

Dra. Hilda Sánchez Hernández



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZALEZ

TITULO:

**“FILOGENIA MOLECULAR Y RESISTENCIA ANTIFUNGICA DE CANDIDA
AISLADAS DE PACIENTES CON VULVOVAGINITIS ATENCION EN LOS
CASOS DE REPETICION”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO EN:

GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

HILDA SANCHEZ HERNANDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ELBA LUCIA RANGEL GAMBOA

MEXICO D.F. 02 DE JUNIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

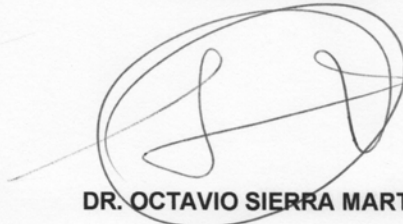
Dra. Hilda Sánchez Hernández

Filogenia molecular y resistencia antifúngica de especies de Candida aisladas de pacientes con vulvo-vaginitis con atención especial en los casos de repetición

Dra. Hilda Sánchez Hernández

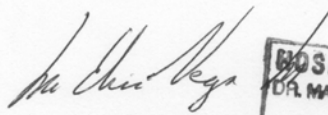
HOSPITAL GENERAL MANUEL GEA GONZALEZ

AUTORIZACIONES



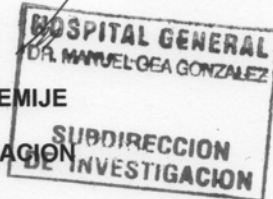
DR. OCTAVIO SIERRA MARTINEZ

DIRECTOR DE ENSEÑANZA



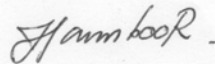
DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE

SUBDIRECTOR DE INVESTIGACIÓN



DR. JORGE AUDIFRED SALOMON

JEFE DE SERVICIO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA



DRA. ELBA LUCIA RANGEL GAMBOA

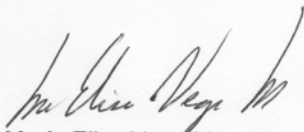
INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dra. Hilda Sánchez Hernández

Filogenia molecular y resistencia antifúngica de especies de Candida aisladas de pacientes con vulvo-vaginitis con atención especial en los casos de repetición

Dra. Hilda Sánchez Hernández

Este trabajo de tesis con el número 11-77-2015, representado por la Dra. Hilda Sánchez Hernández se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis, la Dra. Elba Lucia Rangel Gamboa con fecha 13 junio 2016.



Dra. María Elisa Vega Memije

Subdirección de Investigación



Dra. Elba Lucia Rangel Gamboa

Investigador Principal

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo incondicional y amable colaboración de:

1. Dr. Fernando Martínez Hernández, para la creación del archivo .fdi en el Software Network los cuales permitió construir el árbol de redes haplotípicas.
2. QFB. Fabiola Sánchez, en la recolección de las muestras positivas para levaduras en el laboratorio clínico así como por su orientación para la ejecución de las pruebas de susceptibilidad antifúngica.
3. Al Dr. Samuel Weingerz, por sus aportaciones en la redacción del protocolo.

INDICE

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Autorizaciones | 2 |
| Agradecimientos | 4 |
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| 1. Introducción | 8 |
| 2. Marco de referencia | 12 |
| 3. Planteamiento del problema | 14 |
| 4. Hipótesis | 15 |
| 5. Objetivos | 15 |
| 6. Justificación | 16 |
| 7. Diseño experimental | 17 |
| 8. Materiales y métodos | 17 |
| 9. Resultados | 29 |
| 10. Discusión | 47 |
| 11. Conclusiones | 48 |
| 12. Referencias bibliográficas | 55 |

RESUMEN

La vulvovaginitis por *Candida spp.* (VVC) se considera una condición patológica que puede ser de transmisión sexual. Afecta millones de mujeres al año, causa incomodidad e interfiere con las relaciones afectivas y sexuales, así como con el rendimiento laboral. La VVC es producida por un crecimiento anormal de levaduras en la mucosa genital femenina. Se caracteriza clínicamente por prurito vulvar intenso, leucorrea, dispareunia, disuria, edema y eritema vulvar. El incremento en la frecuencia de *Candida no albicans* se asocia tanto a factores del huésped como de los patógenos. En general se observa un aumento de la incidencia de especies de *Candida no albicans* comparado con *C. albicans*, algunas de estas especies como *Candida glabrata* y *Candida krusei*, pueden ser resistentes a la terapia antifúngica con azoles. **Objetivo:** Determinar las especies de *Candida*, sus patrones resistencia/susceptibilidad a los antifúngicos y las relaciones filogenéticas y de genética de poblaciones de los aislados obtenidos en pacientes con episodios de vulvovaginitis que acudieron a la consulta externa de ginecología del “Hospital General Dr. Manuel Gea González”. **Material y métodos:** Se considerarán todas las pacientes mayores de 16 años, que acudan a la consulta de ginecología por vulvovaginitis de repetición y resulten positivas en el cultivo para levaduras del género *Candida*. **Resultados.** Durante un periodo de nueve meses, se recolectaron 88 exudados vaginales positivos a diferentes especies del género *Candida*, obtenidos de 79 pacientes. De las 88 muestras, 19 no contaron con las condiciones necesarias para crecimiento de cultivo, extracción y amplificación de ADN; por lo cual se analizaron 69, que pertenecen a 61 pacientes, presentando 55 pacientes con 1 exudado positivo, seis pacientes (10% de la muestra) tenían más de una muestra positiva en dos tomas diferentes, de las cuales cuatro pacientes contaban con dos muestras positivas; un paciente con tres y un paciente con cuatro muestras positivas a *Candida spp.* La edad promedio de las pacientes al momento de la consulta fue 32 años. La mayoría refirió vida sexual activa; en relación al número de parejas sexuales reportaron tener una pareja sexual 32 (46%), dos 19 (28%), tres 13 (19%), cuatro 2 (3%), cero 2 (3%), siete una (1%). En cuanto a los métodos anticonceptivos: Oclusión tubaria bilateral (OTB) 22 (32%), hormonales 9 (23%), preservativos 6 (9%), dispositivo intrauterino (DIU) 5 (7%), histerectomía total abdominal (HTA) 5 (7%) y sin método anticonceptivo 22 (32%) pacientes. En 24 (34%) de los cultivos vaginales se presentaron microorganismos agregados. Utilizando medios cromógenos se reportaron *C. albicans* en 29 (42%), *Candida spp.* 39 (57%) y *C. glabrata* 1(1%). El análisis filogenético molecular demostró un predominio de *C. glabrata* en las pacientes con vulvovaginitis de repetición, así como mayor resistencia *in vivo* e *in vitro* a los antifúngicos, comparada con *C. albicans*. El análisis de genética de población evidenció poca variación genética de los aislados mexicanos comparados con los del resto del mundo.

ABSTRACT

Candida spp. vulvovaginitis (CVV) is considered a pathologic condition usually related with sexual intercourse. Millions of women are affected annually, suffering discomfort, affecting emotional and sexual relations and impairment in work execution. CVV is produced by abnormal development of yeast on female genital mucosa. Clinical characteristics included intense vulvar pruritus, leucorrhea, dyspareunia, dysuria, edema and vulvar erythema. The increase on *Candida no albicans* frequency has been associated with host and pathogen factors. In general, an increase on *Candida no albicans* incidence compared with *C. albicans*, have been observed and few species such as, *Candida glabrata* and *Candida krusei*, could be resistance to antifungal treatment with azoles. **Objective:** To determine species of *Candida* presented in patients with vulvovaginitis studied at Gynecologic Department of *General Hospital "Dr. Manuel Gea González"*, and the patterns of resistance/susceptibility to antifungal of these isolates, plus phylogenetic and genetic population relations. **Material and methods:** all patients older than 16 years old with clinical diagnosis of vulvovaginitis and confirmed by culture were included. **Results.** During a period of 9 months, 88 samples positive to *Candida spp.*, were recollected, there were isolated from 79 patients. 19 samples were excluded because culture didn't grow or technical problems were presented during DNA extraction or amplification; that is why, only 69 were analyzed, belong to 61 patients, 55 women have one positive result, whereas 6 patients (represented 10% of the sample) have more than one culture positive from two independent examinations, four of these had two positive samples; one patient had three positive samples and other had four positive samples to *Candida spp.* The age average of females at the moment was 32 years old. Most of them have sexual partners, with one companion 32 (46%); two 19 (28%); three 13 (19%); four 2 (3%), seven 1 (1%), and without mate 2 (3%). In relation with use of anti-conception methods, 22 (32%) females reported use of bilateral tubal occlusion (BTO), other methods as hormones 9 (23%), condoms 6 (9%), intrauterine device (IUD) 5 (7%), total abdominal hysterectomy (TAH) 5 (7%) and without method 22 (32%). Associated microorganisms were presented in 24 (34%) of cultures. Phenotype identification using chromogenic media revealed *C. albicans* in 29 (42%), *Candida spp.* 39 (57%) and *C. glabrata* one (1%) patients. Phylogenetic analysis confirmed *C. glabrata* high frequency in patients with more than one episode of vulvovaginitis. Moreover, these isolates shown more *in vivo* and *in vitro* resistance to antifungal treatment, compared with *C. albicans*. Population genetic analyzes revealed lack of genetic variation of *C. glabrata* isolated compared with isolates from the rest of the world.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la organización mundial de la salud la vulvovaginitis por *Candida spp.* (VVC) se considera una condición patológica que frecuentemente puede ser de transmisión sexual. Afecta millones de mujeres al año, causa incomodidad e interfiere con las relaciones afectivas y sexuales, así como con el rendimiento laboral. La VVC es producida por un crecimiento anormal de levaduras en la mucosa genital femenina. Se caracteriza clínicamente por prurito vulvar intenso, leucorrea, dispareunia, disuria, edema y eritema vulvar. Cuando existen condiciones favorables las levaduras vaginales pueden ser patógenas. Diversos factores aumentan el riesgo, como la colonización previa por otras levaduras, enfermedades o tratamientos inmunosupresores, etc.¹

El incremento en la frecuencia de *Candida no albicans* se ha asociado tanto a factores del huésped como de los patógenos. Existen factores bien conocidos como la inmunosupresión (HIV, tratamiento con esteroides o inmunomoduladores en pacientes postransplantados, pacientes con cáncer, diabetes o neutropenia).^{2 3}
^{4 5} También el uso frecuente de tratamientos antimicrobianos ha permitido el incremento de las infecciones causadas por hongos.

Candida albicans es la especie más recuperada en humanos, sin embargo durante los últimos 20 años se han aislado nuevas especies de *Candida* tanto en

pacientes con infecciones nosocomiales como en infecciones adquiridas en la comunidad. En general se observa un aumento de la incidencia de especies de *Candida no albicans* comparado con *C. albicans*, algunas de estas especies como *Candida glabrata* y *Candida krusei*, pueden ser resistentes a la terapia antifúngica con azoles;⁶ cabe destacar que pese a su nombre *C. glabrata* está más relacionada desde el punto de vista filogenético con *Saccharomyces cerevisiae* que con *C. albicans*.⁷

Históricamente *C. glabrata* se consideraba parte de la flora normal en individuos sanos, sin embargo en la actualidad se clasifica como un patógeno destacado, siendo de los reportados con mayor frecuencia en el grupo de *Candida no albicans*. Las infecciones por *C. glabrata* pueden ser mucosas o sistémicas (ejemplo inmunocomprometidos o diabéticos). *C. glabrata* es la única especie de *Candida* que no presenta dimorfismo, por tanto las características morfológicas del patógeno no difieren entre su estado saprofito y patógeno. En general los organismos pertenecientes al género *Candida* forman colonias blancas cremosas, al microscopio se observan blastoconidias ovales. La ausencia de pseudohifas es característica de *C. glabrata*, otra característica que ayuda a identificar a *C. glabrata* en las infecciones vulvovaginales es la presencia de cápsula.⁸ En CHROMagar se pueden identificar diferentes especies del género *Candida*, en este medio *C. albicans* produce colonias verdes; *C. glabrata* se identifica por producir colonias que van del rosa intenso al magenta; mientras que *C. tropicalis*

genera colonias púrpura brillante y *C. krusei* color rosa pálido (Figura 1). Otros medios sólo permiten la distinción entre *Candida albicans* y *Candida no albicans*, entre estos se encuentra el chromID™ *Candida* (bioMérieux) donde las colonias de *C. albicans* se observan en color azul y las de *Candida. spp* en blanco.

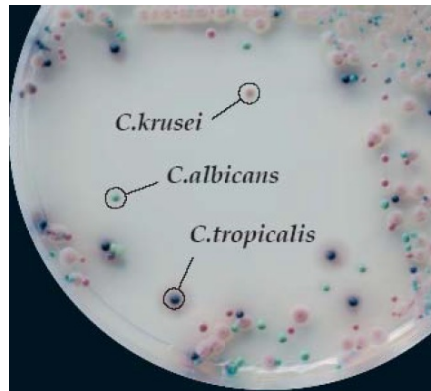


Figura 1. *C. albicans* y *Candida no albicans* en medio CHROMagar.

Una característica distintiva de *C. glabrata* es su genoma haploide comparado con el genoma diploide de otras especies de *Candida*. *C. glabrata* pertenece al grupo de levaduras “*petite-positive*” (positivas pequeñas), caracterizadas por la pérdida parcial (rho-) o incluso la pérdida completa del genoma mitocondrial (rho0), la cuál no es letal para esta levadura. Desde el punto de vista bioquímico se distingue por asimilar sólo glucosa y trehalosa, ésto asociado con un proceso evolutivo regresivo que involucro la pérdida de 29 genes participantes en el metabolismo de la galactosa y otros azúcares, así como de genes participantes en el metabolismo del nitrógeno, sulfuro y fosfato. En la

actualidad se considera un linaje de levadura relacionado pero distante a *C. albicans*, entendiéndose que ambos linajes evolucionaron de forma independiente como patógenos.⁹ En estudios recientes, *C. glabrata* se encontró como la segunda o tercera causa de candidiasis mucosa incluyendo vulvovaginitis. Como factores de virulencia en *C. glabrata* se describió la producción de proteinasa e insensibilidad a factores medioambientales entre otros.¹⁰ En nuestra institución en el año 2013, se estudiaron 150 muestras de pared vaginal de pacientes asintomáticas entre 15 y 77 años, atendidas en el departamento de citología cervical, de las cuales el 47% presentó *C. albicans*, 26% *C. krusei*, 21% *C. glabrata* y 15% *C. tropicalis*; datos que evidencian la presencia de *Candida no albicans* en la población general.¹¹

Por otra parte, si bien se reconoce la importancia de las especie de *Candida no albicans* como patógenos emergentes, se conoce poco de la epidemiología de los mismos. En los Estados Unidos de América, las vaginitis causadas por *C. glabrata* representan entre el 5 a 10% del total.¹² *In vitro* *C. glabrata* usualmente es sensible a los diversos imidazoles, pero requiere concentraciones inhibitorias medias (MICs) mayores a las efectivas habitualmente contra *C. albicans*, con excepción del fluconazol al cual muestra poca actividad *in vitro* y con frecuencia franca resistencia *in vivo*. Sin embargo, *in vivo* los azoles diferentes al fluconazol tienen una tasa de efectividad en vaginosis por *C. glabrata* del 50%. Con otras opciones como el ácido bórico en cápsulas se reportó una efectividad de 70%

utilizando 600 mg/día por 14 días, también se recomienda como tratamiento nistatina o flucitosina OD por 14 días.

2. MARCO DE REFERENCIA

La diferenciación entre *C. albicans* y las *Candida no albicans*, no es posible utilizando simplemente las características macro y microscópicas de los cultivos, sino que requiere de pruebas bioquímicas o de medios especiales que permitan identificar características especiales como el dimorfismo o la formación de blastoesporas. Para facilitar su rápida identificación en los laboratorios clínicos, se diseñaron métodos especiales como el medio CHROMagar, mencionado previamente. Sin embargo estos métodos no identifican todas las especies de *Candida no albicans*, por lo cual es importante considerar métodos altamente sensibles y específicos como la identificación molecular.

En la actualidad existen secuencias comúnmente empleadas para establecer especies y subespecies. La selección de dichas secuencias debe considerar entre otros factores que los estudios de diversidad genética se benefician analizando genes que muestran variación ecológica relevante, más que marcadores aleatorios como los microsatélites.¹³ Una secuencia frecuentemente empleada y cuya utilidad es reconocida ampliamente es, el ITS (por sus siglas en

inglés “Internal Transcribed Spacer” I y II), estas regiones se ubican entre los genes que codifican para las subunidades ribosomales 18S, 5.8S y 28S, dichas subunidades son esenciales para la síntesis de proteínas y se encuentran altamente conservadas, mientras que las regiones ITS al no ser codificantes presentan menor presión selectiva y mayor variabilidad. La ITS-II es útil para estudiar taxones estrechamente relacionados que divergieron hace menos de 50 millones de años y se consideran como una de las mejores herramientas para el análisis de sistemática de especies y subespecies. Por otra parte la secuencia comprendida por el ITS-I, el gen 5.8S e ITS-II se ha utilizado para demostrar diferencias entre especies. Por lo antes mencionado, en este estudio consideramos la identificación molecular de los aislados de *Candida spp.*, utilizando el segmento que comprende las regiones conocidas como ITS-I e ITS-II, así como el DNA que codifica para las subunidades ribosomales 5S y 28S (Figura 2).¹⁴

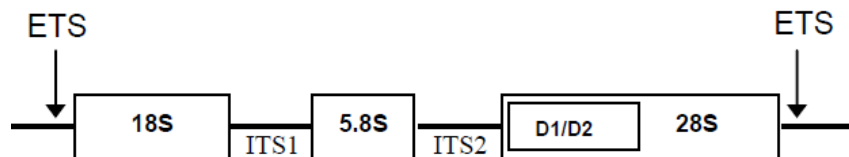


Figura 2. Ubicación de los genes ribosomales 18S, 5.8S, 28S y de las regiones ITS-I e ITS-II.

Las infecciones por *Candida albicans* son comúnmente tratadas con drogas antifúngicas, las cuales inhiben la biosíntesis de ergosterol. La *C. albicans* puede

desarrollar resistencia a las drogas antifúngicas (azoles) por varios mecanismos, incluyendo las mutaciones enzimáticas codificadas por ERG11, la sobre expresión de ERG11 y de otros genes son causas frecuentes de resistencia clínica a *C. albicans*.¹⁵

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas se reportó un incremento en la presencia de *Candida no albicans* a nivel mundial. En México, se reportan como patógenos oportunistas en infecciones nosocomiales. En secreciones del tracto genital femenino se encontraron presentes en pacientes asintomáticas. Sin embargo se desconoce su incidencia en las pacientes con vulvovaginitis o si existe asociación con los casos de vulvovaginitis a repetición. Por lo anterior, identificar las especies de *Candida* presentes en nuestra población es importante, ya que los patrones de especiación y las especies causantes pueden variar al estar influidos por las condiciones del medio ambiente en cada localidad. En este contexto, identificar las especies de *Candida spp.*, presentes en las pacientes con vulvovaginitis, estudiar su susceptibilidad y resistencia antifúngica, sus relaciones filogenéticas y su genética de población en relación a aislados de otros países, constituye información relevante para el manejo de las pacientes con vulvovaginitis en especial en aquellos casos recurrentes.

4. HIPOTESIS

Las pacientes con un único episodio de vulvovaginitis por levaduras presentarán como agente causal a *C. albicans* mientras que las pacientes con vulvovaginitis de repetición por levaduras presentarán mayor frecuencia de especies pertenecientes al grupo de *Candida no albicans*.

5. OBJETIVOS

1. Determinar las especies de *Candida* presentes en las pacientes con vulvovaginitis que acudieron a la consulta externa de ginecología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.
2. Identificar las pacientes con vulvovaginitis de repetición y las especies de levaduras presentes en estos casos.
3. Conocer los patrones de resistencia y susceptibilidad a los antifúngicos de los aislados de *Candida spp.* obtenidos de pacientes con vulvovaginitis de repetición.
4. Establecer las relaciones filogenéticas y de genética de poblaciones de los aislados obtenidos.
5. Determinar si existe asociación entre la especie y los patrones de susceptibilidad y resistencia antifúngica.

6. JUSTIFICACION

La vulvovaginitis es una causa frecuente de consulta ginecológica y se estima que tres de cada cuatro mujeres (75%) padecen una infección por levaduras,¹⁶ algunas pacientes presentan múltiples episodios, lo que da origen al concepto de vulvovaginitis de repetición, en algunos casos la recurrencia se asocia a factores del huésped como diabetes o tratamiento inmunosupresión, pero en otros puede estar asociado a las características de la levadura causante, por lo cual es importante identificar con exactitud tanto la presencia de factores predisponentes, como la especie del agente causal. En nuestra institución en la actualidad las levaduras provenientes de exudados vaginales se clasifican de rutina con medios cromogénico que permiten sólo la distinción entre *C. albicans* y *Candida spp.*, o *C. no albicans*; sin embargo, en estos casos en general, no se identifican de rutina otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, etc., (por motivos de costos) ni se realizan las pruebas de susceptibilidad antifúngica, por lo cual se desconoce cuáles son las levaduras asociadas, hecho que es importante especialmente en los casos de repetición. En este sentido, el presente trabajo permitió la identificación tanto de factores epidemiológicos como del agente asociado a las vulvovaginitis de repetición.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

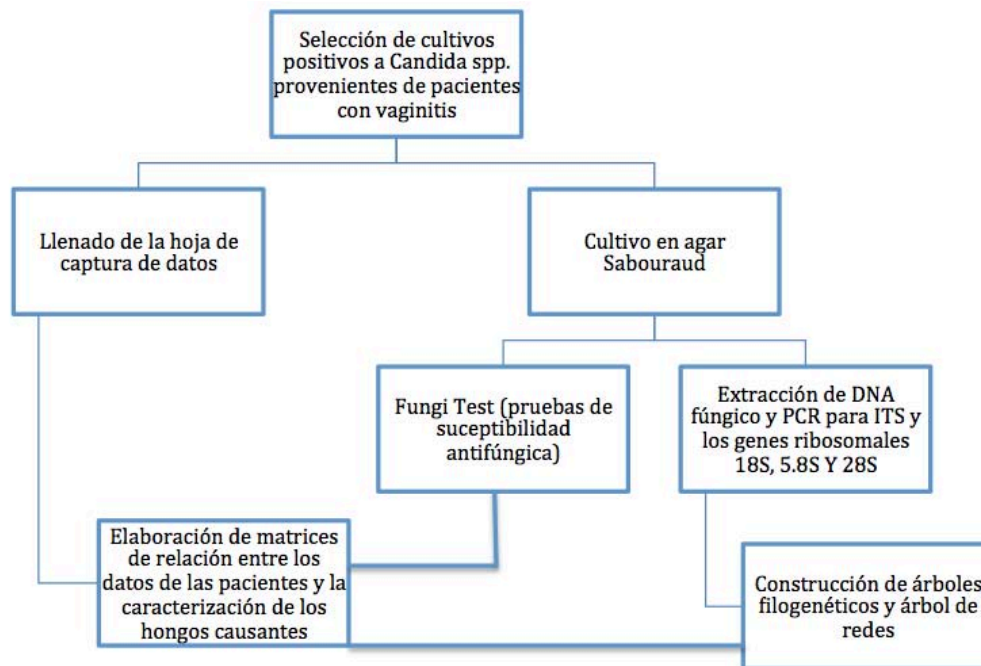


Figura 3. Flujograma del diseño experimental

8. MATERIALES Y METODOS

8.1. Universo de estudio

Se seleccionaron del laboratorio clínico los cultivos positivos de pacientes con diagnóstico clínico y microbiológico de vulvovaginitis por levaduras de abril 2015 hasta septiembre 2015.

8.2. Población de estudio

Se seleccionaron del laboratorio clínico los cultivos positivos para levaduras del género *Candida* obtenidos de pacientes con datos clínicos de vulvovaginitis desde abril de 2015 hasta septiembre 2015.

8.3. Tamaño de la muestra

Se realizó por conveniencia de acuerdo al número de cultivos positivos para levaduras del género *Candida* que se reportaron en el laboratorio clínico y que provenían de pacientes con diagnóstico clínico de vulvovaginitis, en el período de estudio mencionado.

8.4. Criterios de selección

Cultivos provenientes pacientes con diagnóstico clínico de vulvovaginitis que presentaron crecimiento de colonias blancas cremosas compatibles con levaduras del género *Candida* en agar Sabouraud.

8.5. Criterios de Inclusión

Se incluyeron todos los cultivos positivos para levaduras del género *Candida* que presentaron crecimiento en medio cromogénico Blomerieux chromID *Candida*, provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de vulvovaginitis mayores de 16 años que contaban con expediente clínico completo de modo que pudiese obtenerse la información epidemiológica general y la relacionada con los

factores de riesgo como antecedentes ginecoobstétricos (método anticonceptivo, número de parejas sexuales, etc.) y enfermedades previas.

8.6. Criterios de eliminación

Se eliminarán los cultivos pertenecientes a pacientes con expedientes incompletos que no permitan obtener la información sociodemográfica necesaria o aquellas que presenten muestras contaminadas por otros microorganismos de las cuales no se puedan recuperar las levaduras.

8.7. Criterios de exclusión

Se excluirán las pacientes con tratamiento inmunosupresor (tratamientos antifúngicos, quimioterapia, antibioticoterapia prolongada, alquilantes, antiretrovirales, metotrexato, etc.)

8.8. Variables

8.8.1 Variable independiente: especie de levadura.

8.8.2 Variable dependiente: patrón de resistencia antifúngica.

8.8.3 Variables universales: género, edad, raza.

8.9. Definición conceptual de las variables

8.9.1. Especies identificados por método cromogénico

Se utilizó el medio Biomerieux chrMID que permite la distinción entre *Candida albicans* y *Candida no albicans*, donde las colonias de *C. albicans* se observan en color azul y las de *Candida spp* en blanco.

8.9.2. Definidas por secuencias de nucleótidos de las regiones ITS (genotipo):

Para la identificación molecular de organismos patógenos se han usado diferentes secuencias como blanco, entre ellas, genes de ADN mitocondrial y genes que codifiquen para ARN ribosómico. Los genes de ARNr 18s, 5.8s y 28s, son en esencia idénticos en longitud y secuencia en todas las especies. Sin embargo, la longitud de la región ITS (*internal transcribed spacer*, o espaciador interno del transcripto) depende de la especie. La región ITS se localiza entre los genes de ARNr 18s y 28s, y está dividida en la región ITS1 entre los genes 18s y 5.8s; y la región ITS2, entre los genes ARNr 5.8s y 28s. Por esta razón, son secuencias que se utilizan como marcadores moleculares para la identificación de géneros y especies de hongos.¹⁷

8.9.3. Especies Definidas por método/ equipo Vitek

El sistema Vitek 2 es un equipo que identifica y establece el patrón de sensibilidad de diversos microorganismos. La tarjeta YST del sistema Vitek, permite identificar levaduras de importancia clínica y

organismos relacionados a través de 47 pruebas bioquímicas fluorescentes, las cuales incluyen asimilación de carbohidratos y ácidos orgánicos y detección de oxidasas y arilamidases. Diversos estudios han demostrado que mediante este sistema se puede identificar correctamente más del 93% de las cepas analizadas en aproximadamente 18 horas.¹⁸ Este método se utilizó como verificación, solo en las levaduras que se identificaron por PCR y secuenciación.

8.9.4. Susceptibilidad y resistencia antifúngica

In vitro la susceptibilidad a un antifúngico en particular se define como la falta de crecimiento del microorganismo infectante a una concentración específica. Para los fines de este estudio, el patógeno es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano establecida de acuerdo al método Fungi test de Bio-Rad, éste considera para cada fármaco una concentración alta y otra baja, si el microorganismo crece a baja concentración pero no en la alta del antifúngico se considera medianamente resistente, mientras que si crece en ambos pozos se considera francamente resistente. A continuación se comentan cada uno de los antifúngicos presentes en el fungitest (Figura 4) así como las concentraciones que utiliza:

- **Anfotericina B (AB)** es un antifúngico de uso parenteral y oral obtenido por fermentación del *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto del suelo. La anfotericina B está químicamente emparentada con la nistatina, siendo un antibiótico poliénico. La denominación de este antibiótico se debe a sus propiedades anfóteras, debidas a la presencia un grupo ácido y de un grupo amino, lo que permite que el producto sea relativamente soluble en agua.¹⁹ Se considera que una levadura es resistente a la anfotericina en el test de susceptibilidad fungitest de Bio-Rad cuando presenta cambio a rosado con concentraciones de 2 y 8ug/ml.

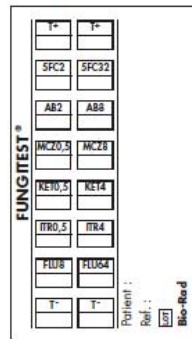
- **Miconazol** es un antifúngico imidazólico. Inicialmente desarrollado para sustituir a la anfotericina B como un agente antifúngico parenteral. pronto se descubrió, que no sólo no ofrecía la misma eficacia que la anfotericina B, pero también poseía toxicidades intrínsecas después de la administración IV. Sin embargo el miconazol se utiliza por vía tópica y por vía vaginal para las infecciones por hongos. Miconazol proporciona un alivio de los síntomas de la candidiasis vaginal, infecciones de tiña o candidiasis cutánea en unos 2-3 días. La resolución completa de estas condiciones por lo general ocurre dentro de 1-4 semanas de tratamiento con miconazol.¹⁹ Encontrando resistencia a la misma en el test de susceptibilidad Bio-Rad cuando presenta cambio a rosado con concentraciones de 0.5 y 8ug/ml.

- **Ketoconazol** fármaco antifúngico de la familia de los imidazoles, activo por vía oral. Dentro del grupo de los imidazoles, entre los que se encuentran el clotrimazol, fluconazol, itraconazol e imidazol, el ketoconazol tiene la propiedad de inhibir la síntesis de los corticoides adrenales, si bien en dosis superiores a las que tienen actividad antifúngica.¹⁹ Encontrando resistencia a la misma en el test de susceptibilidad Bio-Rad cuando presenta cambio a rosado con concentraciones de 0.5 y 4 ug/ml.
- **Itraconazol** antifúngico triazólico sintético, químicamente emparentado con el ketoconazol pero con menos efectos adversos. El itraconazol es activo frente a los mismos hongos que el ketoconazol y fluconazol, pero es más activo que estos frente a los *Aspergillus spp.* En general, se utiliza por vía oral, pero también existe una formulación parenteral que se utiliza en el tratamiento de las dermatitis, onicomycosis y aspergilosis que no responden a la anfotericina B.¹² Encontrando resistencia a la misma en el test de susceptibilidad Bio-Rad cuando presenta cambio a rosado con concentraciones de 0.5 y 4ug/ml.
- **Fluconazol** antifúngico sintético de la familia de los imidazoles, que se puede administrar por vía oral e intravenosa. Su espectro de actividad es mayor que el de otros antifúngicos imidazólicos incluyendo el miconazol, el ketoconazol o el clotrimazol. Además, el fluconazol es más resistente al metabolismo hepático de primer paso, es menos lipofílico y se une menos a las proteínas del plasma, por lo

que tiene una mayor biodisponibilidad.¹⁹ Encontrando resistencia a la misma en el test de susceptibilidad Bio-Rad cuando presenta cambio a rosado con concentraciones de 6 y 64 ug/ml.

- **5 fluorocitosina** antifúngico activo por vía oral, con una estructura de pirimidina fluorada, parecida a la fluoruracilo; la flucitosina penetra en las células de los hongos donde es desaminada a fluoruracilo mediante una enzima denominada citosina desaminasa. Las células de los mamíferos son incapaces de producir esta conversión. El fluoruracilo compite con el uracilo interfiriendo con la síntesis de los nucleótidos pirimidínicos e interrumpiendo la síntesis del ADN y de las proteínas. La flucitosina también puede ser convertido a ácido fluorodeoxiuridilico que inhibe la enzimas timidilato sintasa y que también interrumpe la síntesis del ADN.¹⁹ Encontrando resistencia a la misma en el test de susceptibilidad Bio-Rad cuando presenta cambio a rosado con concentraciones de 2 y 32 ug/ml.

Diagram of the microplate



- T+ ⇒ Positive control
- 5 FC ⇒ 5- fluorocytosine (2-32 µg/ml)
- AB ⇒ amphotericin B (2-8 µg/ml)
- MCZ ⇒ miconazole (0.5-8 µg/ml)
- KET ⇒ kéticoconazole (0.5-4 µg/ml)
- ITR ⇒ itraconazole (0.5-4 µg/ml)
- FLU ⇒ fluconazole (8-64 µg/ml)
- T- ⇒ Negative control

Figura 4. Esquema que representa la distribución de los antifúngicos en los pozos en la prueba de fungitest. (Tomado de la página oficial http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biorad%20diagnostics%20pasteur/pdf/60780.pdf)

8.10 Manejo de los aislamientos de *Candida spp.*

Dado que las levaduras del género *Candida* se clasifican como hongos patógenos oportunistas correspondientes a agente biológico del grupo 2, se siguieron las normas generales para laboratorios con nivel de contención 2, así como la NOM-010-STPS-1999.

8.11 Comprobación de las características fenotípicas

Para observar las características de la colonia fúngica todos los aislados se sembraron en agar Sabouraud (Bioxon) con 100mg/ml de cloranfenicol a 25°C durante 5 días. Se observaron las características macroscópicas (textura, color) y microscópicas de los cultivos en fase de levadura, para la observación microscópica se realizaron tinciones con azul de lactofenol, KOH al 10% y negro

de calcofluor. Un pool de las colonias obtenidas en cada plato se cultivó en medio cromogénico para *Candida* de Blomerieux chromID *Candida*, lo que nos permitió diferenciar todos los aislados en *Candida albicans* o *Candida no albicans*.

8.12 Aislamiento y purificación de DNA

Para la extracción de DNA de las muestras fúngicas se utilizó la técnica fenol/cloroformo/alcohol iso-amílico, la cual se estandarizó en el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos para *Sporothrix spp.*²⁰ El ADN extraído se preservará a -20°C hasta su uso posterior.

8.13 Diseño de Iniciadores

Se utilizaron el par de iniciadores universales específicos para hongos denominados ITS1 e ITS4, forward 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' y reverso 5'-TCC TCC GCT TAT GAT AT-3' respectivamente, éstos oligonucleótidos fueron verificados en el GenBank utilizando la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), la cuál permite la comparación de los oligos con secuencias de ADN genómico de *Candida spp.* y hongos cercanos filogenéticamente reportados en esa base de datos. Estos cebadores permiten la amplificación de la región que comprende las subunidades ribosomales 18S (secuencia parcial), 5.8S y 28S (secuencia parcial), así como de las regiones intergénicas ITS-I e ITS-II, poseen temperaturas de alineamiento 62°C y 61°C respectivamente. (Figura 2)

8.14 Amplificación por PCR

Se utilizó el equipo MaxyGene Thermal Cyclers modelo THERM-1000 (www.appliedbiosystems.com), para la amplificación de la región del 18S-ITS1.5.8S-ITS2, se utilizó 4 μ L de $MgCl_2$, con 0.125 U/ μ L de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI).

8.15 Secuenciación

Los productos amplificados del PCR se extrajeron directamente de los geles de agarosa al 1%, con QIAquick gel extraction kit (QIAGEN cat 28706) y se secuenciaron los fragmentos de DNA obtenidos, con un secuenciador automático ABI Prism 310 (www.appliedbiosystems.com).

8.16 Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas de *Candida spp.*, se procesaron usando el programa BioEdit v7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) para verificar que no existieran errores en el proceso de la secuenciación y para obtener las secuencias consenso, asimismo cada una de las secuencias fue analizada con la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar su identidad genética. Posteriormente, se realizó el alineamiento múltiple con el software Clustal W v2.0²¹ y se ejecutó ajuste manual usando el programa MEGA v5.^{22 23}

Para calcular el modelo de evolución se manejó el programa Model test v3.7,²⁴ el mejor modelo para ambos genes resultó ser Tamura-Nei considerando tasas gamma (TrNef+G). Para la reconstrucción filogenética se usaron inferencias bayesianas, el análisis se realizó con el software MrBayes v3.2.^{25 26} Los arboles con valores menores a la fase estacionaria (*burnin*) se descartaron del análisis, mientras que aquellos que alcanzaron la fase estacionaria se seleccionaron para la construcción del árbol consenso.²⁷

8.17 Genealogías

Para el análisis de redes haplotípicas se crearon redes de haplotipos “unrooted statistical parsimony” las cuales se generaron utilizando el software Network v5. Estas redes se anidaron de acuerdo a las reglas de “Median-Joining networks”, en las cuales el estatus interior se considera un clado/haplotipo y los haplotipos ancestrales tienen prioridad sobre los haplotipos perdidos.²⁸

8.18 Pruebas de susceptibilidad antifúngica

Se utilizó el sistema de determinación de susceptibilidad antifúngica fungi test – BIORAT número de cat. 60780 (Sanofi Diagnostics Pasteur), siguiendo las especificaciones del fabricante, el cual se describió previamente.

8.19 Análisis estadístico

Utilizamos el programa estadístico SPSS v.20.0 para Windows (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) Para el análisis descriptivo se aplicaron medidas de tendencia central y de dispersión, así como proporciones. Para el análisis de correlación utilizamos Rho de Spearman y correlación de Pearson de acuerdo al tipo de variable. Consideraremos significancia estadística con $p < 0.05$ y para el objetivo secundario IC.

9. RESULTADOS

9.1 Aislamientos y variables epidemiológicas

En el estudio se incluyeron todos los aislamientos identificados en el laboratorio clínico como *Candida spp.* que se hubieran tomado de secreciones vaginales de abril 2015, hasta septiembre 2015. Una vez identificados los aislamientos se buscaron los expedientes correspondientes a las pacientes de las cuales se obtuvieron las muestras, se verificó que la muestra se solicitó por presentar datos clínicos de vulvovaginitis y se tomaron del expediente los datos de identificación, con objeto de llenar la hoja de captura de datos. Los cultivos se transportaron para su caracterización molecular (identificación por PCR), al departamento de Ecología de Agentes Patógenos. Durante el periodo señalado se recolectaron del laboratorio clínico de microbiología 88 exudados vaginales

positivos a diferentes especies de *Candida*, (Figura 5) los cuales corresponden a 79 pacientes.

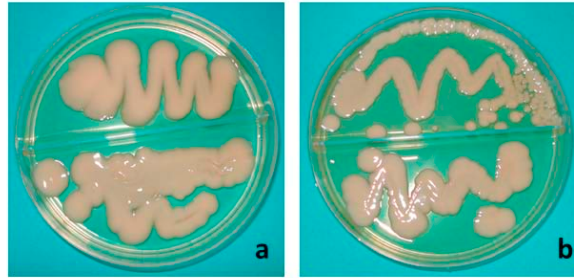


Figura 5. Cultivos en agar Sabouraud correspondientes de acuerdo a la identificación molecular a: a. *Candida albicans* b. *C. glabrata*, indistinguibles en este medio.

De las 88 muestras, 19 no contaron con las condiciones necesarias para crecimiento y estudio de ADN, por lo cual se analizaron 69 exudados, que pertenecen a 61 pacientes, presentando 55 pacientes con un exudado positivo y 7 pacientes contaba con al menos 2 exudados vaginales positivos para levaduras; de estas 4 pacientes presentaron dos (n=2) muestras positivas, una paciente tenía tres (n=3) y solo una paciente contaba con cuatro (n=4) muestras positivas a *Candida spp.* Llama la atención que utilizando los medios cromogénicos se reporta más frecuentemente *Candida spp.*; utilizando la identificación molecular y por vitek en los episodios múltiples, *C. glabrata* es el tipo de *Candida* más frecuente dentro de este grupo, la cual presentó resistencia a antifúngicos que se comenta más adelante.

TIPO DE CANDIDA ENCONTRADA EN EXHUDADOS VAGINALES UTILIZANDO METODO CROMOGENICO BIOMERIEUX CANDIDA

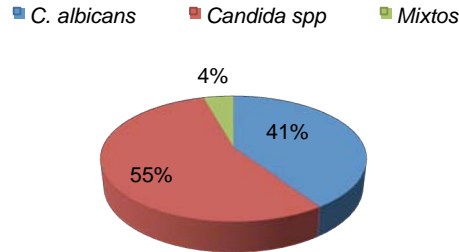


Figura 6. Tipo de *Candida* encontrada en exudados vaginales identificadas con método cromogénico.

Las pacientes estudiadas presentaron una edad promedio de 32 más menos dos años, con una mediana de edad de 35 años. En cuanto al estado civil, 31 refirieron estar casadas representando el 45% de la muestra, 18 reportaron estar solteras (26%), en unión libre 17 mujeres (25%), divorciadas dos (3%), viudas una (1%). En relación al número de parejas sexuales con una pareja sexual 32 (46%), dos 19 (28%), tres 13 (19%), cuatro 2 (3%), cero 2 (3%), siete 1 (1%). En cuanto al método anticonceptivos utilizado en las pacientes que presentaron *Candida spp.*, encontramos 22 (32%) pacientes con oclusión tubaria bilateral (OTB), nueve (23%) utilizaban método anticonceptivo hormonal, seis (9%) preferían el uso de preservativos, cinco (7%) tenía colocado un dispositivo intrauterino (DIU), mientras que cinco (7%) se había realizado una histerectomía total abdominal (HTA), por último 22 (32%) no usaban ningún método anticonceptivo; observándose con menos frecuencia en las pacientes que utilizan métodos de barrera al comparar con otros métodos (Tabla 1).

Tabla 1. Variables principales del estudio.

| Variable | n=61 | Porcentaje (%) |
|--------------------------------------------------------------|-------------|----------------|
| Edad, años | 32.2 ± 14.9 | |
| Estado civil | | |
| - Casada | 31 | 45 |
| - Soltera | 18 | 26 |
| - Unión libre | 17 | 25 |
| - Divorciada | 2 | 3 |
| - Viuda | 1 | 1 |
| Parejas sexuales | | |
| - 1 | 32 | 46 |
| - 2 | 19 | 28 |
| - 3 | 13 | 19 |
| - 4 | 2 | 3 |
| - 0 | 2 | 3 |
| - 7 | 1 | 1 |
| Método anticonceptivo | | |
| - Ninguno | 22 | 32 |
| - OTB | 22 | 32 |
| - Hormonales | 9 | 23 |
| - Preservativos | 6 | 9 |
| - DIU | 5 | 7 |
| - HTA | 5 | 7 |
| Candida reportada por cultivo en medio de Blomerieux chromID | | |
| - <i>C. albicans</i> | 28 | 41 |
| - <i>C. ssp</i> | 38 | 55 |
| - Mixtos | 3 | 4 |
| Presencia de agente agregado | 25 | 31 |
| - VPH | 4 | 5 |
| - <i>Klebsiella spp.</i> | 2 | 2 |
| - <i>Escherichia coli</i> | 2 | 2 |
| - <i>Ureoplasma spp.</i> | 16 | 20 |
| - <i>Gardenella spp.</i> | 4 | 5 |
| - Molusco | 2 | 2 |
| - <i>Enterococo fecalis</i> | 1 | 1 |
| - <i>Streptococcus agalactie</i> | 1 | 1 |
| Condiciones agregadas | | |
| - Embarazo | 24 | 36 |
| - DM2 | 18 | 27 |
| - Miomatosis uterina | 3 | 4 |
| - LIEBG (Lesión intra epitelial de bajo grado) | 3 | 4 |
| - Patología cervical | 4 | 6 |
| - Sangrado uterino anormal | 4 | 6 |

Aplicamos t de student para muestras independientes para analizar la edad y el número de parejas sexuales con los episodios únicos y los de repetición encontrando una media de edad de 34 años en los episodios únicos y de 42 en los episodios de repetición, así como una media de 1 pareja sexual en episodios únicos y de repetición. Al realizar una prueba de varianza unidireccional obtenemos una significancia de la razón F con un valor de P de 0.809 en la edad y de 0.002 en el número de parejas sexuales, lo que indica asociación con significancia estadística entre el número de parejas sexuales y los episodios de repetición. Al calcular la desviación típica de las muestras encontramos que la edad presenta valores dispersos de acuerdo a la media y el número de parejas sexuales se encuentra próximo a la misma (Tabla 2).

Tabla 2. Prueba de muestras independientes. T de student y varianza unidireccional.

| VARIABLES | Número de episodios | Media | Sig. F | GL | Desviación típica |
|-------------------------|----------------------------|--------------|---------------|-----------|--------------------------|
| Edad | Único | 34 | 0.809 | 67 | 11.5 |
| | Múltiple | 42 | | 7.8 | 10.10 |
| Parejas sexuales | Único | 1.44 | 0.002 | 67 | 0.643 |
| | Múltiple | 1.14 | | 10.4 | 0.378 |

Sig. F = Significancia de razón F, GL = grados de libertad de razón F.

Encontramos que el número de parejas sexuales se asocia con los episodios de repetición con una $p= 0.002$. Lo que coincide con la literatura ya que

se reporta asociación con la promiscuidad y en especial con algunas prácticas sexuales como el sexo oral y anal.²⁹

Se aplica prueba de chi cuadrada de Pearson al método de planificación familiar, estado civil, condición asociada al episodio de *Candida* y tipo de *Candida* aislada comparando cada una de ellas con episodios únicos y episodios múltiples, encontrando significancia en todos los grupos de variables, por lo cual se realizó conteo de cada una de ellas comparándolas con episodios únicos o múltiples, para encontrar la asociación significativa.

En cuanto a los métodos de planificación familiar encontramos que tanto los episodios únicos como los múltiples se presentan con mayor frecuencia en pacientes con oclusión tubaria bilateral (OTB) y pacientes que no cuentan con método de planificación familiar (Figura 7 y tabla 3).

□

MÉTODO DE PLANIFICACIÓN FAMILIAR

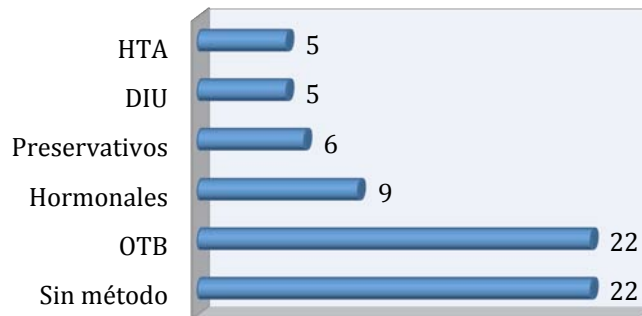


Figura 7. Tipo de método de planificación familiar encontrado en pacientes con exudados vaginales identificadas con método cromogénico positivos a especies de *Candida*; (OTB= Oclusión Tubaria bilateral; HTA= histerectomía total abdominal; DIU dispositivo intrauterino)

Tabla 3. Método de planificación familiar, número de pacientes con episodios de vulvovaginitis único vs múltiple.

| Método de planificación familiar | Tipo de episodio | |
|----------------------------------|------------------|----------|
| | Único | Múltiple |
| OTB | 20 | 2 |
| Sin método | 20 | 2 |
| Hormonales | 8 | 1 |
| Preservativo | 5 | 1 |
| DIU | 4 | 1 |
| HTA | 5 | 0 |

OTB= Oclusión tubaria bilateral; DIU = dispositivo intrauterino; HTA = histerectomía total abdominal

En cuanto al estado civil los episodios únicos se presenta más en pacientes casadas, en las pacientes con unión libre se presentan con más frecuencia los cuadros de repetición (Tabla 4).

Tabla 4. Estado civil, conteo por episodios

| Estado civil | Tipo de episodio | |
|--------------|------------------|----------|
| | Único | Múltiple |
| Casada | 30 | 1 |
| Soltera | 16 | 1 |
| Unión libre | 14 | 4 |
| Divorciada | 2 | 0 |
| Viuda | 0 | 1 |

Los episodios únicos se presentan comúnmente en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, los episodios de repetición se presentaron más comúnmente en embarazadas. Lo cual se relaciona con lo ya comentado en la literatura ya que las infecciones vulvovaginales por microorganismos del género *Candida* cuentan con factores desencadenantes o coadyuvantes como diabetes mellitus mal controlada,³⁰ dietas ricas en azúcares;³¹ así como también se reportó la relación con estados hiperestrogénicos como el embarazo, sobre todo a partir del tercer trimestre,³² y la toma de ACO con altas dosis de estrógenos (Tabla 7).³³

Tabla 5. Condición asociada, conteo por episodios

| Condición asociada | Tipo de episodio | |
|------------------------|------------------|----------|
| | Único | Múltiple |
| Embarazo | 22 | 2 |
| DM2 | 15 | 3 |
| Pat. Cervical | 4 | 0 |
| SUA | 3 | 1 |
| Pat. Mamaria | 2 | 0 |
| Sin condición agregada | 9 | 1 |

DM2 = diabetes mellitus 2; Pat. Cervical = patología cervical; SUA = sangrado uterino anormal; Pat. Mamaria = Patología mamaria

□

CONDICION AGREGADA

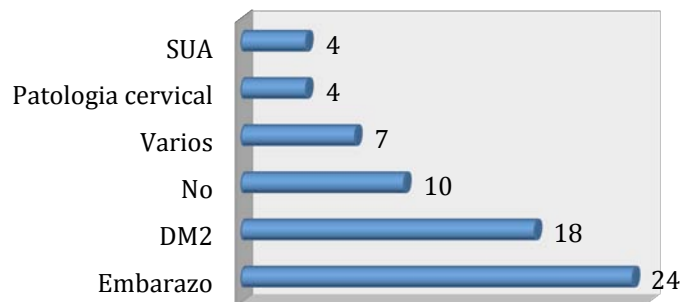


Figura 8. Gráfica de la condición asociada en pacientes con exudado vaginal positivo a especies del género *Candida*

Tabla 6. Tipo de *Candida* asociada, identificada con medio cromogénico de Blomerieux chromID; conteo por episodios.

| Tipo de <i>Candida</i> asociada | Tipo de episodio | |
|---------------------------------|------------------|----------|
| | Único | Múltiple |
| <i>C. albicans</i> | 28 | 0 |
| <i>C. no albicans</i> | 34 | 7 |

De las 7 pacientes que presentan vulvo-vaginitis de repetición 15 cultivos con medio cromogénico reportaron *Candida spp.* y dos se reportaron como *Candida glabrata* (en estos casos se usó Chomoagar), de todos los cultivos obtenidos en los cuadros de repetición se realiza examen molecular, encontrándose en catorce (14) casos los *Candida glabrata* y uno *C. krusei*. Tabla 7

En cuanto a agentes agregados en los cultivos vaginales se presentaron 45 (65%) sin agentes agregados y 24 (34%) con los siguientes microorganismos, siendo el más prevalente *Ureaplasma* en 20%(n=16), seguido por *Gardenella vaginalis* y *VPH* en 5% (n=4), así como otros encontrados con menor frecuencia: *Escherichia Coli*, *Molusco contagioso*, *Klebsiella spp*, *Enterococcus Fecalis*, *Streptococcus Agalactie*. El tipo de *Candida* reportado en los 69 cultivos *C. albicans* en 29 (42%), *Candida spp.* 39 (57%) y *C. glabrata* 1(1%). La literatura reporta que es frecuente la asociación de vulvovaginitis candidiásicas de repetición y otras infecciones entre las que se reportan tricomonas, vaginosis principalmente.³⁴

Tabla 7. Asociación entre el tipo de *Candida* reportada por cultivo y su evaluación molecular final.

| NUMERO DE CASO ASIGNADO | EPISODIOS DE REPETICIÓN | TIPO DE CANDIDA REPORTADA POR METODO CROMOGENIC | REPORTE MOLECULAR |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 4 | <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> |
| 2 | 2 | <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> | <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> |
| 3 | 2 | <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> | <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> |
| 4 | 2 | <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> | <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> |
| 5 | 2 | <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> | <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> |
| 6 | 3 | <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> <i>Candida spp.</i> | <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida glabrata</i> más co-infección por <i>C. albicans</i> |
| 7 | 2 | <i>Candida spp.</i> <i>C. albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> más co-infección por <i>C. albicans</i> |

□

AGENTE AGREGADO A LA INFECCIÓN

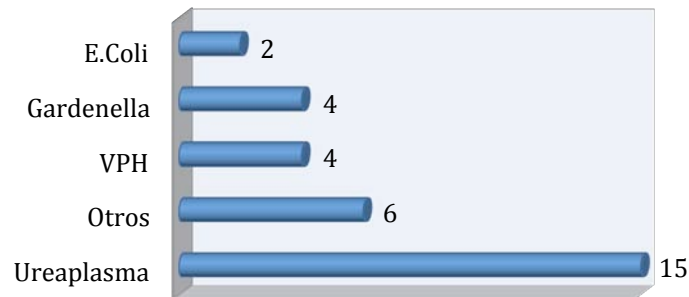


Figura 9. Grafica de agentes vaginales agregados a la infección por *Canida*

9.2 Análisis filogenético y genealogías

Para el análisis filogenético se incluyeron 24 aislamientos y 17 secuencias de referencia obtenidas del GenBank Database (Figura 6), los aislados provenían de 14 pacientes, dado que 17 muestras (tabla 9) provienen de 7 pacientes quienes presentaron vulvovaginitis de repetición. En el episodio 2 del caso 7 el cultivo obtenido presentó crecimiento de dos colonias diferentes en el medio cromogénico (se observaron tanto colonias blancas como azules), estas se resembraron y procesaron de forma independiente (cultivo 7 y 7b), con el análisis molecular se confirmó la presencia de dos especies de *Candida*, *C. albicans* y *C. glabrata* por tanto la paciente en cuestión presentó co-infección. En total se identificaron con la región ITS diez (41.66%) aislamientos correspondientes a *C. albicans*, doce (50%) se identificaron como *C. glabrata*, uno como *C. utilis* (4.16%) y otro como *C. krusei* (4.16%), en general los aislados de *C. albicans* y *C. utilis* provenían de pacientes con único episodio de vulvovaginitis (salvo el aislado en coinfección con *C. glabrata*), mientras que los aislados reportados como *C. glabrata* y *C. krusei* se obtuvieron de pacientes con vulvovaginitis de repetición (Figura 10 Y 11).

□

IDENTIFICACION MOLECULAR

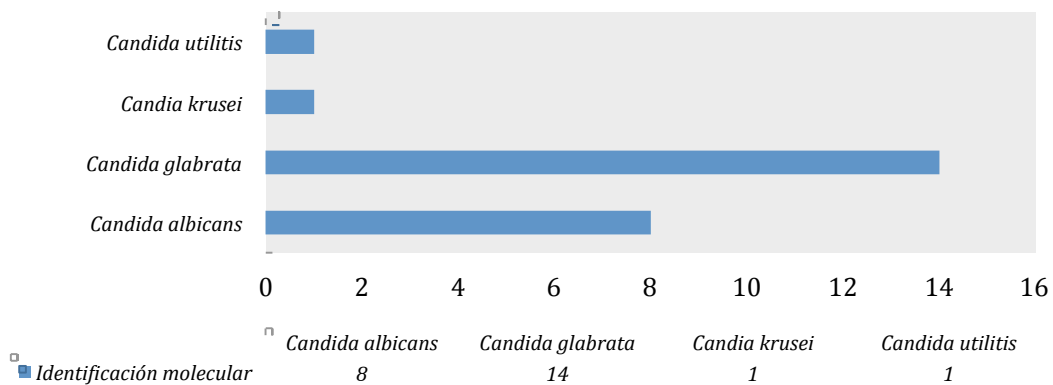


Figura 10. Grafica de reporte molecular de especies de *Canida*

Dra. Hilda Sánchez Hernández

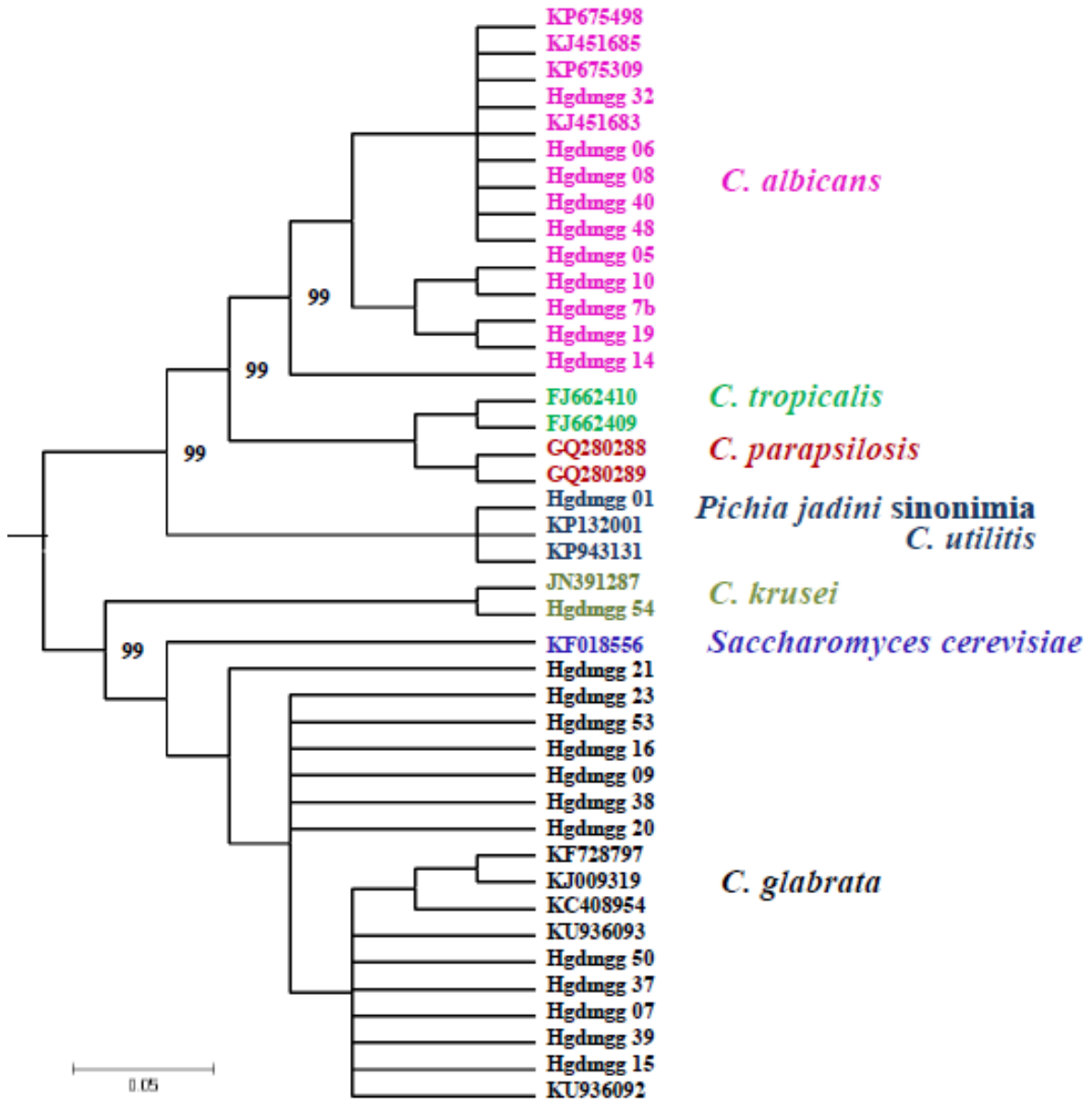


Figura 11. Árbol filogenético realizado con la región que comprende los genes ribosomales (18S secuencia parcial, 5.8S y 28S secuencia parcial) y las regiones intergénicas ITS1 y ITS2. Las secuencias señaladas como Hgdmgg representan los aislamientos obtenidos en el hospital, las secuencias de referencia esta señaladas por su número de ascenso al GenBank Data Base.

Por otra parte en el árbol de redes haplotípicas realizado para *C. albicans*, que incluyo más de 100 secuencias de referencias, reveló un único haplotipo que agrupa la mayoría de las secuencias de referencia, así como los aislados mexicanos mientras que se observan escasas secuencias en la periferia de este centro de dispersión, lo que refleja mínima (casi nula) variabilidad genética al menos para esta región. En árbol de redes para *C. glabrata* igualmente se observa poca variabilidad y se evidencia como los aislados presentes en humanos no se diferencian de los obtenidos de otras fuentes animales, vegetales o del medio ambiente (Figura 12). La escasa variabilidad en ambas especies probablemente está relacionada con la reproducción asexual (por división binaria).

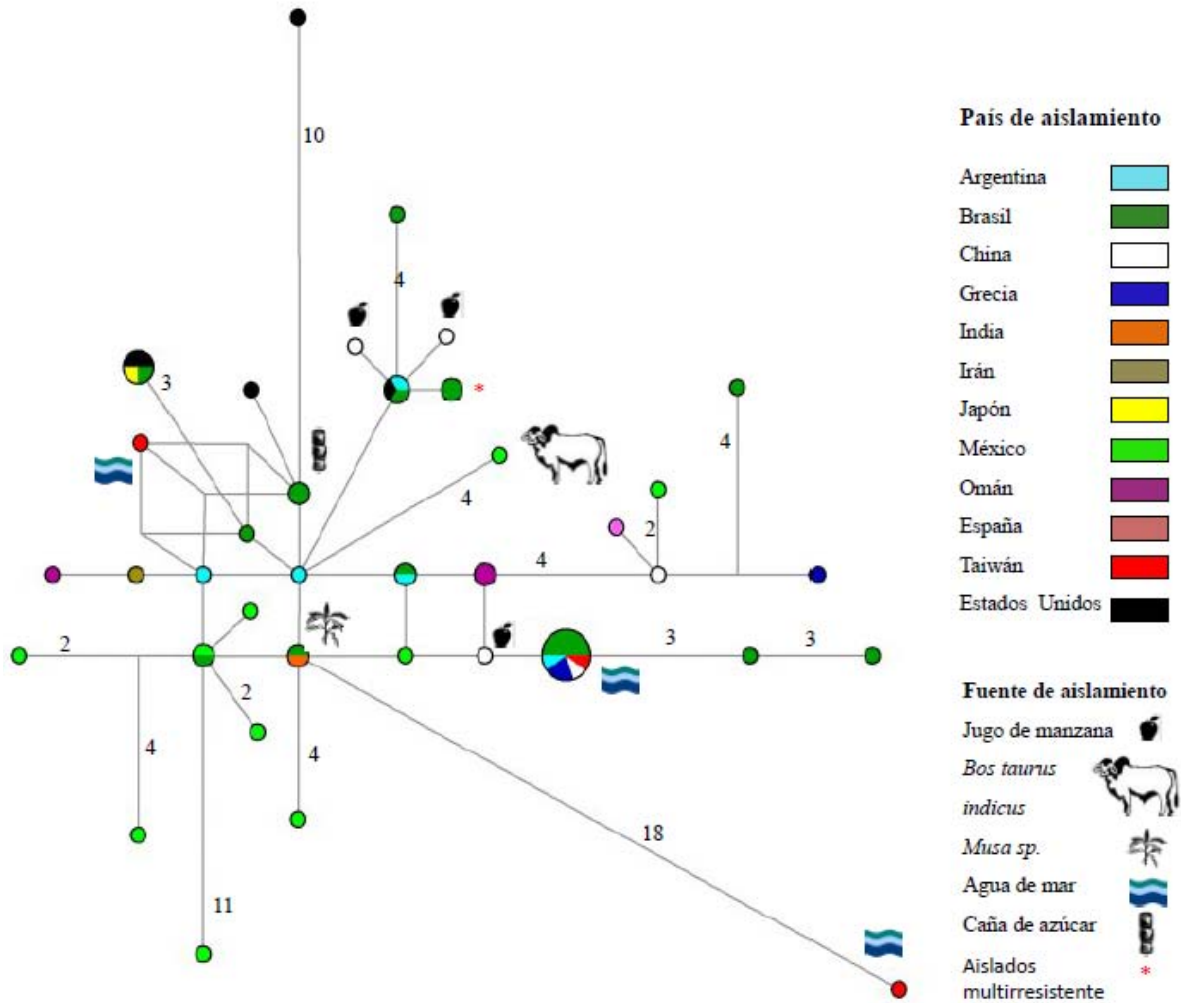


Figura 12. Árbol de redes haplotípicas realizado con los aislados mexicanos de *C. glabrata* y secuencias de referencia obtenidas del GenBank Data Base. Los colores representan el país de origen, las figura representan la fuente de aislamientos en los casos que se reportaron. En relación a los aislamientos mexicanos todos provienen de humanos (pacientes con vulvovaginitis).

Por último en los aislamientos identificados por métodos moleculares se realizó determinación de susceptibilidad antifúngica por el método comercial colorimétrico, Fungitest (Tabla 2). En general los aislados de *C. albicans* muestra

buena respuesta a los antifúngicos, solo 2 aislados se reportaron resistente a bajas concentración de Itraconazol, mientras que 2 aislados de *C. glabrata*, así como uno de *C. utilis* y otro de *C. krusei* mostraron resistencia con concentraciones de miconazol e itraconazol de 0.5 ug/ml. *C. utilis* y una muestra de *C. glabrata* mostraron resistencia a miconazol a 5 ug/ml; mientras que *C. krusei* presentó resistencia a las dosis bajas de itraconazol, miconazol y fluconazol. Otros aislados de *C. glabrata* presentaron patrones de resistencia combinados que incluían en dos casos resistencia al ketoconazol y en un único caso resistencia a la anfotericina a dosis bajas (tabla 8).

Si relacionamos esta información con los datos moleculares, la evidencia sugiere la preferencia de plásmidos de resistencia a antifímicos.

Tabla 8. Aislamientos susceptibilidad antifúngica.

| Identificación de especie | | Antifúngicos estudiados, cantidades señaladas expresan concentración en ug/ml | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|---------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----|
| Cultivo | Molecular | 5FC 2 | 5FC 32 | AB 2 | AB 8 | MCZ .5 | MCZ 8 | KET .5 | KET 4 | ITR .5 | ITR 4 | FLU 8 | FLU 64 | Rep |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. utilis</i> | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. albicans</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>C. albicans</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. kruseii</i> | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S | R | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | R | S | S | S | R | S | R | S | S | S | Si |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | R | S | R | S | R | S | S | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | Si |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | Si |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | No |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | Si |
| <i>Candida spp.</i> | <i>C. glabrata</i> | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | No |

5FC: 5-fluorocitocina; AB: anfotericina B; MCZ: miconazol; KET: ketoconazol; ITR: itraconazol; FLU: fluconazol; REP: Repetición

DISCUSION

La diferenciación entre *C. albicans* y las *Candida no albicans*, no es posible utilizando simplemente las características macro y microscópicas de los cultivos, sino que requiere de pruebas bioquímicas o de medios especiales que permitan identificar características especiales como el dimorfismo o la formación de blastoesporas. Para facilitar su rápida identificación en los laboratorios clínicos, se diseñaron métodos especiales como el medio CHROMagar, mencionado previamente. Sin embargo estos métodos no identifican todas las especies de *Candida no albicans*, por lo cual es importante considerar métodos altamente sensibles y específicos como la identificación molecular.

El pH vaginal es casi siempre normal en las vaginitis por *Candida* y un pH elevado sugiere un diagnóstico alternativo con vaginitis mixtas. La destrucción del balance microecológico puede causar inmunosupresión local y disbacteriosis vaginal lo que contribuye a presentar episodios de vaginitis de repetición o a coinfecciones con otros microorganismos, igualmente algunas drogas antifúngicas causan la destrucción de la flora vaginal normal, el daño secundario es difícil de diagnosticar a corto plazo, por lo que al aplicar drogas antifúngicas debemos agregar probióticos en episodios de vaginitis por *Candida* de repetición.

Las infecciones por *Candida albicans* son comúnmente tratadas con drogas antifúngicas, las cuales inhiben la biosíntesis de ergosterol. *C. albicans* puede desarrollar resistencia a las drogas antifúngicas (azoles) por varios mecanismos, incluyendo:

- Las mutaciones enzimáticas codificadas por ERG11
- La sobre expresión de ERG11
- La sobre expresión del flujo que codifica las multidrogas,

Todas estas son causas frecuentes de resistencia clínica a *C. albicans* ³⁵.

CONCLUSIONES

La infección por *Candida* es una enfermedad frecuente del aparato genital inferior de mujeres. Entre las especies de *Candida*, *C. albicans* es la causa más frecuente de infecciones del aparato genital, pero las infecciones por especies distintas de *C. albicans* están aumentando. Estos resultados se han explicado por la resistencia a los tratamientos antimicóticos comunes con azoles o al uso de fármacos no eficaces frente a las especies distintas de *C. albicans*, por lo cual se recomienda realizar estudios de extensión en pacientes que presentan vaginitis de repetición ya que puede tratarse de especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* resistentes a los tratamientos comunes, que pueden ser la causa de las vaginitis

de repetición en pacientes con los factores de riesgo ya mencionados previamente.³⁶

Tabla suplementaria: datos de las secuencias tomadas del GenBank data base, que se utilizaron en el análisis filogenético y en los análisis de genética de poblaciones.

| Numero de ascenso al GenBank | especie | País de origen | Aislado de | Número de referencia original del aislado | Referencia. |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|-------------|
| AB467296 | <i>C. glabrata</i> | Taiwan | Alga marina | NT1109 | 24 |
| AB467297 | <i>C. glabrata</i> | Taiwan | Alga marina | NT0506 | 24 |
| AB469380 | <i>C. glabrata</i> | Taiwan | Alga marina | NT0508 | 24 |
| AB861483 | <i>C. glabrata</i> | Brazil | Homo sapiens | Cg367 | 24 |
| DQ242637 | <i>C. glabrata</i> | Spain | homo sapiens | cg1 | 37 |
| EF190223 | <i>C. tropicalis</i> | China | Alga marina | WC65-1 | 38 |
| EF194844 | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | China | Alga marina | WC91-2 | 39 |
| EU568909 | <i>Cyberlindnera jadinii</i> | France | homo sapiens | CBS 621 | 40 |
| EU568927 | <i>Cyberlindnera jadinii</i> | France | Homo sapiens | CNRMA 200500811 | 31 |
| FJ619278 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA003 | 41 |
| FJ662389 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA032 | 32 |
| FJ662390 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA049 | 32 |
| FJ662391 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA005 | 32 |
| FJ662392 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA054 | 32 |
| FJ662393 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA004 | 32 |
| FJ662394 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA022 | 32 |
| FJ662395 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA048 | 32 |
| FJ662396 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA047 | 32 |
| FJ662397 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA013 | 32 |
| FJ662398 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA006 | 32 |
| FJ662401 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA026 | 32 |
| FJ662402 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA040 | 32 |
| FJ662403 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA025 | 32 |
| FJ662404 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA011 | 32 |
| FJ662405 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA010 | 32 |
| FJ662406 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA046 | 32 |

Dra. Hilda Sánchez Hernández

| | | | | | |
|----------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|----|
| FJ662407 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA008 | 32 |
| FJ662408 | <i>Pichia guilliermondii</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA043 | 32 |
| FJ662409 | <i>C. tropicalis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA029 | 32 |
| FJ662410 | <i>C. tropicalis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA038 | 32 |
| FJ662411 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA007 | 32 |
| FJ662412 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA012 | 32 |
| FJ662413 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA031 | 32 |
| FJ662414 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA033 | 32 |
| FJ662415 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA036 | 32 |
| FJ662416 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA039 | 32 |
| FJ662417 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA044 | 32 |
| FJ662418 | <i>Candida ethanolica</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA037 | 32 |
| FJ697166 | <i>C. tropicalis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA001 | 32 |
| FJ697167 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA002 | 32 |
| FJ697169 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA041 | 32 |
| FJ697170 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA015" | 32 |
| FJ697171 | <i>Pichia kudriavzevii</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA020 | 32 |
| FJ697172 | <i>C. glabrata</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZB066 | 32 |
| FJ865435 | <i>Cyberlindnera jadinii</i> (<i>Pichia jadinii</i>) | Argentina | Aguas contaminadas con tinte textil | M9 | 42 |
| FN428886 | <i>C. glabrata</i> | Brazil. Rio de Janeiro, Seropedica | Hojas de caña de azucar | IMUFRJ 51973 | 43 |
| GQ280287 | <i>Pichia guilliermondii</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA016 | 32 |
| GQ280288 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA017 | 32 |
| GQ280289 | <i>C. parapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA018 | 32 |
| GQ280290 | <i>Candida metapsilosis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA019 | 32 |
| GQ376081 | <i>C. glabrata</i> | Greece | Secreciones bronquiales | UOA/HCPF 10207A | 44 |
| GQ376082 | <i>C. glabrata</i> | Greece | Especimen orofaríngeo | UOA/HCPF 0507 | 33 |
| HM461654 | <i>Cyberlindnera suaveolens</i> | Taiwan | Materiales organicos | BCRC 22227 | 33 |
| HQ014728 | <i>C. glabrata</i> | Oman, Muscat | Homo sapiens | WM10.109 | 33 |
| HQ014730 | <i>C. glabrata</i> | Oman, Muscat | Homo sapiens | WM10.111 | 33 |

| | | | | | |
|----------|------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------|----------------|----|
| HQ014735 | <i>C. glabrata</i> | Oman, Muscat | Homo sapiens | WM10.115 | 33 |
| JN093145 | <i>C. glabrata</i> | Dargakona, India | Musa sp. cultivar Sapri colla | AUS-LFB-MA-YC4 | 45 |
| JN391273 | <i>C. dubliniensis</i> | Beijing, China | Sangre periférica, Homo sapiens | PUMY001 | 46 |
| JN391274 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Frotis vaginal, Homo sapiens | PUMY002 | 35 |
| JN391275 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Frotis vaginal, Homo sapiens | PUMY003 | 35 |
| JN391276 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Sangre de cateter venoso central, Homo sapiens | PUMY004 | 35 |
| JN391277 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Sangre periférica, Homo sapiens | PUMY005 | 35 |
| JN381278 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Sangre periférica, Homo sapiens | PUMY006 | 35 |
| JN381279 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Chorro medio de orina limpia, Homo sapiens | PUMY007 | 35 |
| JN391280 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Fluidos de drenaje abdominal, Homo sapiens | PUMY008 | 35 |
| JN391281 | <i>C. glabrata</i> | Beijing, China | Secrecines, Homo sapiens | PUMY009 | 35 |
| JN391282 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | Beijing, China | Sangre periférica, Homo sapiens | PUMY012 | 35 |
| JN391283 | <i>Candida intermedia</i> | Beijing, China | Chorro medio de orina limpia, Homo sapiens | PUMY013 | 35 |
| JN391284 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Beijing, China | Secrecion nasal, Homo sapiens | PUMY014 | 35 |
| JN391285 | <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>) | Beijing, China | Pus abdominal, Homo sapiens | PUMY015 | 35 |
| JN391286 | <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>) | Beijing, China | Chorro medio de orina limpia, Homo sapiens | PUMY016 | 35 |
| JN391287 | <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>) | Beijing, China | Sangre periférica, Homo sapiens | PUMY017 | 35 |
| JN391288 | <i>Candida metapsilosis</i> | Beijing, China | Tejido de piel, Homo sapiens | PUMY018 | 35 |
| JN391289 | <i>Candida nivariensis</i> | Beijing, China | Frotis vaginal, Homo sapiens | PUMY019 | 35 |
| JN391290 | <i>Candida orthopsilosis</i> | Beijing, China | Chorro medio de orina limpia, homo sapiens | PUMY022 | 35 |
| JN391291 | <i>C. parapsilosis</i> | Beijing, China | pus, Homo sapiens | PUMY024 | 35 |
| JN391292 | <i>C. parapsilosis</i> | Beijing, China | Sangre de cateter venoso central, Homo sapiens | PUMY025 | 35 |
| JN391293 | <i>C. parapsilosis</i> | Beijing, China | Sangre periférica, Homo sapiens | PUMY026 | 35 |
| JN391294 | <i>C. parapsilosis</i> | Beijing, China | Punta de cateter venoso central, Homo sapiens | PUMY027 | 35 |
| JN391295 | <i>C. parapsilosis</i> | Beijing, China | Chorro medio de orina limpia, Homo sapiens | PUMY028 | 35 |

Dra. Hilda Sánchez Hernández

| | | | | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------|--------|----|
| JN606246 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA003a | 30 |
| JN606247 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA004a | 30 |
| JN606248 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA008a | 30 |
| JN606249 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA010a | 30 |
| JN606250 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA011a | 30 |
| JN606251 | <i>Lodderomyces elongisporus</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | Za013a | 30 |
| JN606252 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | ZA014a | 30 |
| JN606253 | <i>C. tropicalis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA021 | 30 |
| JN606254 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA022a | 30 |
| JN606255 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA023a | 30 |
| JN606256 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA024a | 30 |
| JN606257 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA025a | 30 |
| JN606258 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA026a | 30 |
| JN606259 | <i>C. tropicalis</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA030 | 30 |
| JN606260 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA032a | 30 |
| JN606261 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA034 | 30 |
| JN606262 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA040a | 30 |
| JN606263 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA041a | 30 |
| JN606264 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>) | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA045 | 30 |
| JN606265 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA046a | 30 |
| JN606266 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA049a | 30 |
| JN606267 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA051 | 30 |
| JN606268 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA054a | 30 |
| JN606269 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZA057a | 30 |
| JN606270 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZB001a | 30 |
| JN606271 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZB002 | 30 |
| JN606272 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZB005 | 30 |
| JN606273 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZB006a | 30 |
| JN606274 | <i>C. albicans</i> | China | Opacidad oral y dental, Homo sapiens | ZB008a | 30 |

Dra. Hilda Sánchez Hernández

| | | | | | |
|----------|--------------------|-------------------|----------------------------------|-----------|---------------|
| JN606275 | <i>C. albicans</i> | China | Mucosa gástrica, Homo sapiens | ZB009a | 30 |
| JN606276 | <i>C. albicans</i> | China | Mucosa gástrica, Homo sapiens | ZB011a | 30 |
| KF746415 | <i>C. albicans</i> | Brazil | Homo sapiens, cavidad oral | LMICRO502 | ⁴⁷ |
| KF746425 | <i>C. albicans</i> | Brazil | Homo sapiens, cavidad oral | | 36 |
| KJ739863 | <i>C. albicans</i> | United Kingdom | homo sapiens | VPSA1 | ⁴⁸ |
| KP674535 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | B280A | 30 |
| KP674545 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | d8a | 30 |
| KP674664 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | D135B | 30 |
| KP674768 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | h69b | 30 |
| KP675051 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | H316B | 30 |
| KP675096 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | H346A | 30 |
| KP675135 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | H372A | 30 |
| KP675304 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | M115A | 30 |
| KP675319 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens cavidad oral | M134B | 30 |
| KP675322 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | M144A | 30 |
| KP675420 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | M242A | 30 |
| KP675421 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | B280A | 30 |
| KP675505 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | M304b | 30 |
| KP675506 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | M305A | 30 |
| KP675541 | <i>C. albicans</i> | China | Homo sapiens, cavidad oral | M324B | 30 |

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- ¹ Akimot L., Rodrigues H., Gimenes F., et al. Prevalence of *Candida albicans* and *non-albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. Sao Paulo Med J. 2014;132(2):116-20.
- ² Buitrón R., Romero R., Bonifaz A. Estudio de especies *Candida no albicans* y su relación con candidiasis vulvovaginal recurrente. Ginecol Obstet Mex. 2002;70:431-436.
- ³ Loulergue P., Mahe V., Bougnoux M. et al. Fournier's gangrene due to *Candida glabrata*. Med Myc. 2008, 46, 171-173.
- ⁴ Buitrón R., Araiza-Santibáñez J., Basurto-Kuba E., et al. *Candida glabrata*: un oportunista emergente en vulvovaginitis. Cir Ciruj. 2009;77:455-460.
- ⁵ García B., Araiza J., Basurto E., et al. *Candida glabrata*: un oportunista emergente en vulvovaginitis. Cir Ciruj. 2009;77:455-460.
- ⁶ Miceli M., Diaz J., Lee S. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis. 2011;11:142-51.
- ⁷ Dujon B., Sherman D., Fischer G., et al. Genome evolution in yeast. Nature. 2004;430:35-44.
- ⁸ Bialkova A., Subik J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. Folia Microbiol. 2006;51(1):3-20.
- ⁹ Fidel P. *Candida glabrata*: An Important fungal pathogen for the 21st century. Clin Microbiol New. 2001;23(22):171-176.
- ¹⁰ Mendling W, Koldovsky U. Immunological investigation in vaginal mycoses. Mycoses. 1996;39:177-183.

- ¹¹ Solis M., Moreno M., Dávalos M. Colonización vaginal por *Candida spp.* Frecuencia y descripción de las especies aisladas en mujeres asintomáticas; Ginecol Obstet Mex. 2014;82:1-8.
- ¹² Foxman B., Muraglia R., Dietz JP. Prevalence of recurrent vulvovaginal Candidiasis in European Countries and the United States: result from an international panel survey. Am Soc Patho. 2013;117:340-345.
- ¹³ Van Tienderen P., Haan A., Linden G. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. TRENDS Ecol Evol. 2001;17(12):577-582.
- ¹⁴ Mas-Coma S., Bargues M. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vector inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. Acta Trop. 2009;110(3):112-136.
- ¹⁵ Schneider S., Morschhauser J., Induction of *Candida albicans* drug resistance genes by hybrid zinc cluster transcription factors. AAC. 2015; 59(1): 558-569.
- ¹⁶ Hernández JA, Vázquez A, Olguín C, et al; Prevalencia de vaginitis mixta en mujeres latinoamericanas según la percepción de los médicos. Preferencia, efectividad e inocuidad de clindamicina más ketoconazol; Ginecol Obstet Mex. 2008;76(11):652-8.
- ¹⁷ Tamura K., Battistuzzi FU., Billig P. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. PNAS. 2012;109:19333-19338.
- ¹⁸ Ochiuzzia M., Cataldi S., Guelfand L. Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*, Rev Argent Microbiol. 2014;46:107-110.
- ¹⁹ MCGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE MEXICO, 2004; Vademecum Académico de México.
- ²⁰ Rangel L., Martinez F., Maravilla P. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii sensu lato*. Med Myc. 2015;00:1-8.
- ²¹ Thompson JD., Higgins DG., Gibson TJ., CLUSTAL W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting

- positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-4680.
- ²² Kimura M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111-120.
- ²³ Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004;5:150-163.
- ²⁴ Posada D and Crandall A. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817-818.
- ²⁵ Huelsenbeck J., Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics.* 2001;17:754-755.
- ²⁶ Ronquist F, Huelsenbeck P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572-1574.
- ²⁷ Martínez F., Jimenez D., Chenillo P., et al. Geographical widespread of two lineages of *Taenia solium* due to human migrations: Can population genetic analysis strengthen this hypothesis?. *Inf Genet Evolut.* 2009;9:1108-1114.
- ²⁸ Castelleo J, Templeton AR, Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Mol Phylogenet Evol.* 1994;3:102-113.
- ²⁹ Hellberg D., Zdolsek B., Nilsson S., et al. Sexual behavior of women with repeated episodes of vulvovaginal candidiasis. *Eur J Epidemiol.* 1995;11:575-9.
- ³⁰ De León EM., Jacober SJ., Sobel JD., et al. Prevalence and risk factors for vaginal candida colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMJ Infect Dis.* 2002;2:1-4.

- ³¹ Donders GG., Prenen H., Verveke G., et al. Impaired tolerance for glucose in women with recurrent vaginal candidosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:989-93.
- ³² Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiologic and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet.* 2000;71 Suppl 1:21-7.
- ³³ Goplerud C., Ohm M., Galask R. Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium. *Am J Obstet Gynecol.* 1976;126:858-68.
- ³⁴ Ramírez A., Pereiro Jr., Toribio J. Vulvovaginitis de repetición. Valoración diagnóstica y manejo terapéutico *Actas Dermosifiliogr.* 2008;99:190-8.
- ³⁵ Schneider S., Morschhauser J., Induction of *Candida albicans* drug resistance genes by hybrid zinc cluster transcription factors. *AAC* 2015; 59(1): 558-569.
- ³⁶ Yue X., Chen P., Tang Y., et al. The dynamic changes of vaginal microecosystem in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis: a retrospective study of 800 patients, *Arch Gynecol Obstet* (2015) 292:1285–1294.
- ³⁷ Rezusta A., Theelen B., Boekhout T. Lipophilic *Candida glabrata* isolated from candiduria. Unpublished. Submitted (13-OCT-2005) Microbiologia, Hospital Villanova, Zaragoza, Spain.
- ³⁸ Wang W. and Chi Z. Research on diversity of marine yeasts. Submitted (16-DEC-2006) College of Marine Life, Ocean University of China, 5 Yushan Road, Qingdao, Shandong 266003, PR China.
- ³⁹ Guo N. and Chi Z. Research on diversity of marine yeasts. Submitted (21-DEC-2006) College of Marine Life, Ocean University of China, Yushan Road No. 5, Qingdao, Shandong 266003, PR China.
- ⁴⁰ Desnos M., Ragon M., Robert V., et al. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*) *J. Clin. Microbiol.* 2008(10):3237-3242.

- ⁴¹ Gong Y.B., Zheng J.L., Jin B., et al. Particular *Candida albicans* strains in the digestive tract of dyspeptic patients, identified by multilocus sequence typing PLoS ONE 2012;E35311,7(4).
- ⁴² Fernandez P.M., Cabral M.E., Delgado O.D., et al. Textile-dye polluted waters as a source for selecting chromate-reducing yeasts through Cr(VI)-enriched microcosms. Biodegradation 79;2013:28-35.
- ⁴³ Ribeiro,J. Yeast diversity and ecophysiology in an organic managed sugar cane field; Thesis Soil Science, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, BRAZIL. 2009 Unpublished.
- ⁴⁴ Meyer,W., Serena,C., Chen,S., et al. Sequence based fungal identification, databases, intra-species variation and molecular cut-off points Unpublished
- ⁴⁵ Alka,M. and Sharma,G.D. Submitted (04-JUN-2011) Department of Life Science & Bioinformatics, Assam University, Silchar-788011, India, Dargakona, Silchar, Assam 788011, India Direct submission.
- ⁴⁶ Zhao Y., Xiao M., Kong F., et al. Non-Candida albicans yeast infections in a tertiary hospital in Beijing, China: a one-year survey Unpublished.
- ⁴⁷ Barbieri D.S.V., Herkert P.F., Santos G.D., et al. Characterization of Candida spp. isolates from schoolchildren oral microbiota with different backgrounds caries; Unpublished.
- ⁴⁸ Yassin,S.A. and Jakubovics,N.S. Direct Submission Submitted (23-APR-2014) Oral Biology, Newcastle University, Framlington Place, Newcastle upon Tyne, Tyne and Wear NE2 4BW, UK.