilizó un método de PCR multiplex que permitió amplificar regiones internas (ITS, internal transcribed spacer) del gen RNAr de cada especie (Tabla 2). El 100% (n= 40) de las cepas correspondió a la especie de *C. albicans*. El tamaño del amplicón fue de 273 pb (Figura 4).



**Figura 4.** Identificación de *Candida albicans* por PCR multiplex (ITS1 e ITS2, amplicón de 273 pb): Carriles 1-3 y 5, cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres con candidosis vaginal; Carril 4, MPM 50 pb-ladder (Invitrogen); Carril 6, Control positivo (*C. albicans* ATCC32354); Carril 7, Control negativo (sin ADN molde).

#### **8.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas de *C. albicans* al Miconazol.**

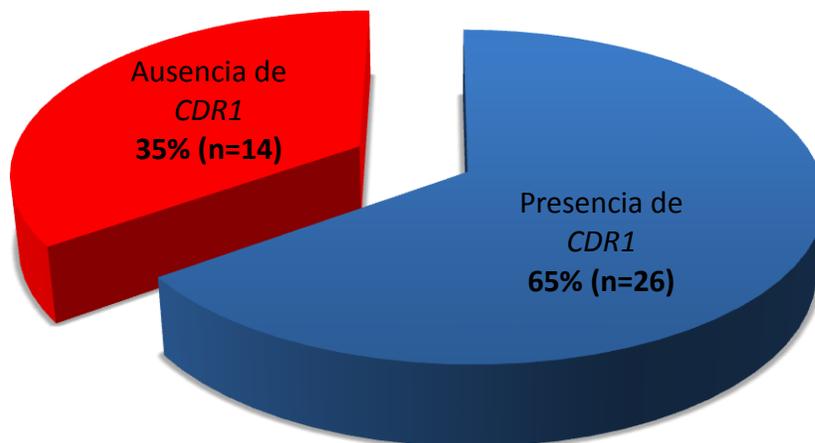
Se estudiaron las 40 cepas identificadas como *C. albicans*, dentro de las cuales el 55% (n=22) fue resistente al miconazol (CMI= 25 µg/ml), 25% (n= 10) presentó susceptibilidad intermedia (CMI= 12.5 µg/ml) y el 20% (n= 8) fue susceptible (CMI= 1.5-3.1 µg/ml) (Tabla 5, Figura 5). Cepas resistentes ( $OD_{630} \geq 0.26$ ), cepas con susceptibilidad intermedia ( $OD_{630} = 0.21-0.25$ ) y cepas susceptibles ( $OD_{630} < 0.20$ ).



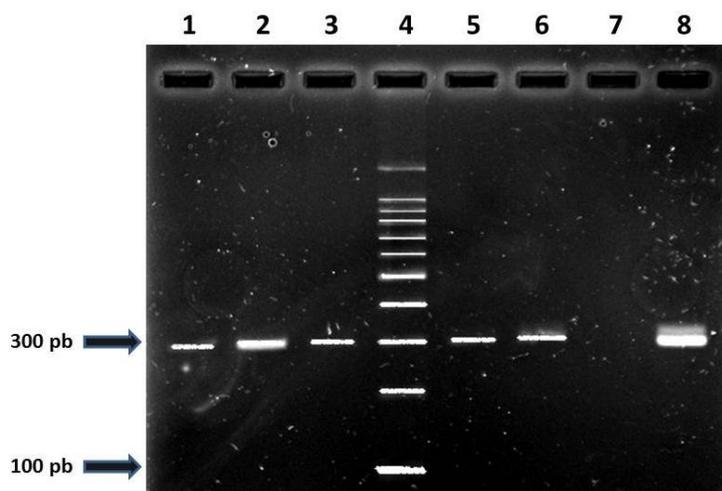
**Figura 5.** Determinación de la resistencia y/o susceptibilidad al miconazol en las cepas de *C. albicans* por el método de dilución en placa.

### **8.5. Identificación por PCR convencional de los genes que confieren resistencia a los azoles en las cepas de *C. albicans*.**

La presencia del gen *CDR1* fue identificada en el 65% (n= 26) de las cepas (Figuras 6 y 7), mientras que el gen *MDR1* no se identificó en ninguna.



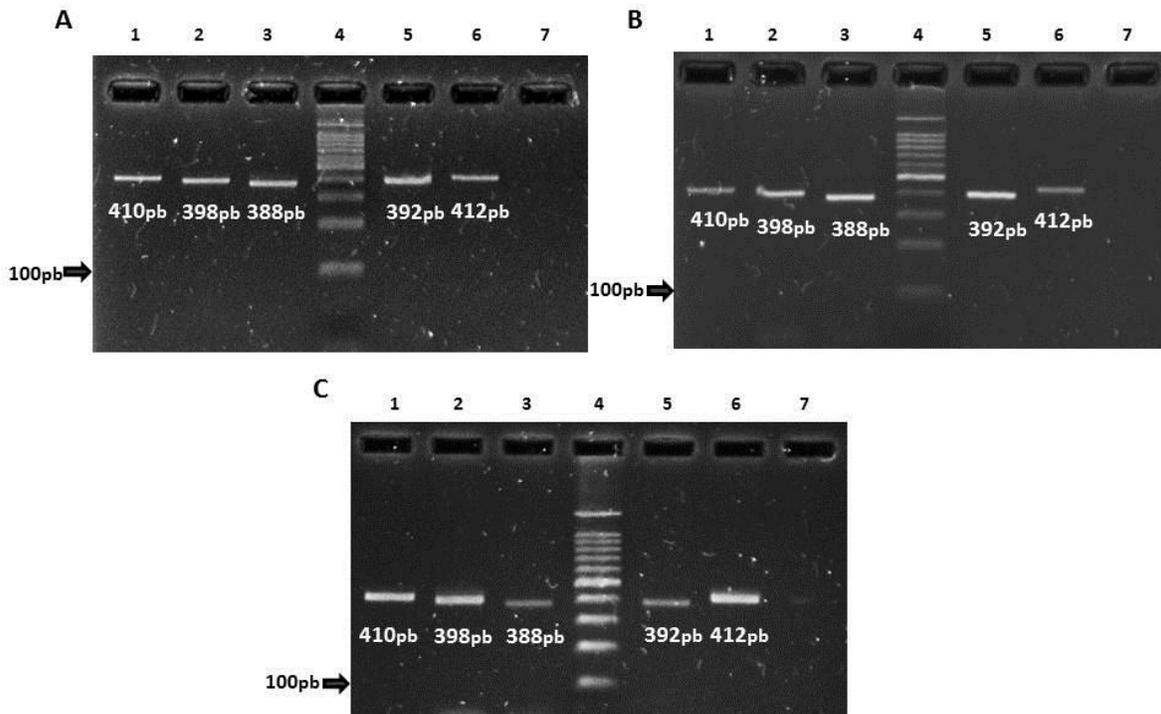
**Figura 6.** Detección del gen *CDR1* en las cepas de *Candida albicans* aisladas de infecciones vaginales.



**Figura 7.** Identificación de *CDR1* por PCR en las cepas de *Candida albicans* aisladas de infecciones vaginales. Carriles 1-3 y 5-6, *CDR1* (300 pb.) en cepas de *C. albicans*; Carril 4, MWM 100 bp-ladder; Carril 7, Control negativo sin ADN molde. Carril 8, cepa de referencia *C. albicans* ATCC32354, control positivo.

### **8.6. Amplificación de 5 segmentos del gen *ERG11*.**

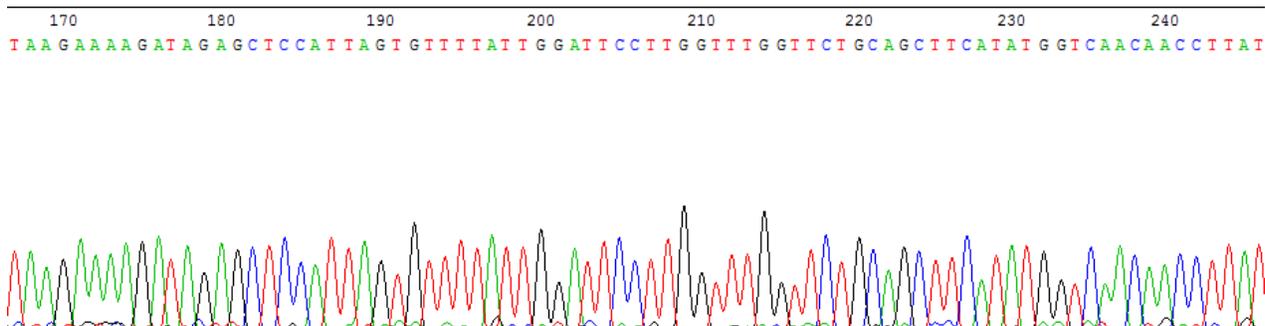
Con el propósito de encontrar las probables mutaciones en el gen *ERG11* se seleccionaron 3 cepas de *C. albicans* resistentes al miconazol y que no presentaron el gen *CDR1*, para posteriormente amplificar por PCR los 5 segmentos del gen *ERG11* (Tabla 4, Figura 8).



**Figura 8.** Identificación de los 5 segmentos del gen *ERG11* por PCR de punto final en las cepas de *Candida albicans* aisladas de infecciones vaginales. **A** (Cepa 188) Carril 1 segmento 1, Carril 2 segmento 2, Carril 3 segmento 3, Carril 5 segmento 4, Carril 6 segmento 5. Carril 4, MWM 100 bp-ladder; Carril 7 control negativo (sin ADN molde). **B** (Cepa 191) Carril 1 segmento 1, Carril 2 segmento 2, Carril 3 segmento 3, Carril 5 segmento 4, Carril 6 segmento 5. Carril 4, MWM 100 bp-ladder; Carril 7 control negativo (sin ADN molde). **C** (Cepa ATCC32354, Control positivo) Carril 1 segmento 1, Carril 2 segmento 2, Carril 3 segmento 3, Carril 5 segmento 4, Carril 6 segmento 5. Carril 4, MWM 100 bp-ladder; Carril 7 control negativo (sin ADN molde).

### **8.7. Secuenciación de los segmentos de *ERG11*.**

Los amplicones del gen *ERG11* obtenidos fueron secuenciados y ensamblados obteniéndose un fragmento del gen de 1700 bases aproximadamente para cada cepa, Figura 9.



**Figura 9.** Secuenciación de los fragmentos del gen *ERG11*, secuencia de bases vista en software Chromas.

### **8.8. Detección de Mutaciones (sustitución de bases en la secuencia del Gen *ERG11*).**

Se realizó una comparación entre las secuencias de las cepas 188, 191, ATCC32354 y una secuencia obtenida de la base de datos del GENBANK (GenBank adhesión no. X13296.1) (Figura 10), en el cual los resultados fueron la sustitución de bases en la secuencia original, los datos se muestran marcando en número de base en la cual se realiza la sustitución en los diferentes segmentos del gen (del 1 al 5) para cada cepa (Tabla 5).

|       |                |  |
|-------|----------------|--|
|       |                | *****  |
| 1     | gi 2503 emb X1 | GTATTTTCATTTATGTTATTAGGGAAAAATTATGACGGTTTATTTAGGTCCAAAAGGTCATGAATT |
| 2     | 191_ENSEMBLED  | GTATTTTCATTTATGTTATTAGGGAAAAATTATGACGGTTTATTTAGGTCCAAAAGGTCATGAATT |
| 3     | 188_ENSEMBLED  | GTATTTTCATTTATGTTATTAGGGAAAAATTATGACGGTTTATTTAGGTCCAAAAGGTCATGAATT |
| 4     | ATCC_          | GTATTTTCATTTATGTTATTAGGGAAAAATTATGACGGTTTATTTAGGTCCAAAAGGTCATGAATT |
| ruler |                | ..... 400 ..... 410 ..... 420 ..... 430 ..... 440 ..... 450 .....  |

**Figura 10.** Comparación entre las secuencias de las cepas 188, 191, ATCC32354 (*Candida albicans* aisladas de infecciones vaginales) y la secuencia X13296.1 (obtenida de la base de datos del GENBANK).

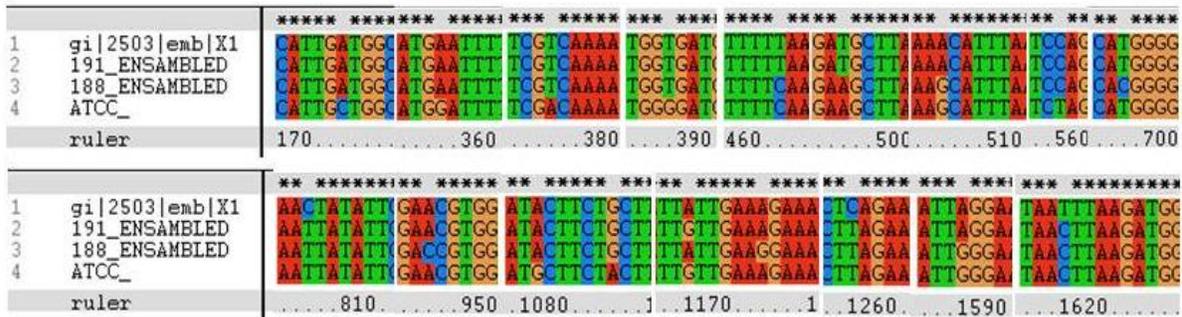
| No. Cepa | Segmento. 1<br>1-450 | Segmento 2<br>451-770 | Segmento 3<br>771-1080 | Segmento 4<br>1081-1400 | Segmento 5<br>1401-1728 |
|----------|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|----------|----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|

|                                       |                                  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------------------------------|----------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| No. de Base                           | 1<br>7<br>3                      | 3<br>5<br>6                                  | 3<br>7<br>5                                  | 3<br>8<br>7                                  | 4<br>6<br>2  | 4<br>9<br>5  | 5<br>0<br>4  | 5<br>5<br>8  | 6<br>9<br>6  | 8<br>0<br>5  | 9<br>4<br>5  | 1<br>0<br>7<br>8   | 1<br>0<br>8<br>4   | 1<br>1<br>6<br>7   | 1<br>1<br>7<br>3   | 1<br>2<br>5<br>7   | 1<br>5<br>8<br>7   | 1<br>6<br>1<br>7   |  |
| X13296                                | A                                | A  | T  | T  | T  | T  | A  | C  | T  | C  | A  | A  | G  | A  | A  | C  | A  | T  |  |
| 188                                   |                                  |  |  |  | C  | A  | G  |  | C  | T  | C  |  |  |  | G  | T  | G  | C  |  |
| 191                                   |                                  |  |  |  |  |  |  |  |  | T  |  |  |  | G  |  | T  |  | C  |  |
| ATCC32354                             | C                                | G  | A  | G  | C  | A  | G  | T  |  | T  |  | G  | A  | G  |  | T  | G  | C  |  |
| Sustitución de aminoácido (mutación). | <b>D</b><br><b>8</b><br><b>A</b> | <b>E</b><br><b>6</b><br><b>9</b><br><b>G</b> | <b>R</b><br><b>7</b><br><b>6</b><br><b>R</b> | <b>G</b><br><b>8</b><br><b>0</b><br><b>G</b> | <b>F</b><br><b>1</b><br><b>0</b><br><b>5</b><br><b>F</b> | <b>D</b><br><b>1</b><br><b>1</b><br><b>6</b><br><b>E</b> | <b>K</b><br><b>1</b><br><b>1</b><br><b>9</b><br><b>K</b> | <b>S</b><br><b>1</b><br><b>3</b><br><b>7</b><br><b>S</b> | <b>H</b><br><b>1</b><br><b>8</b><br><b>3</b><br><b>H</b> | <b>L</b><br><b>2</b><br><b>2</b><br><b>0</b><br><b>L</b> | <b>E</b><br><b>2</b><br><b>6</b><br><b>0</b><br><b>D</b> | <b>T</b><br><b>3</b><br><b>1</b><br><b>0</b><br><b>A</b> | <b>A</b><br><b>3</b><br><b>1</b><br><b>2</b><br><b>T</b> | <b>L</b><br><b>3</b><br><b>4</b><br><b>0</b><br><b>L</b> | <b>K</b><br><b>3</b><br><b>4</b><br><b>2</b><br><b>K</b> | <b>L</b><br><b>3</b><br><b>4</b><br><b>0</b><br><b>L</b> | <b>L</b><br><b>3</b><br><b>7</b><br><b>0</b><br><b>L</b> | <b>L</b><br><b>4</b><br><b>8</b><br><b>0</b><br><b>L</b> | <b>N</b><br><b>4</b><br><b>9</b><br><b>0</b><br><b>N</b> |

**Tabla 5.** Comparación entre las secuencias de las cepas 188, 191, ATCC32354 y una secuencia del GENBANK (GenBank adhesión no. X13296.1), Los resultados fueron la sustitución de bases en la secuencia original, los cambios se muestran en el número de base en la cual se realiza la sustitución en los diferentes segmentos del gen (del 1 al 5) para cada cepa. La parte inferior representa las mutaciones detectadas a partir de la sustitución de aminoácidos (negrita).

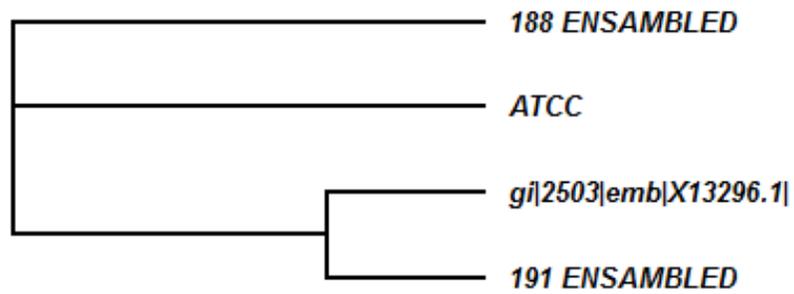
Los resultados de la comparación entre las cepas de estudio (188, 191, ATCC32354) y la cepa de referencia X13296.1 (obtenida de la base de datos del GENBANK) a partir del Software Crustal muestran diferentes sustituciones en la secuencia del Gen *ERG11* a lo largo del marco de lectura correspondiente a 1851 bases. Figura 11. Un total de 18 sustituciones fueron detectadas en los 5 segmentos del Gen. La cepa

ATCC32354 presentó un mayor número de sustituciones (16 sustituciones de bases), la cepa 188 presento 10 sustituciones de bases y la cepa 191 presentó un menor número de sustituciones (4 sustituciones de bases).



**Figura 11.** Comparación entre las secuencias de las cepas 188, 191, ATCC32354 (*Candida albicans* aisladas de infecciones vaginales) y la secuencia X1296.1 (obtenida de la base de datos del GENBANK).Sustitución de bases en el segmento del gen *ERG11*, probables mutaciones puntuales en este gen.

La relación que presentó cada cepa con la secuencia de referencia X1296.1 se resume en el dendrograma (Figura 12), en el cual se aprecia la relación en el número de sustitución de bases. La cepa 191 presentó mayor similitud y por lo tanto menor número de sustituciones de bases en la secuencia. La cepa ATCC32354 presentó el mayor número de cambios en la sustitución de bases, por lo cual no representa mucha similitud con la cepa X1296.1.



**Figura 12.** Dendrograma; en la cual se aprecia la relación en el número de sustitución de bases. La relación que presenta cada cepa de estudio (188, 191, ATCC32354) con la secuencia de referencia (GenBank adhesión no. X13296.1).

## 9. DISCUSIÓN.

### 9.1 Pacientes analizadas.

En el desarrollo de este estudio se analizaron 264 mujeres de la consulta de ginecología del Hospital Regional No. 72 del IMSS con patología de Vulvovaginitis Crónica y Recurrente, identificamos por el método de PCR multiplex que el 15% (n= 40) presento CVV (Figura 3) ocasionada por *C. albicans* (Figura 4), principalmente en mujeres enfermas con intervalo de edad entre 18-39 años (Figura 2) se ha descrito que *C. albicans* es el agente causal del 80% de los casos de candidosis vaginal (Pimentel *et al.*, 2007), mientras que el 20% son ocasionados por otras especies, como *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, entre otras. (Furneri, 2008). Gonzales *et al.*, (1998) reportaron que el 60% de 234 mujeres mexicanas con diagnóstico de cervicovaginitis tuvieron cultivos positivos para *C. albicans* y 40% para *Candida* spp. La CVV puede ser debida a infección (más de la mitad de los casos), aunque también la etiología puede ser no infecciosa (se ven favorecidas por todo lo que produce un aumento del pH vaginal, y suelen corregirse al desaparecer la causa que la originó) (González *et al.*, 2008). Otros factores predisponentes para la infección son: Diabetes no controlada (aumentan el glucógeno celular) (Villalobos *et al.*, 2004), uso de antimicrobianos de amplio espectro como; Tetraciclina, Ampicilina, Cefalosporinas que eliminan flora proteccionista sobre todo

lactobacillus, favoreciendo el crecimiento de *C. albicans* y otras especies (Pimentel *et al.*, 2007), inmunodepresión, terapia de reemplazo hormonal, estrés (Torrez *et al.*, 2005), uso de pantalones ajustados y ropa interior de nylon (fibra sintética) (Buscemi *et al.*, 2004), edades extremas de la vida aunque en menores episodios debido a los bajos niveles de estrógenos, edad joven (15 a 19 años), nuliparidad, uso de espermicidas, fase lútea del ciclo menstrual y el embarazo (García *et al.*, 2006) en el cual los niveles de estrógenos son elevados. Los estrógenos favorecen la transición de células epiteliales de columna a células escamosas estratificadas, facilitando la adherencia y crecimiento de *C. albicans*, además las células levaduriformes poseen receptores para los estrógenos que permiten la formación de micelio (Nas *et al.*, 2008). A pesar de que no se le considera de transmisión sexual, Pérez (1995) encontró 20% de *Candida* spp. en el surco balano-prepucial de parejas con candidiasis vulvovaginalo se puede considerar de origen exógeno también por probable contagio en piscinas, baños, etc. (Pérez, 1995). Las infecciones por la especie *C. albicans* tienden a presentarse con mayor frecuencia en la población de un nivel socioeconómico bajo (Spinillo *et al.*, 1995). En nuestro país las estadísticas de la Candidiosis vulvovaginal son muy escasas, solo las reportadas por algunas instituciones de salud y por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) quien reporta que la vulvovaginitis se encuentra entre las 12 principales motivos de consulta en

medicina familiar con una elevada incidencia por *C. albicans*, el porcentaje de casos se encuentra entre el 15 y 19% (Oviedo *et al.*, 2004).

Por otra parte la vulvovaginitis fue ocasionada por bacterias Gramnegativas como; *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y por Grampositivas como; *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* correspondiente al 85% de los cultivos (n= 224) (Figura 3). La cavidad vaginal alberga una gran cantidad de especies bacterianas que se encuentran en equilibrio, sin embargo este puede alterarse, ocasionando infecciones cervicovaginales por factores internos como los cambios hormonales y de pH durante la menstruación, o factores externos como el uso de anticonceptivos orales, antibióticos, etc.

## **9.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria al Miconazol.**

Desde la perspectiva clínica, la resistencia antibiótica puede definirse como la persistencia o progresión de una infección a pesar de la terapia adecuada, la cual puede determinarse con la concentración mínima inhibitoria que restringe el crecimiento de hongos in vitro.

Los estudios de CMI en este trabajo arrojaron el dato de 55% (n= 22) de cepas resistentes al miconazol (CMI  $\geq 26$   $\mu\text{g/ml}$ ), 25% (n= 10) presentó susceptibilidad intermedia (CMI= 0.21-0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) y el 20% (n= 8) fue

susceptible (CMI <20 µg/ml). Este estudio muestra el mayor número de cepas reportadas como resistentes (55%) en los últimos años.

En estudios previos se observa que al pasar de los años las cepas se van seleccionando como resistentes a los azoles. Un estudio a partir de 80 cepas realizado en el 2002 obtuvo el resultado de la CMI de miconazol fue de 45% resistentes (Paniagua *et al.*, 2002). En el 2004, se estudiaron 32 aislamientos de *Candida* spp. con diferentes tratamientos, el Itraconazol; se reportó 43.75% resistencia (14 aislamientos) . El Ketaconazol; se encontró una resistencia de 8.82% (3 aislamientos). El Fluconazol; se reportó una resistencia de 14.7% (5 aislamientos) (Díaz *et al.*, 2004). Arechavala *et al.*, en el 2007 realizaron un trabajo para determinar la susceptibilidad (CMI) a fluconazol y albaconazol en 100 cepas de levaduras aisladas de 94 pacientes con vulvovaginitis. Todas las cepas determinadas como *C. albicans* fueron sensibles. En el 2009 se realizó un trabajo en el cual recabaron los siguientes datos para *Candida neoformans* 1997-2000; en 688 aislamientos, el 7.3% fue resistente, de 2001-2004; en 1812 aislamiento 10.9% fue resistente y del año 2005 al 2007; 1012 aislamientos presentaron una resistencia de 11.7% todos tratados con Fluconazol, lo cual representa un índice el incremento de la resistencia al tratamiento (Pfaller *et al.*, 2009).

Los antifúngicos azólicos, fueron introducidos en la práctica terapéutica desde 1969, siendo los primeros en utilizarse el clotrimazol, miconazol y

econazol, posteriormente siguieron el ketoconazol, fluconazol e itraconazol (Falkowski, 2005). Posiblemente este sea una de las causas por las cuales se presenta la resistencia de las cepas al Miconazol, ya que es uno de los primeros tratamientos utilizados para combatir la candidosis.

El mecanismo de acción es el de inhibición de la síntesis del ergosterol, al inhibir la conversión de lanosterol a ergosterol, produciendo cambios en la composición lipídica de la membrana celular del hongo. Este cambio estructural altera la permeabilidad celular y finalmente conduce a algunos trastornos asociados a la membrana; disrupción osmótica o inhibición del crecimiento de la célula fúngica (Ciudad, 2007).

### **9.3. Identificación por PCR convencional de los genes que confieren resistencia a los azoles en las cepas de *C. albicans*.**

Aunque se han descrito diversos mecanismos implicados en la resistencia a los azoles, existen estudios genéticos recientes que demuestran la implicación de genes específicos en la resistencia clínica. Los mejor caracterizados hasta la fecha son los genes *MDR1* y *CDR1*, que codifican proteínas que pertenecen, respectivamente, a las familias MFS y ABC de transportadores de fármacos. Estas proteínas responden al potencial de membrana (MFS) o hidrolizan ATP (ABC) provocando la salida del fármaco y reduciendo así su acumulación intracelular. Se ha demostrado que

algunas cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes sometidos a terapia con azoles de larga duración tienen niveles elevados del ARNm de dichos genes (Hernández *et al.*, 1997). Para determinar la resistencia a los azoles por causa de estos genes en cepas de *C. albicans*, los genes fueron identificados en este estudio por el método de PCR convencional, en el cual el gen *CDR1* fue identificado en 65% de las cepas (Figura 6), por tal motivo se asume que la detección de este gen (*CDR1*, una bomba facilitadora de eflujo) contribuye a la resistencia al Miconazol.

La resistencia a los azoles está relativamente diseminada, especialmente en *Candida albicans* y *C. dubliniensis*. La resistencia a los azoles también se encuentra asociada con la expresión de la enzima *ERG11* y mutaciones de otras enzimas que actúan en la síntesis del ergosterol, con eliminación activa de la droga por expresión de las bombas de flujo y disminución de la permeabilidad de membrana por alteraciones en los esteroides (Cowen *et al.*, 2002).

#### **9.4. Detección de Mutaciones (sustitución de bases en la secuencia del Gen *ERG11*).**

Con el propósito de encontrar las probables mutaciones en el gen *ERG11* se seleccionaron 3 cepas de *C. albicans* que fueron resistentes al miconazol y que no presentaron el gen *CDR1* (cepa No. 188, 191 y ATCC32354), se

amplificaron por PCR los 5 segmentos del gen *ERG11* (Tabla 4, Figura 8) y los amplicones obtenidos del gen *ERG11* fueron secuenciados y ensamblados, obteniéndose un fragmento del gen de aproximadamente 1579 bases para cada cepa (Figura 9). Posteriormente entre estas secuencias se realizó una comparación con una secuencia estándar de *C. albicans* SC5314 obtenida de la base de datos del GENBANK (GenBank adhesión no. X13296.1) (Figura 10). El marco de lectura del gen *ERG11* correspondió a 1851 bases. Las lecturas poseían similares secuencias corroborando la presencia de este gen en el dendograma filogenético (Figura 12). En lo que corresponde a las variaciones genéticas, la cepa ATCC32354 presentó una mayor variabilidad y la cepa No. 191 menor variación. Un total de 18 mutaciones (cambios en la secuencia de aminoácidos) diferentes fueron detectadas a lo largo de los 5 segmentos del gen *ERG11* (Tabla 5). La mayoría de sustituciones de bases fueron de silencio, solo 6 de las mutaciones resultaron en intercambio de aminoácidos D8A, E69G, D116E, E266D, T310A y A312T. De las cuales 5 corresponden a la cepa ATCC32354 y 2 a la cepa No. 188, ambas cepas clasificadas como resistentes al miconazol. La mutación en la cual ambas cepas coinciden es D116E. 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 sobreexpresión o por mutaciones puntuales del gen *ERG11*.

Algunas de estas mutaciones ya han sido reportadas con anterioridad por otros autores. D116E y E266D, que son dos mutaciones encontrados con mayor frecuencia en aislamientos de cepas R y SDD al fluconazol (Lerzan, 2009).

Loeffler *et al.*, (2003) identificó algunas mutaciones tales como F105L, E266D, K287R, G448R, G450S, G464S, V488I en *ERG11* de *C. albicans* aislados R a fluconazol. Por mencionar algunos de estos autores.

Lerzan *et al.*, (2009) realizaron un estudio para investigar Y132H y otras mutaciones en el genotipo *ERG11* que confiere resistencia a fluconazol en diecisiete cepas de *Candida albicans*. Estos autores describieron que las mutaciones K143R, G464S, G465S, V488I, S412T y R469K en el gen *ERG11* fueron mecanismos eficaces en la resistencia a fluconazol en las cepas *C. albicans*. Sin embargo ninguna de estas mutaciones reportadas por este autor coincide con las detectadas en este estudio. Probablemente se debe a que en este estudio el azol de interés fue miconazol.

Lee *et al.*, en el 2004 reportaron dos mutaciones que no habían sido descritas anteriormente, en un estudio realizado a partir de doce aislamientos de *C. albicans* con diferentes susceptibilidades in vitro de fluconazol, estas mutaciones son V404I y V509M encontradas en cepas con dosis susceptible dependiente (SDD) y resistentes (R). Así mismo en este estudio se reportan mutaciones que no han sido descritas con anterioridad

por otros autores, estas mutaciones son D8A, E69G, T310A y A312T, que probablemente sean detectadas en futuras investigaciones y quizás sean factores importantes en la resistencia al miconazol.

Los cambios de bases muestran mutaciones en el gen (Tabla 5), se cree que estas desempeñan un papel en la resistencia, pero deben ser evaluados con estudios avanzados como mutagénesis dirigida a sitio y clonación.

## 10. CONCLUSIONES.

- La mayor frecuencia de las pacientes estudiadas con sintomatología de candidosis vulvovaginal se encontró en el intervalo de edad 18-39 años.
- En este estudio la resistencia al miconazol en las cepas de *Candida albicans* analizadas fue elevada, con un 55% de cepas resistentes.
- El gen *CDR1* fue detectado en el 65% de las cepas y el gen *MDR1* no se detectó en ninguna de las cepas de *C. albicans*.
- Un total de 18 mutaciones distintas (cambios en la secuencia de aminoácidos) fueron detectadas a lo largo de los 5 segmentos del gen *ERG11* en las tres cepas estudiadas.
- La resistencia al miconazol por las cepas de *C. albicans* carentes de *CDR1*, probablemente pueda deberse a las diferentes combinaciones de las mutaciones identificadas en el gen *ERG11*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

1. 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.
2. Allistair JP, Brown AR, Gow AR. 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 7:333-338.
3. Arechavala IA, Bianchi HM, Robles A, Santiso G y Negroni R. 2007. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol. *Rev. IberoamMicol.* 24:305-308.
4. Basso LR, Gast CE, Yuxin M, Wong B. 2010. Fluconazole transport into *Candida albicans* secretory vesicles by the membrane proteins Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p. *EukCell* 9:960-970.
5. Buscemi L, Arechavala A, Negroni R. 2004. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en el hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev. IberoamMicol*; 21(4).
6. Ciudad RA. 2007. Infecciones Vaginales por *Cándida*: diagnóstico y tratamiento, *Rev. PerGinecolObstet.* 53:159-166.
7. Cowen LE, Anderson JB y Kohn LM. 2002. Evolución de la Resistencia Antibiótica de *Candida albicans* *Rev. AnnualReview of Microbiology* 56:139-165.

8. Díaz LM, Oliveros GO, Orozco DO. 2004. Análisis SSCP (ITS2, *ERG11*) de aislamientos clínicos de *Candida* ssp. de cavidad oral en pacientes oncogénicos. Rev. IberoamMicol 21:182-186.
9. Falkowski JC. 2005. Catedra de Química Medicinal. Fac. Exts. Qcas y Nat-Unam.
10. 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.
11. 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. 20:336-340.
12. Galgiani JN, Drutz DJ, Feingold DS, Kerkering TM, Mc-Carthy LR, Saubolle MA, Sherris. JC. 1985. Committee report. Antifungal susceptibility testing. National Committee for Clinical, Laboratory Standards. Villanova. 5:433-481.
13. García HM, García SD, Copolillo EF, Cora EM, Barata AD, Vay CA. 2006. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Rev. Argent Microbiol: 38.
14. Gaur NK, Klotz SA. 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALS1*, that confers adherence properties upon

- Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. Infect Immun. 65:5289-5294.
15. Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. ClinMicrobiol Rev. 13:122–143.
  16. González GE, Olmos CO, Sancho PB, 2008. Cuadernos Multidisciplinares en Micosis. Madrid, 5-19.
  17. González PA, Ortiz ZC, Inzunza MA, Ponce RE. 1998. Candidiasis vaginal: Diagnóstico y tratamiento en atención clínica primaria. Aten Primaria. 21:395-398.
  18. Hellstein J, VawterH, Fotos P, Schmid J, Soll DR. 1993. Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. J ClinMicrobiol. 31:3190–3199.
  19. Hernáez ML, Pla J y Nombela C. 1997. Aspectos moleculares y genéticos de la resistencia a azoles en *Candida albicans*. Rev. IberoamMicol. 14:150-154.
  20. Hube B. 1998. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infection. Rev. IberoamMicol. 15:65–68.
  21. Lee MK, Williams LE, Warnock DW y Arthington SB. 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 53:217–224.

22. Lerzan M, Cem E y Mine Y. 2009 Investigation of mutations in *Erg11* gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* 54:99–104.
23. Lo HJ, Kohler JR, Domenico DB, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. 1997. Non filamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90:939-949.
24. Loeffler J, Stevens DA. 2003. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis*. 36: 31–41.
25. Luo G, Mitchell GT. 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J ClinMicrobiol*. 40:2860-2865.
26. Madigan T, Martinko J, Parker JB. 2003. *Biology of Microorganisms*. 10<sup>th</sup> ed. Prentice Hall. p. 737.
27. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. 2010. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14 alpha-demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3578-3583.
28. Martínez O, Saldaña GJ, Sánchez HM. 2007. Criterios para el diagnóstico de cervicovaginitis aplicados en el primer nivel de atención. Correlación con la norma oficial mexicana. *Rev. Med IMSS*. 45:249-254.

29. Mitchell PA. 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *CurrOpiMicrobiol.* 1:687-692.
30. 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.
31. Odds FC, Gow NAR, Brown AJ. 2006. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In: Heitman J, Filler SG, Edwards JE Jr, Mitchell AP (eds). *Molecular principles of fungal pathogenicity*. Washington DC: ASM Press. 305-319.
32. Oviedo MA, Reyes MH, Flores HS, Pérez CR. 2004. Fundamentos de las guías clínicas basadas en evidencia. En: Reyes MH, Pérez CR, Trejo y Pérez JA, editores. *Guías de práctica clínica para medicina familiar*. México: El Manual Moderno. 9-13.
33. Pam KV, Akpan UJ, Oduyebo OO, Nwaokorie OF, Fowora AM, Oladele OR, Ogunsola TF, Smith IS. 2012. Fluconazole susceptibility and *ERG11* gene expression in vaginal candida species isolated from Lagos Nigeria. *Int J MolEpidemiol Genet*; 3(1):84-90.
34. Paniagua CG, Monroy PE, Negrete CE, Vaca PS. 2002. Susceptibility to 5-Fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *Candida albicans* strains isolated from the throat of non-AIDS patients. *Rev. LatMicrobiol.* 44:65-68.
35. Pérez SA. 1995. *Ginecología*. 2da ed. Santiago (Chile): Publicaciones técnicas Mediterráneo.

36. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Bijie H, Dzierzanowska D, Klimko NN, Letscher BV, Lisalova M, Muehlethaler K, Rennison C, Zaidi M y the Global Antifungal Surveillance Group. 2009. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing, *Journal of Clinical Microbiology* 47:117–123.
37. Pimentel SB, Reynolds ME, 2007. Candidiasis vaginal. *Rev. Paceaña Med. Fam.* 4(6):121-127.
38. Podust LM, Poulos TL, Waterman MR. 2001. Crystal structure of cytochrome P450 14 alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *ProcNatAcadSci USA.* 98:3068–3073.
39. Reed BD. 1992. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *ObstetGynecolSurv* 47:551- 560.
40. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR. 1998. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J ObstetGynecol.* 178:203–211.
41. Sobel JD. 1985. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J ObstetGynecol.* 152:924-395.

42. Sobel JD, Muller G, Buckley HR. 1984. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun.* 44:576–580.
43. Sobel JD. 1997. Vaginitis. *N Engl J Med.* 337:1896–1903.
44. Sobel JD. 1999. Vulvovaginitis in healthy women. *ComprTher.* 25:335-346.
45. Soll DR, Langtimm CJ, McDowell J, Hicks J, Galask R. 1987. High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J ClinMicrobiol.* 25:1611–1622.
46. Spinillo A, Capuzzo E, Egbe TO, Incola S, Piais G. 1995. *Torulopsis glabrata* vaginitis. *ObstetGynecol.* 85:993- 998.
47. Sudbery PE. 2001. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septing ring localization. *MolMicrobiol.* 41:19-31.
48. SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos-2008.
49. Torrez K, Soto A, Sandrea D, Villalobos M, Rodriguez A. 2005. Candidiasis vaginal en primigestas. *Rev. ObstetGinecolVenez:* 65(2).
50. Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR. 2000. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J ClinMicrobiol.* 38:3595–3607.

51. Velasco MV, Pozos CJ, Cardona PJ. 1999. Enfermedades infecciosas del cérvix uterino, vagina y vulva: prevención, diagnóstico y tratamiento. Rev. Med IMSS 37:185-191.
52. Vermes A, Guchelaar HJ, Danker J. 2000. Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. JAntimicrobChemoter. 46:171-179.
53. Villalobos N, Ameer R, Colina M, Hernández E. 2004. Flora vaginal en pacientes seropositivas y seronegativas del virus de inmunodeficiencia humana. Rev. GinecolObstetVenez: 64(3).
54. Weisberg M. Considerations in therapy for vulvovaginal candidiasis: when and whom to treat. In: Sobel J, 1988. Ed. Clinical perspectives: terconazole, an advance in vulvovaginal candidiasis therapy 51:1-8.
55. Whitfield G, Brock TD, Ammann A, Gottlieb D, Carter H. 1955. Filipin, an antifungal antibiotic: isolation and properties. J Am ChemSoc. 77: 4799-4801.
56. Xu J, Sobel JD. 2003. Antibiotic-associated vulvovaginal Candidiasis. Curr Infect Dis Rep 5:481-487.
57. Xu J, Ramos AR, Vilgalys R, Mitchell TG. 2000. Clonal and Spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. Journal of Clinical Microb. 38 (3), 1214-1220.