

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS AISLADAS DE LECHE DE VACA

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**ANDIRA ALEJANDRA HERNÁNDEZ ROMAHN**

ASESORES

DR. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES  
M. en C. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

MÉXICO, D.F.

2006



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 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***A mi MAMÁ*

Porque sólo tú supiste darme el valor y la fuerza en una encrucijada de mi vida, porque sólo tú has derramado sangre y lágrimas por nosotros, porque eres la mujer más maravillosa a quien admiro y adoro. Gracias por todo mom (supermom).

*A mi padre*

Porque contigo obtuve los recuerdos más hermosos de la infancia y porque fuiste un apoyo importante durante mi carrera. Gracias daddy.

*A Donatia (dona)*

Porque hemos estado juntas desde siempre, porque tengo la dicha de tenerte como mi compañera, mi confidente, mi cómplice. Gracias sister sister, sin ti la vida hubiera sido aburrida.

*A Misael (flaco maldi)*

Porque hemos sido muy unidos desde pequeños, porque los papeles se invirtieron y entonces tú me aconsejabas a mí, ya que la vida te hizo crecer más rápido. Gracias flaquito.

*A Giselle (la beba terrorista)*

Porque le diste nueva vida a la familia, porque tu y yo nos parecemos tanto, porque disfruto estar contigo. Gracias princesa.

*A Jade*

Porque aunque te haya secuestrado la bruja malvada, siempre te tengo presente.

*A Toño*

Porque llegaste justo en el momento que necesitábamos una mano, porque nos diste tu cuidado y cariño sin pedir nada a cambio. Gracias por todo.

*A Alejandro*

Porque me diste a sentir todo un mar de sensaciones, porque creamos una relación de misticismo que logramos perdurar, porque al voltear es inevitable ver tantos años juntos los cuales guardaré por siempre. Gracias chaparro, por tu amor, tu amistad, tus consejos y tu auxilio.

*A Fita*, porque sólo tu pudiste dejar una huella en mí.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. RACO, mi mentor, mi maestro, mi papá académico, quien me dio la oportunidad de conocer el mundo de los hongos, quien me escuchó y aconsejó cuando lo necesité, a quien debo tanto y quiero.

A Caro, mi mamá académica, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza, por sus consejos, por su amistad, por los buenos momentos y el apoyo incondicional en aquellos no tan buenos; aprendí mucho de ti.

Al Dr. Ducoing, por su colaboración en el análisis estadístico, sus observaciones y amabilidad.

Al laboratorio de Microbiología Molecular, especialmente a Hector, Elsa, Elvia y Daniel, por su disposición, por el tiempo, y guía.

Al laboratorio de Tuberculosis, especialmente a Rigo, por su interés y ayuda.

Al laboratorio de Genética Molecular, especialmente a Amanda y Rogelio, por su orientación y amabilidad.

A los miembros del honorable jurado por ser imparciales y justos: Dr. Salvador Ávila Tellez, Dr. Edgar Alfonseca Silva, Dr. Hugo Montaldo Valdenegro, Dr. Daniel Martínez Gómez, Dr. Roberto A. Cervantes Olivares.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Micología: David, Ale, Karla y especialmente a Sara, Ceci y Chucho, gracias por su apoyo y amistad.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología especialmente a Lore, Rodrigo, Pablo, Lupita, Rosi, Raúl, Fabis, Emma, Dr. de la Peña, Armando, Dra. Cristina Rodríguez, Dr. Sahagún, Liliana, Olivia y Toño gracias por los buenos momentos y las charlas.

A mi mejor amiga de todos los tiempos, Eva, porque agradezco que después de tantos años seguimos juntas, con esta gran amistad, con el apoyo, con el cariño, con los consejos, con las lágrimas, con las risas y todo aquello que nos mantiene unidas.

A mis amigos y amigas del grupo 9, Adis, Moni, Vero, Itzel, Miriam, Ale, Sonia, Chabela, Brenda, Arlen, Michel, Aaron, Humberto, Saúl, Toño, Oscar, Omar, Pancho, Madre, Adrian, Marcelo, Gabriel, Mauri, Capi, porque con ustedes encontré una familia y una buena amistad, con ustedes disfruté de las buenas fiestas, las historias, la música y la lealtad.

A Rebecca quien me dio su confianza sin dudarle, y que desde lejos sigue estando presente.

A mis queridas amigas Yessica y Amaranta, a quienes el destino me unió, con las que compartí mi vida académica y personal desde el primer día de la carrera, a las que guardo un cariño muy especial.

A mis hermanos y hermanas de Mtz. de la Torre, porque con ustedes formé una familia que recordaré por siempre.

A mi querida abuelita Conchita del mar, perla fina del oriente, por que de ti surgió toda la maravillosa familia de la cual formo parte, gracias por tu amor, tus cuidados, tus consejos y tus maravillosas historias.

A mi estimada abuelita Maru, por tu cariño y amor, porque a pesar de que estemos lejos, siempre estas en mis pensamientos.

A todos mis tíos y tías, por todo el apoyo y amor, que siempre hemos compartido.

A mis primos y primas, por las travesuras y locuras de las que fuimos cómplices, y porque se que tendré su ayuda y amor siempre.

A Evelyn y Jose Carlos, porque supimos que ser hermanos va más allá de llevar la misma sangre.

A la señora Rufina, por su gentileza y cariño, gracias por darme albergue en los momentos que necesitaba.

Al proyecto PAPIIT 216703 por haberme otorgado la beca y el financiamiento para este trabajo.

A ellos, quienes fueron la causa principal de tomar este camino, quienes piden nada y a quienes debo todo, los animales.

A la UNAM, mi *alma mater*, la mejor, la cual me ha dado la satisfacción de pertenecer a ella y disfrutar de logros y triunfos. Soy hecha en C.U. y Orgullosamente Universitaria!!!!

A todos aquellos que, en una forma u otra, participaron en la realización de este trabajo, gracias.

“I hear and I forget, I see and I remember, I touch and I understand”

Porverbio chino



2.1. Aislados de levaduras	12
2.2. Cepas de referencia	12
2.3. Condiciones de cultivo	12
2.4. Extracción de ADN	13
2.5. Amplificación de la región ITS-5.8S ADNr mediante la técnica de PCR	14
2.6. Análisis estadístico	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Extracción de ADN	
3.2. Amplificación de la región ITS-5.8S ADNr mediante la técnica de PCR	17
3.2.1. PCR para las cepas de referencia	18
3.2.2. PCR para los aislados de levaduras	29
3.3. Análisis estadístico	29
3.3.1. Tablas de contingencias	29
4. DISCUSIÓN	30
5. CONCLUSIONES	37
6. LITERATURA CITADA	38
7. CUADROS	46

---

**RESUMEN**

HERNÁNDEZ ROMAHN ANDIRA ALEJANDRA. Estandarización de la técnica de PCR para la identificación de levaduras aisladas de leche de vaca (bajo la dirección del Dr. Roberto A. Cervantes Olivares y la M. en C. Carolina Segundo Zaragoza).

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN han permitido reducir el tiempo en la identificación y caracterización de las levaduras. Una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación del complejo de las regiones ITS y el gen 5.8S ADNr, es útil para medir relaciones filogenéticas fúngicas cercanas. El objetivo de este estudio aportar un método alternativo de identificación utilizando la técnica de PCR en aislados de levaduras obtenidos de leche de vacas sanas y con mastitis. Se realizó la extracción de ADN a 277 aislados de levaduras de leche de vacas, identificadas por bioquímica 86 *C. glabrata*, 75 *C. krusei*, 13 *Candida albicans*, 58 *Candida* spp. y 45 no identificadas. Para la técnica de PCR se utilizaron iniciadores que amplifican la región del ITS-5.8S ADNr. Se lograron establecer 7 grupos con base a los productos de amplificación de los aislados de *Candida* spp. Para *P. zopfii*, *C. slooffii*, *C. glabrata* y *C. krusei*, la identificación bioquímica coincidió en un 100%, 100%, 91.8% y 93.3% respectivamente, con la identificación molecular. Los iniciadores utilizados discriminaron *C. glabrata*, *C. cantarelli*, *C. norvegica* y *C. kefir*. Se logró la identificación molecular del 48.8% de las especies no identificadas bioquímicamente.

## SUMMARY

HERNÁNDEZ ROMAHN ANDIRA ALEJANDRA. Standardize the technique of PCR for the identification of yeasts isolated from cow milk (under the direction of Ph. D. Roberto A. Cervantes Olivares and MSc. Carolina Segundo Zaragoza).

Development of molecular techniques based in DNA analyses have allowed to reduce time on the identification and characterization of yeast. One of these techniques is polymerase chain reaction (PCR). We tested the usefulness of amplifying the ITS regions and the 5.8S rRNA gene that are useful to measure close phylogenetic fungal relationships. The aim of the present study was to port an alternative method of identification using PCR technique in isolates obtained from healthy and mastitis milkcow. Extraction of DNA was performed to 277 yeast isolates previously identified by biochemical and morphological methods that showed 86 *C. glabrata*, 75 *C. krusei*, 13 *Candida albicans*, 58 *Candida spp.* and 45 could not be identified. Primers that amplified the ITS-5.8S rDNA region were used for PCR technique. 7 groups were established depending on the size of the different amplification products of the isolates of *Candida spp.* The biochemical identification of *P. zopfii*, *C. slooffii*, *C. glabrata* y *C. krusei* matched the molecular identification in 100%, 100%, 91.8% y 93.3% respectively for these four species. The used primers discriminated *C. glabrata*, *C. cantarelli*, *C. norvegica* y *C. kefyr*. Molecular identification was performed in 48.8% of the non identified species.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras son hongos unicelulares distribuidos ampliamente en el ambiente, algunas, forman parte de la microflora normal en piel y mucosas de los animales y del hombre.<sup>1,2</sup>

Generalmente son organismos oportunistas causando infecciones agudas o crónicas cuando las condiciones son favorables en el huésped.<sup>1</sup>

La candidiasis es una enfermedad que puede ser de curso agudo o subagudo, afectando la piel o las membranas de mucosas en sistema digestivo, algunas veces en los diferentes órganos de aves, perros, gatos, becerros, potros, lechones y hombre.<sup>3</sup> *Candida* es uno de los géneros de levaduras clínicamente más importantes.<sup>1,4,5,6,7,8,9,10</sup> En animales es agente causal de la candidiasis y del 75% de casos de mastitis micótica, así como de algunos casos de aborto micótico, las dos últimas en vacas.<sup>2</sup>

### 1.1 *Candida* spp.

Este género se encuentra clasificado dentro del grupo de los Deuteromicetos al cual pertenecen la mayoría de los hongos patógenos al humano y a los animales. Se encuentra constituido por 163 especies.<sup>11</sup> *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* y *C. slooffii* son algunas de las especies en animales causantes de enfermedad.<sup>2</sup>

*Candida albicans* ha sido considerada por mucho tiempo como la especie más importante de este género, responsable de la mayoría de las enfermedades causadas por hongos levaduriformes.<sup>1,10,12,13</sup> Sin embargo, otras especies como *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* y *C. lusitaniae* han empezado a emerger como patógenos en el ser humano<sup>12,14,15</sup> las cuales poseen una susceptibilidad distinta hacia los diferentes antifúngicos.<sup>5,6,8,10,12,14,15,16,17,18,19</sup>

### 1.1.1 Generalidades morfológicas

El género *Candida* agrupa microorganismos levaduriformes que miden de 2-5  $\mu\text{m}$  por 3-7  $\mu\text{m}$  las cuales se reproducen por gemación multilateral (blastoconidias). Estas células pueden estar solas, en pares o en cadenas, presentando una reacción tintorial al Gram positiva. Los organismos dentro de este género son unicelulares o filamentosos con formación de pseudomicelio, micelio septado, reproducción asexual y en algunas especies la reproducción sexual.<sup>20</sup> El término pseudomicelio se designa a la agrupación de blastoconidias, que a la observación microscópica dan la impresión de micelio. El micelio verdadero está formado por la elongación y ramificación del tubo germinal producido por la célula madre. Existen otras estructuras presentes en *C. albicans* y *C. dubliniensis* como el tubo germinal, el cual se forma por un alargamiento de la célula madre sin llegar a desprenderse, siendo considerado como una estructura intermedia entre la fase de levadura y la fase de filamento; y las clamidoconidias, formas de reproducción asexual formadas por ensanchamiento de la hifa, redondas y con una doble pared refringente.<sup>20,21</sup>

### 1.1.2 Generalidades fisiológicas

Es un microorganismo anaerobio facultativo, no es exigente nutricionalmente, y puede crecer en un rango amplio de temperaturas (28 a 37°C) y de pH (3-7). Puede utilizar una gran variedad de carbohidratos mediante la oxidación aeróbica, así como la glucólisis anaerobia (Embden-Meyerhof), las cuales son las bases para las pruebas de asimilación y fermentación utilizados para la identificación fúngica. La respiración se realiza como todo eucariote, en las mitocondrias e involucrando citocromos. Posee una gran variedad de enzimas como la quitin-sintetasa y las glucano-sintetasa, involucradas en la síntesis de la pared celular; enzimas hidrolíticas, tales como proteinasas ácidas o fosfolipasas, que pueden tener un papel en el proceso patogénico; entre otras.<sup>13</sup>

## 1.2 Métodos de identificación

### 1.2.1 Microbiológicos

Tradicionalmente, la identificación y clasificación de especies de levaduras se ha basado en métodos microbiológicos, donde se exhiben sus diferencias morfológicas y habilidades fisiológicas.<sup>1,4,5,8,10,12,22</sup>

Entre las pruebas de rutina más utilizadas para la identificación del género *Candida* spp. están: la observación de diferencias morfológicas en una tinción de Gram, formación de clamidoconidias, formación de tubo germinal, la fermentación y asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, resistencia a ciclohexamida, requerimientos vitamínicos y termotolerancia.<sup>12, 23</sup>

La metodología convencional requiere de unas 60 a 90 pruebas para su evaluación, procedimientos que pueden ser tardados, laboriosos y complejos.<sup>4,8,10,14</sup> La evaluación de estas pruebas requiere de experiencia en micología,<sup>16</sup> además de que están influenciadas por las condiciones de cultivo que pueden dar resultados inciertos.<sup>4,8,10,24</sup>

#### 1.2.1.1 Comerciales

Los productos comerciales que permiten la identificación se basan en la capacidad de asimilación de carbohidratos por las levaduras. Estos productos tienen una confiabilidad del 99% entre los cuales se encuentran: Yeast Ident o API 20C (Analytab Products, Planview, N.Y.), sistemas automatizados como el sistema Vitek (Vitek Systems, Inc., Hazelwood, Mo) y Quantum II (Abbot Laboratorios, Irving, Tex.).<sup>20,25</sup> Sin embargo, el costo de estos productos es alto si se toma en cuenta el número de levaduras a identificar y que además, sólo están disponibles para las especies de *Candida* más comunes.

### 1.2.2 Moleculares

Para evadir ambigüedades taxonómicas y simplificar los métodos de identificación de levaduras, se han creado nuevas técnicas basadas en el análisis del ADN las cuales han mostrado ser de gran utilidad.<sup>12,14</sup> Éstas incluyen hibridación de ADN-ADN,<sup>26</sup> electroforesis de cariotipo,<sup>27</sup> polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN cromosomal,<sup>28</sup> polimorfismo del ADN mitocondrial,<sup>28</sup> análisis de microsatélites,<sup>28</sup> polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado (RAPD),<sup>28</sup> entre otras. Como característica de estas técnicas, es su alta precisión, ya que a diferencia de las técnicas mencionadas, la secuencia de ADN no varía en los diversos estados fisiológicos.<sup>25</sup> No obstante, estas técnicas identifican a grupos fúngicos reducidos o a un número limitado de levaduras, además de que requieren la combinación de diferentes iniciadores, enzimas de restricción y sondas de hibridación.<sup>29</sup>

#### 1.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida y confiable para la caracterización molecular de las levaduras.<sup>14</sup> Consiste en la amplificación de secuencias específicas de ADN blanco mediante el uso de una ADN polimerasa termoestable, dos iniciadores sintéticos así como la adición de nucleótidos libres.<sup>30</sup>

El procedimiento estriba en ciclos repetitivos de temperaturas específicas de incubación. Cada ciclo implica una desnaturalización a una temperatura usualmente de 94°C, lo cual separa la doble cadena de ADN en dos sencillas; un apareamiento de los iniciadores con su secuencia complementaria del ADN blanco, a una temperatura que por lo regular es de 55 a 72°C; y finalmente, la extensión de los fragmentos mediante la ADN polimerasa que utiliza los nucleótidos libres, a una temperatura de 72°C. Los productos de la amplificación al

término de un ciclo sirven de molde para la siguiente extensión, por lo que la acumulación de secuencias específicas es exponencial.<sup>30</sup>

La identificación de organismos por medio de esta técnica se ha vuelto común a causa de la relativa facilidad de manipulación y su alta reproducibilidad.<sup>31,32,33</sup>

La PCR ha sido utilizada para el diagnóstico y la identificación de especies de *Candida* utilizando diferentes fragmentos a amplificar, como son: el gen de actina,<sup>9</sup> los genes 18S ADNr,<sup>29,34</sup> el gen CaYST1,<sup>35</sup> el gen de quitina,<sup>36</sup> el gen HSP90,<sup>37</sup> el gen EFB1,<sup>38</sup> los genes 26S ADNr,<sup>1,39</sup> entre otros.

Analizando los diversos estudios que utilizan la PCR para amplificar diferentes fragmentos, se ha decidido seleccionar, para este trabajo, iniciadores universales los cuales reconocen regiones constantes dentro de las especies fúngicas importantes en medicina veterinaria. Estos iniciadores amplifican la región ITS-5.8S del ADN ribosomal (ADNr).

#### **1.2.2.1.1 La región ITS-5.8S ADNr**

La región ITS-5.8S del ADNr se encuentra localizada dentro del complejo de genes del ADNr. Todas las células eucariotas, tales como los hongos, tienen este complejo que se encuentra repetido en el genoma alrededor de unas 100 veces. La organización de este complejo en los hongos incluye (de 5' a 3') una secuencia que codifica para el gen 18S del ADNr, un espaciador transcrito interno (ITS) 1, la región codificadora del gen 5.8S del ADNr, otra región ITS (llamada ITS2) y una secuencia que codifica para el gen 28S del ADNr.<sup>8,40</sup>

Las regiones codificadoras de los genes 18S, 5.8S y 28S del ADNr han evolucionado lentamente, y son relativamente conservadas entre los hongos, lo cual da las bases moleculares para establecer relaciones filogenéticas. Entre estas regiones de genes codificadores del ADNr están las regiones ITS1 e ITS2 que han evolucionado

rápidamente. Aun no se sabe con certeza la función de estas regiones, pero debido a la variabilidad de secuencias que poseen, se han podido usar para la separación tanto de género como de especie.<sup>40</sup>

Anteriormente los trabajos que usaron el complejo del ADNr como objeto de estudio para identificación de hongos, se concentraron en la región del gen 18S del ADNr.<sup>29,34,41</sup> Esta región mide alrededor de 1800 pares de bases (pb) contando tanto las secuencias de los dominios variables y conservados. La variación de secuencias dentro de esta región ha sido utilizada para valorar las relaciones taxonómicas de organismos superiores y para separar géneros y especies basados en el polimorfismo de secuencias.<sup>14,40</sup> Otros genes dentro de este complejo también han sido estudiados para evaluar a los hongos a nivel molecular, estos son el gen 5.8S del ADNr y el 28S del ADNr. La región del gen 5.8S del ADNr mide sólo 160 pb y es altamente conservado, por lo que no es apropiado para estudios filogenéticos de especies de hongos. La región 28S del ADNr mide alrededor 3400 pb contando tanto las secuencias de los dominios variables y conservados. Los dominios variables de esta región también han permitido comparaciones a diferentes niveles taxonómicos. La comparación de secuencias de nucleótidos dentro de estas regiones para separar géneros y especies de hongos fue exitosa. Sin embargo, la limitada variabilidad de secuencias dentro de estos genes del ADNr (como en 18S y 5.8S), junto con la necesidad de comparar largas secuencias de estas regiones (como 28S), ha llevado a la evaluación de regiones más cortas con el propósito de separar especies de hongos, como es el caso de la región ITS-5.8S del ADNr.<sup>40</sup>

El hecho de que estas dos regiones estén combinadas en el mismo fragmento, permite que sea una herramienta útil para llevar a cabo estudios que permitan la diferencia a nivel de género y hasta especie.<sup>14</sup>

### 1.2.2.1.2 Identificación de levaduras amplificando la región ITS-5.8S ADNr

Previos estudios han demostrado que el complejo de las regiones ITS (espaciadores de transcripción internos) y el gen 5.8S ARNr, son útiles para medir relaciones filogenéticas fúngicas cercanas, ya que exhiben diferencias interespecíficas más grandes que los genes 18S y 28S rRNA.<sup>6,7,8,18,19,42,43,44</sup>

El uso de este fragmento ha sido exitoso para la diferenciación de especies de *Candida* sin tener que utilizar enzimas de restricción u otra técnica adicional, como son: *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. lyopolitica* y *C. kefir*.<sup>4,8,43,19</sup>

La amplificación de éste fragmento (región ITS-5.8S ADNr) también ha sido utilizado para la identificación de levaduras involucradas en la fermentación del vino,<sup>27,45</sup> diferenciación de las 7 especies de *Malassezia*,<sup>46</sup> estudios en el género *Metschnikowia*,<sup>47</sup> *Torulaspota* y *Saccharomyces*,<sup>48</sup> detección e identificación de levaduras causantes de infecciones oculares,<sup>18</sup> y la identificación de levaduras importantes en medicina.<sup>49</sup>

## JUSTIFICACIÓN

Escasos son los trabajos que se han realizados en el área de la micología veterinaria acerca de los problemas micóticos causados en animales por levaduras como es el caso de la candidiasis, y más escasos aún son los trabajos moleculares para diagnosticar, identificar y caracterizar a éstos hongos unicelulares. Utilizar métodos de identificación fenotípica ya no son suficientes para conocer la especie involucrada de una manera rápida y adecuada, por lo que es necesario encontrar métodos alternativos de identificación que abarquen a un número grande de especies que nos den resultados más acertados y rápidos. En este trabajo, se ha considerado la amplificación de la región ITS-5.8S del ADNr mediante la técnica de PCR, como camino hacia la identificación de especies de *Candida* aisladas de leche de vacas, colaborando así con la adecuada y rápida identificación de especies de *Candida*.

## **HIPÓTESIS**

La amplificación de la región ITS-5.8S del ADNr por PCR permitirá identificar y diferenciar las especies de levaduras aisladas de leche de vaca.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación y diferenciación de levaduras aisladas de leche de vacas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estandarizar la extracción de ADN a partir de cultivos de levaduras de leche de vacas.
- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN de cultivos puros de levaduras aisladas de leche de vacas.
- Identificar y diferenciar las especies de levaduras mediante la técnica de PCR.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Aislados de levaduras

Se utilizaron 277 aislados de levaduras, proporcionadas por el laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de leche de vacas obtenidas en los estados de México, Hidalgo, Puebla, Querétaro y Distrito Federal; 77 fueron de animales clínicamente sanos, 32 de animales con mastitis subclínica y 168 de animales con mastitis clínica.<sup>23</sup> Los aislados de levaduras fueron previamente identificadas por métodos tradicionales (Luna, 2005) como sigue: 86 *C. glabrata*, 75 *C. krusei*, 13 *C. albicans*, 7 *C. zeylanoides*, 6 *C. viswanathii*, 5 *C. guilliermondii*, 5 *C. kefir*, 5 *C. norvegica*, 5 *C. tropicalis*, 4 *C. intermedia*, 4 *C. parapsilosis*, 4 *P. zopffi*, 2 *C. brumptii*, 2 *C. lusitaniae*, 2 *C. norvegensis*, 2 *C. slooffii*, 1 *C. cantarelli*, 1 *C. firmetaria* (antes *C. lambica*), 1 *C. incommunis*, 1 *C. lypolitica*, 1 *C. macedoniensis* y 45 aislados no identificados.

### 2.2 Cepas de referencia

Como cepas de referencia se utilizaron a *Candida albicans* ATCC 10231<sup>∂</sup>, *Candida krusei* ATCC 6258<sup>∂</sup> y *Candida parapsilosis* ATCC 2201<sup>∂</sup>; como aislados clínicos, a *Cryptococcus neoformans*<sup>∞</sup>, *Rhodotorula* spp.<sup>∞</sup>, y a una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* Sc47<sup>°</sup>.

### 2.3 Condiciones de cultivo

Cada cepa y aislado se cultivó en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) a 37°C de 24-48 h, del cual se tomó una colonia y se transfirió en 5 ml de caldo tripton-glucosa-extracto de

---

<sup>∂</sup> Donados por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN

<sup>∞</sup> Proporcionadas por el laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

<sup>°</sup> Probiótico comercial BIOSAF®SC47

levadura (TGY), en el caso de los aislados y cepas de referencia, los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante a 250 rpm por 24 h hasta alcanzar una concentración aproximada de  $1 \times 10^5$  de levaduras/ml. El tiempo de crecimiento para *Cryptococcus neoformans* fue de 48 h.<sup>17,50</sup>

#### 2.4 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN de cada cepa y aislado, se utilizó el método descrito por Hoffman et. al.<sup>51</sup> Se colectaron las células del caldo TGY mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 500 µl de agua destilada y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se le adicionó 200 µl de una solución de lisis (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM), 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico<sup>♦</sup> (25:24:1) y 0.3 g de perlas de vidrio de 0.425-600 mm<sup>▲</sup>, se mezcló de 2-3 min. Se le adicionó 200 µl de solución amortiguadora TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM) y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y se le agregó 1 ml de etanol absoluto frío para posteriormente centrifugar a 14000 rpm por 5 min. La pastilla se resuspendió en 400 µl de solución amortiguadora TE y 30 µg de ribonucleasa A<sup>\*</sup> (RNAsa A). Se incubó a 37°C por 10 min o hasta la disolución total de la pastilla. Se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y 10 µl de acetato de amonio 4M. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 15 min y se resuspendió en 50 µl de agua miliQ.<sup>51</sup>

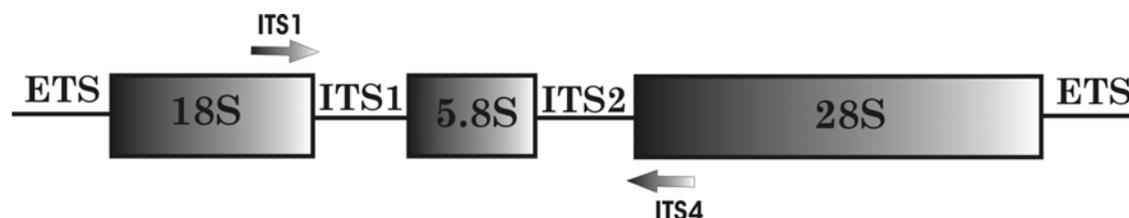
---

♦ Invitrogen  
▲ Sigma  
\* MP Biomedicals

El ADN obtenido fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%<sup>52</sup> adicionado con bromuro de etidio (5mg/ml) para observar su calidad. A cada pozo se le agregó 2 µl de colorante de carga (xilen cianol 0.25%, azul de bromofenol 0.25%, glicerol en agua al 30%) y 8 µl de ADN. La concentración de ADN se determinó en un fluorómetro<sup>∞</sup> para luego almacenarse a 4°C hasta su uso. Con este método de extracción se obtiene un rendimiento aproximado de 2-4 µg de ADN genómico totales.<sup>51</sup>

### 2.5 Amplificación de la región ITS-5.8S ADNr mediante la técnica de PCR

Los iniciadores utilizados para la amplificación fueron el ITS1 y el ITS4 descritos por White et al.<sup>44</sup> los cuales flanquean la región ITS-5.8S ADNr que incluye el gen 5.8S ARNr y las dos regiones no codificadoras designadas como espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 2 (Fig. 1).



**Fig. 1** Diagrama que representa el complejo genético del ADNr en hongos para ilustrar la localización de los iniciadores (flechas) utilizados para la PCR.

La secuencia de nucleótidos de dichos iniciadores es la siguiente:

ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3')

ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')<sup>44</sup>

<sup>∞</sup> Hofer DyNA Quant 200

Dependiendo del género y especie de cada aislado será el tamaño del fragmento, que va de 350 pb hasta 850 pb (Cuadro 1) .<sup>4,5,8,18,19,24,43,49,50,58</sup>

La reacción de la PCR se realizó en un volumen de 100 µl, la cual contenía una mezcla de 1X de amortiguador de reacción para PCR<sup>φ</sup>, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub><sup>φ</sup>, 200µM de la mezcla de nucleótidos trifosfatados<sup>Ω</sup>, 0.5 µM de cada iniciador<sup>£</sup>, 2.5 U de Taq ADN polimerasa<sup>φ</sup>, 100 ng de ADN genómico y el resto de agua miliQ. Para el control negativo, se usó agua miliQ en lugar de ADN genómico.<sup>5,24,43,45,46</sup>

Se utilizó un termociclador Genius<sup>∞</sup> donde las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, una alineación de 55.5°C por 2 minutos, una extensión a 72°C por 1 minuto y una final a 72°C por 10 minutos.<sup>24</sup>

Se realizó la PCR por duplicado de los aislados de leche de vaca, con excepción de los aislados identificados como *C. glabrata* y *C. krusei* donde el duplicado se realizó aleatoriamente a cinco y a ocho aislados respectivamente.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%<sup>47,42</sup> adicionado con bromuro de etidio en amortiguador TAE 1X a 80 volts por 35 minutos y documentado mediante una fotografía utilizando un digitalizador Fluor-S<sup>⊗</sup>. El tamaño del fragmento de cada producto de PCR se determinó usando el programa Diversity Database ver. 2.0 (Bio-Rad Laboratorios), usando como referencia el marcador de peso molecular de 1Kb<sup>θ</sup>.

---

φ Altaenzymes  
Ω Invitrogen  
£ Instituto de Biotecnología, UNAM  
∞ Techne  
⊗ BioRad  
θ Fermentas

### **2.6 Pruebas estadísticas**

Con la información obtenida de los productos de amplificación de PCR se realizó un análisis de tablas de contingencia por especie para registrar y analizar la relación que tuvieron entre dos variables (los grupos que se obtuvieron por tamaño de amplificación y los aislados que coincidieron o no con la identificación bioquímica).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Extracción de ADN

Con el método de extracción descrito por Hoffman et. al.<sup>51</sup> se obtuvo ADN, el cual se visualizó en un gel de agarosa al 1%, donde no se observó degradación ni ARN (Fig. 2). El rendimiento promedio de los aislados con este método fue de 3.9  $\mu\text{g}$  de ADN genómico totales.

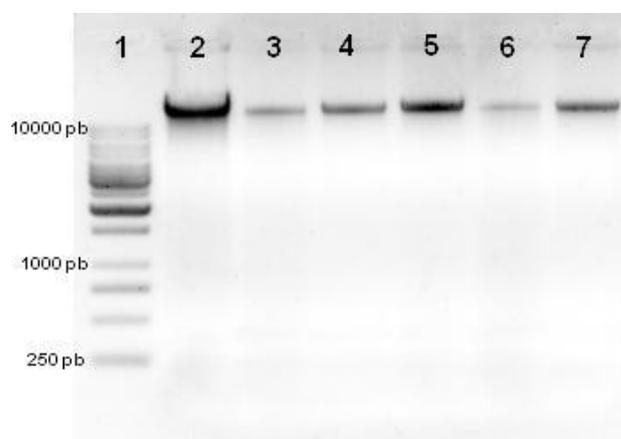


Fig. 2 Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el ADN genómico extraído mediante el método de Hoffman et. al.<sup>52</sup> Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 7: aislados de levaduras.

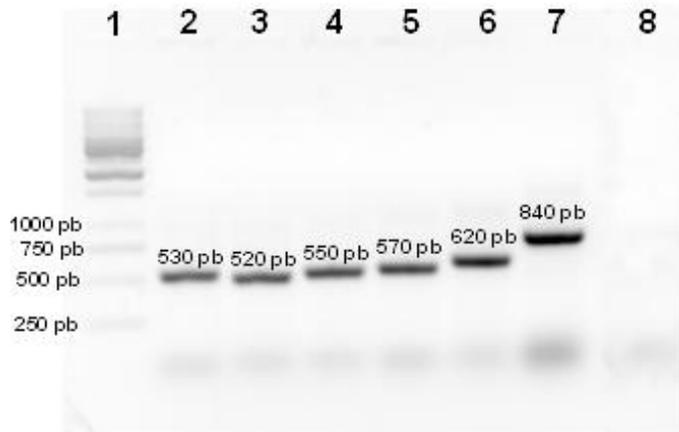
#### 3.2 Amplificación de la región ITS-5.8S ADNr mediante la técnica de PCR

Con el ADN extraído a partir de cultivos puros se realizó la PCR para amplificar la región ITS-5.8S ADNr.

##### 3.2.1 PCR para las cepas de referencia

Con las cepas de referencia se obtuvieron diferentes productos de amplificación, siendo para *C. albicans* ATCC 10231 de 530 pb; *C. krusei* ATCC 6258 de 520 pb;

*C. parapsilosis* ATCC 2201 de 550 pb; *Cryptococcus neoformans* de 570 pb; *Rhodotorula spp.* de 620 pb y para *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 de 840 pb (Fig. 3).



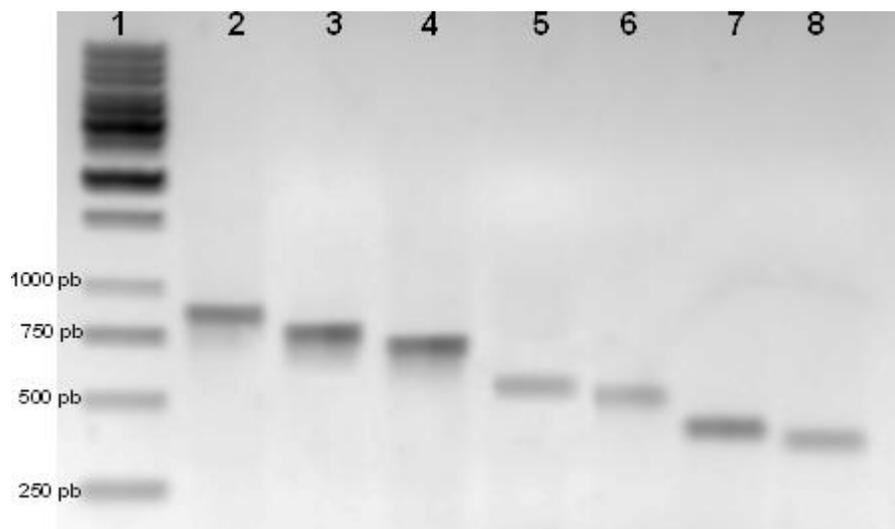
**Fig. 3.** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se observan los fragmentos amplificados por la PCR para las cepas de referencia. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: *Candida albicans* ATCC 10231. Carril 3: *Candida krusei* ATCC 6258. Carril 4: *Candida parapsilosis* ATCC 2201. Carril 5: *Cryptococcus neoformans*. Carril 6: *Rhodotorula spp.* Carril 7: *Saccharomyces cerevisiae* Sc47. Carril 8: Control negativo (agua).

### 3.2.2 PCR para los aislados de levaduras

En los aislados de leche de vacas se observaron diferentes tamaños de los productos de amplificación, con los cuales se lograron establecer arbitrariamente 7 grupos. El grupo I obtuvo una media de 883 pb; el grupo II, 762 pb; el grupo III, 703 pb; el grupo IV, 575 pb; el grupo V, 523 pb; el grupo VI, 442 pb; y el grupo VII, 390 pb (Cuadro 2 y Fig. 4).

**Cuadro 2.** Grupos y promedios de los diferentes tamaños de amplificación de PCR

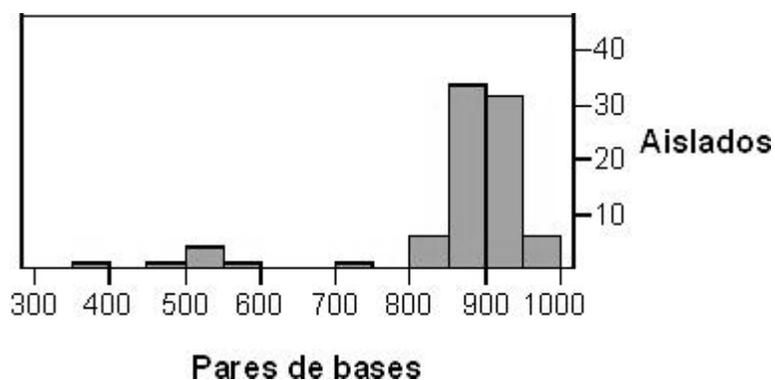
GRUPO	TAMAÑO PROMEDIO DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (pb)
I	883
II	762
III	703
IV	575
V	523
VI	442
VII	390

**Fig.4** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestran los 7 grupos de fragmentos amplificados por la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: grupo I. Carril 3: grupo II. Carril 4: grupo III. Carril 5: grupo IV. Carril 6: grupo V. Carril 7: grupo VI. Carril 8: grupo VII.

A continuación se presentan los resultados de los productos de amplificación por PCR de los aislados de levaduras por especie (identificada por métodos bioquímicos y morfológicos) de mayor a menor número de aislados.

### *C. glabrata*

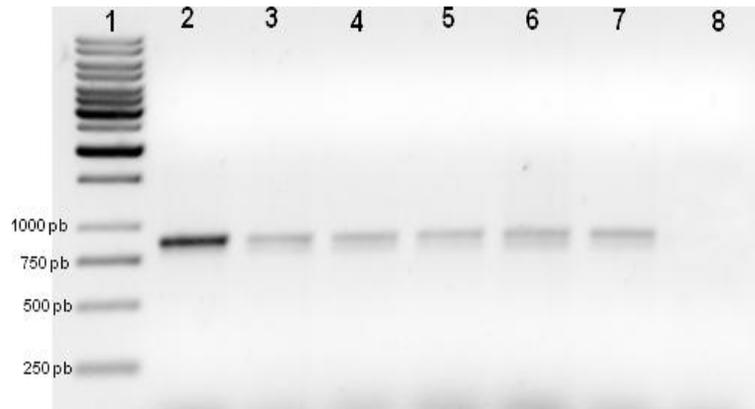
Los diferentes productos de amplificación de los 86 aislados de *C. glabrata* se muestran en la gráfica 1, donde se observa que 79 coincidieron con un producto de amplificación del grupo I\* (Fig. 5), 1 aislado se encontró dentro del grupo II\*\*; 4 aislados en el grupo V\*\*\*; y 2 aislados en el grupo VI\*\*\*\*.



**Gráfica 1.** Tamaño del producto de amplificación de PCR para los 86 aislados de *C. glabrata*.

---

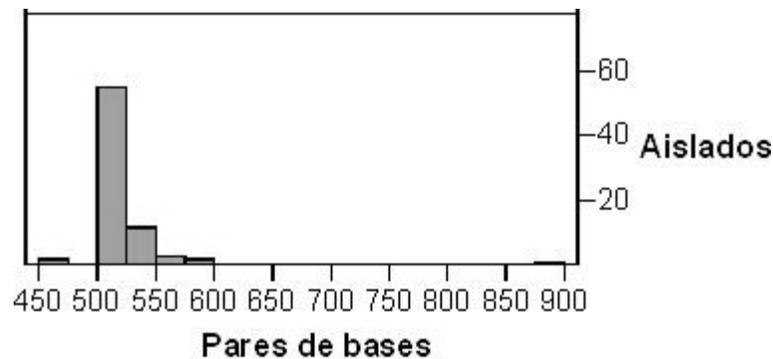
\* 883 pb  
 \*\* 762 pb  
 \*\*\* 523 pb  
 \*\*\*\* 442 pb



**Fig. 5** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 895 pb amplificado por la PCR para la especie de *C. glabrata*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 7: aislados de *C. glabrata*. Carril 8: Control negativo (agua).

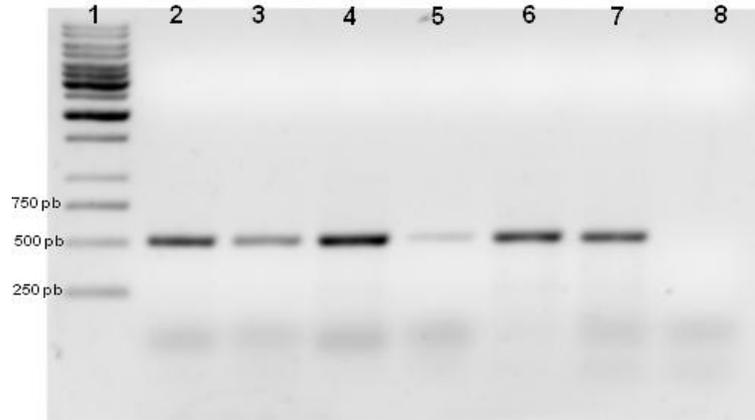
### *C. krusei*

Los diferentes productos de amplificación de los 75 aislados de *C. krusei* se muestran en la gráfica 2, donde se observa que 70 coincidieron con un producto de amplificación del grupo V\* (Fig. 6), 1 aislado se encontró dentro del grupo I\*\*; 3 aislados, en el grupo IV\*\*\*; y 1 aislado, en el grupo VII\*\*\*\*.



**Gráfica 2.** Tamaño del producto de amplificación de PCR para los 75 aislados de *C. krusei*.

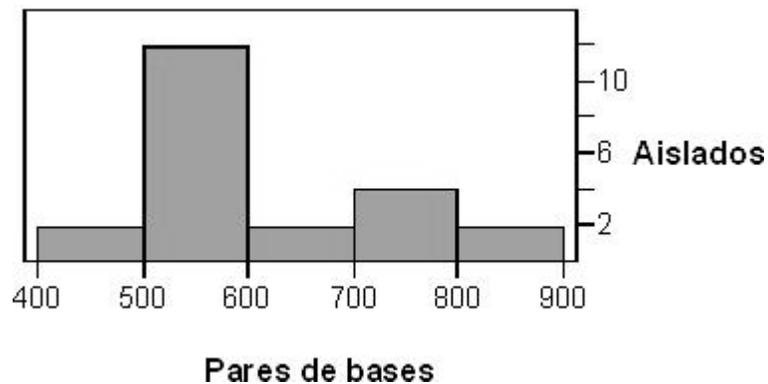
\* 523 pb  
 \*\* 883 pb  
 \*\*\* 575 pb  
 \*\*\*\* 390 pb



**Fig. 6** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 519 pb amplificado por la PCR para la especie de *C. krusei*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 7: aislados de *C. krusei*. Carril 8: Control negativo (agua).

### *C. albicans*

Los diferentes productos de amplificación de los 13 aislados de *C. albicans* se muestran en la gráfica 3, donde se observa que 8 coincidieron con un producto de amplificación del grupo V\* (Fig. 7), 1 aislado se encontró dentro del grupo I\*\*; 2 aislados, en el grupo III\*\*\*; 1 aislado, en el grupo IV\*\*\*\*; y 1 aislado, en el grupo VI\*\*\*\*\*.



**Gráfica 3.** Tamaño del producto de amplificación de PCR para los 13 aislados de *C. albicans*.

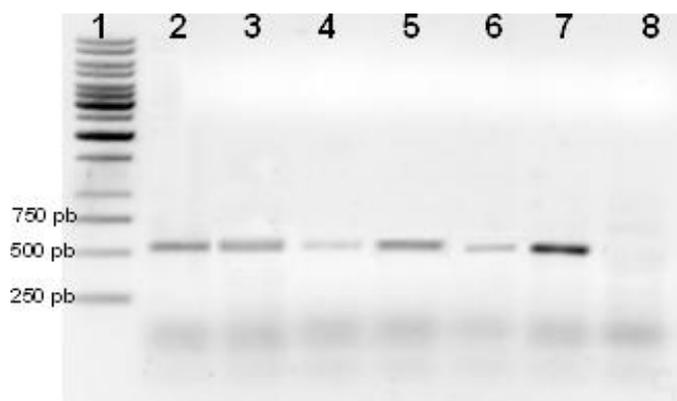
\*523 pb

\*\* 883 pb

\*\*\* 703 pb

\*\*\*\* 575 pb

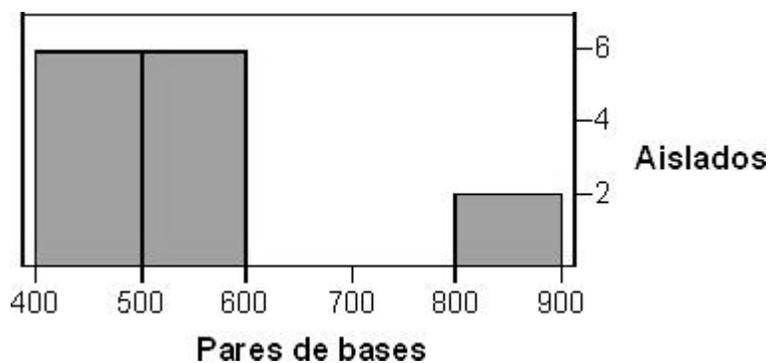
\*\*\*\*\* 442 pb



**Fig. 7** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 535 pb amplificado por la PCR para la especie de *C. albicans*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 7: aislados de *C. albicans*. Carril 8: Control negativo (agua).

### *C. zeylanoides*

Los diferentes productos de amplificación de los 7 aislados de *C. zeylanoides* se muestran en la gráfica 4, donde se observa: 1 aislado se encontró dentro del grupo I\*; 3 aislados, dentro del grupo V\*\*; y 3 aislados dentro del grupo VI\*\*\*.



**Gráfica 4.** Tamaño del producto de amplificación de PCR para los 7 aislados de *C. zeylanoides*.

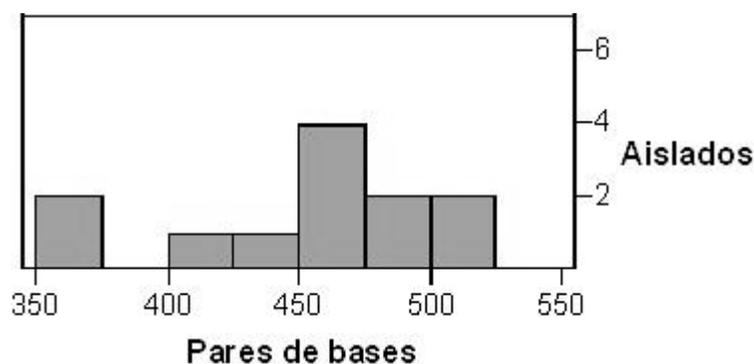
\*883 pb

\*\* 523 pb

\*\*\* 442 pb

### *C. viswanathii*

Los diferentes productos de amplificación de los 6 aislados de *C. viswanathii* se muestran en la gráfica 5: 1 aislado se encontró dentro del grupo V<sup>\*</sup>; 4 aislados, dentro del grupo VI<sup>\*\*</sup>; y 1 aislado dentro del grupo VII<sup>\*\*\*</sup>.



**Gráfica 5.** Tamaño del producto de amplificación de PCR para los 6 aislados de *C. viswanathii*.

### *C. guilliermondii*

Los 5 aislados de *C. guilliermondii* obtuvieron diferentes productos de amplificación: 1 aislado se encontró dentro del grupo I<sup>\*\*\*\*</sup>; 3 aislados, dentro del grupo V<sup>\*</sup>; y 1 aislado dentro del grupo VII<sup>\*\*\*</sup>.

### *C. kefyri*

Los 5 aislados de *C. kefyri* obtuvieron diferentes productos de amplificación: 2 coincidieron con un producto de amplificación del grupo II<sup>\*\*\*\*\*</sup> (Fig. 8), 1 aislado se encontró dentro del grupo I<sup>\*</sup> y 2 aislados, en el grupo III<sup>\*</sup>.

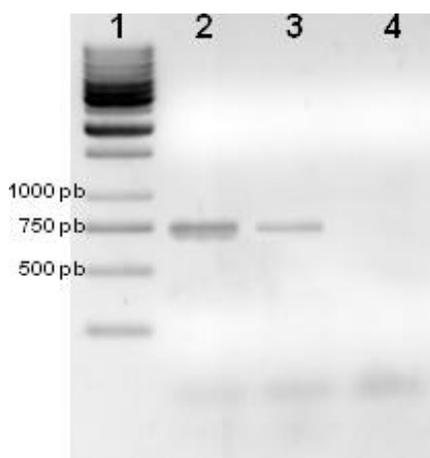
\*523 pb

\*\* 442 pb

\*\*\* 390 pb

\*\*\*\*883 pb

\*\*\*\*\* 762 pb



**Fig. 8** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 435 pb amplificado por la PCR para la especie de *C. kefyri*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 3: aislados de *C. kefyri*. Carril 4: Control negativo (agua).

### *C. norvegica*

Los 5 aislados de *C. norvegica* coincidieron con un producto de amplificación del grupo V\*\*.

### *C. tropicalis*

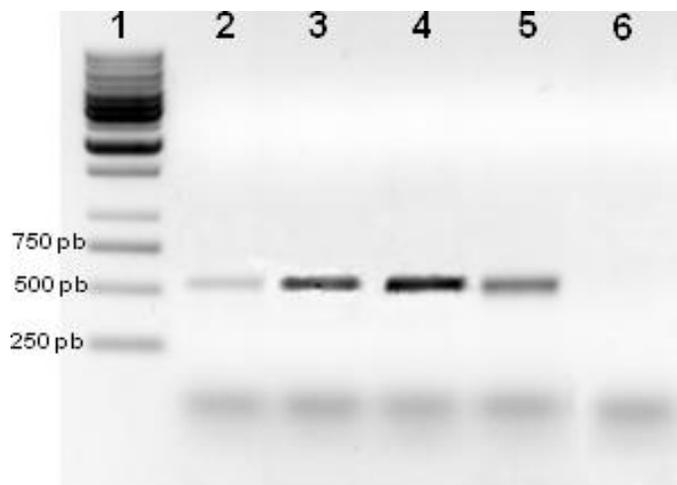
Los 5 aislados de *C. tropicalis* obtuvieron diferentes productos de amplificación: 4 coincidieron con un producto de amplificación del grupo V\*\* (Fig. 9), y 1 aislado, en el grupo VII\*\*\*.

---

\* 703 pb

\*\* 523 pb

\*\*\* 390 pb



**Fig. 9** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 515 pb amplificado por la PCR para la especie de *C. tropicalis*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 5: aislados de *C. tropicalis*. Carril 6: Control negativo (agua).

### *C. intermedia*

Los 4 aislados de *C. intermedia* obtuvieron diferentes productos de amplificación: 3 aislados se encontraron dentro del grupo I<sup>\*</sup>; y 1 aislado, dentro del grupo VII<sup>\*\*</sup>.

### *C. parapsilosis*

De los 4 aislados de *C. parapsilosis*, 2 coincidieron con un producto de amplificación del grupo V<sup>\*\*\*</sup> (Fig. 10), 1 aislado se encontró dentro del grupo IV<sup>\*\*\*\*</sup> y 1 aislado, en el grupo VI<sup>\*\*\*\*\*</sup>.

---

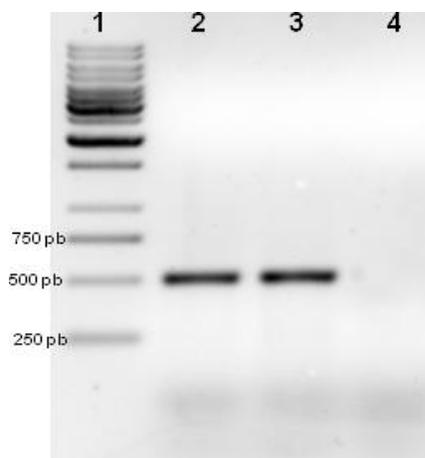
\* 883 pb

\*\* 390 pb

\*\*\* 523 pb

\*\*\*\* 575 pb

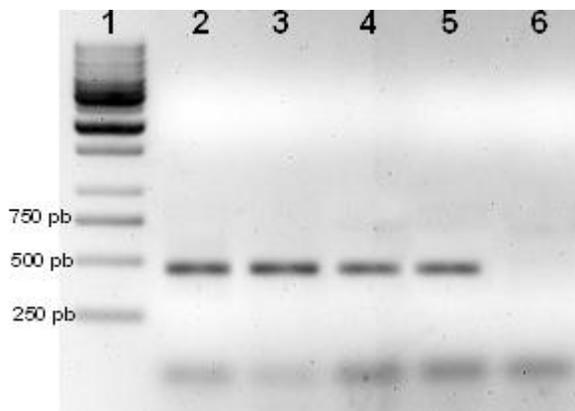
\*\*\*\*\* 442 pb



**Fig. 10** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 515 pb amplificado por la PCR para la especie de *C. parapsilosis*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 y 3: aislados de *C. parapsilosis*. Carril 5: Control negativo (agua).

### *Prototheca zopfii*

Los 4 aislados de *Prototheca zopfii* coincidieron con un producto de amplificación del grupo VI\* (Fig. 11).



**Fig. 11** Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 467 pb amplificado por la PCR para la especie de *Prototheca zopfii*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2 a 5: aislados de *Prototheca zopfii*. Carril 6: Control negativo (agua).

Los resultados de los diferentes productos de amplificación de las levaduras de las cuales se tenían de 1 a 2 aislados, identificadas como *C. brumptii*, *C. lusitaniae*,

---

\*442 pb

*C. norvegensis*, *C. sloofii*, *C. cantarelli*, *C. incommunis*, *C. firmetaria*, *C. lypolitica* y *C. macedoniensis* se muestran en la cuadro 3.

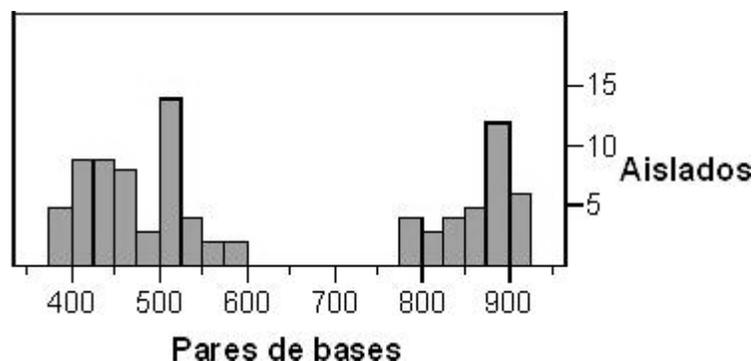
**Cuadro 3.** Grupos de los productos de amplificación de PCR de especies de *Candida* con 1 y 2 aislados.

Identificación bioquímica	Número de aislados	Grupo
<i>C. brumptii</i>	2	VI, VII
<i>C. lusitaniae</i>	2	V, VII
<i>C. norvegensis</i>	2	V, V
<i>C. sloofii</i>	2	VI, VI
<i>C. cantarelli</i>	1	VI
<i>C. incommunis</i>	1	V
<i>C. firmetaria</i>	1	V
<i>C. lypolitica</i>	1	V
<i>C. macedoniensis</i>	1	I

I. 883 pb; V. 523 pb; VI. 442 pb; VII. 390 pb

### Especies no identificadas por métodos tradicionales

Para los 45 aislados no identificados por bioquímica se obtuvieron diferentes productos de amplificación que se muestran en la gráfica 6.



**Gráfica 6.** Tamaño del producto de amplificación de PCR para los 45 aislados no identificados por bioquímica.

Los fragmentos obtenidos de los aislados identificados bioquímicamente como *C. cantarelli*, *C. firmetaria*, *C. guilliermondii*, *C. incommunis*, *C. intermedia*, *C. lypolitica*, *C. macedoniensis*, *C. norvegica*, *C. norvegensis* y *C. zeylanoides* no coincidieron con reportes previos (Esteve-Zarsozo et. al.<sup>24</sup>, Williams et. al.<sup>19,43</sup>, Korabečná et. al.<sup>8</sup>, Ferrer et. al.<sup>18</sup>, Pinto et. al.<sup>4</sup>, Cirak et. al.<sup>5</sup>, Deak et. al.<sup>50</sup>, Chen et. al.<sup>49</sup> y Fujita et.al.<sup>58</sup>), sin embargo, para *C. lusitaniae* sólo un aislado que se encontró en el grupo VII (390 pb), coincidió con lo reportado. Con respecto al tamaño de los fragmentos de *C. brumptii*, *C. sloofii* y *C. viswanathii* no se encontraron reportes previos.

### 3.3 Análisis estadístico

#### 3.3.1 Tablas de contingencias

Las tablas de contingencia se realizaron utilizando el programa JMP ver. 5.1 (SAS Institute INC. 1989-2003) para todas las especies (Cuadros 4 a 22).

## 4. DISCUSIÓN

La realización de la técnica de PCR para la identificación de levaduras obtenidas de leche de bovinos, requiere de una buena cantidad y calidad de ADN, siendo el método de Hoffman C.S. y Winston F.A. el que permitió la obtención de ADN con estas características y con un rendimiento de 3.9 µg totales, semejante a lo reportado por estos autores.<sup>51</sup> Este método a diferencia, utiliza un amortiguador de lisis que contiene reactivos de baja o nula toxicidad, además de tener un bajo costo y realizarse en dos horas.

La PCR estandarizada en este trabajo logró diferenciar de una manera rápida y precisa 7 tamaños diferentes de fragmentos amplificados de los aislados de levaduras y algas de leche de vacas, creando así los 7 grupos. Como veremos más adelante, a cada grupo correspondió una o varias especies, coincidiendo con lo reportado por Esteve-Zarsozo et. al.<sup>24</sup>, Williams et. al.<sup>19,43</sup>, Korabečná et. al.<sup>8</sup>, Ferrer et. al.<sup>18</sup>, Pinto et. al.<sup>4</sup>, Cirak et. al.<sup>5</sup>, Deak et. al.<sup>50</sup> y Fujita et.al.<sup>58</sup> (Cuadro 1).

El grupo I con 883 pb correspondió para la mayoría de los aislados (91.8%) identificados como *C. glabrata*. Esta especie posee el fragmento más grande el cual es fácil de distinguir de las demás especies, por lo que los aislados restantes con un producto de amplificación diferente a 883 pb (grupo I) no debieran ser considerados como *C. glabrata*. No se encontró ningún otro reporte de especies de *Candida* con este tamaño de fragmento, por lo que se sugiere que todos los aislados que entraron dentro del grupo I debieran ser considerados como *C. glabrata*. Este es el caso de 26 aislados identificados bioquímicamente como otra especie como son: 1 aislado de *C. krusei*, 1 aislado de *C. albicans*, 1 aislado de *zeylanoides*, 1 aislado de *C. guilliermondii*, 1 aislado de *C. kefyr*, 3 aislados de *C. intermedia*, 1 aislado de *C. macedoniensis* y 17 aislados no identificados.

---

El grupo II con 762 pb correspondió a *C. kefyr*, esta es otra especie con un fragmento de amplificación diferente a las demás. Sólo dos aislados (40%) de los 5 identificados como esta especie, obtuvo un producto de amplificación de 762 pb. Tampoco se encontró ningún otro reporte de especies de *Candida* con este tamaño de fragmento, por lo que se sugiere que todos los aislados que entraron dentro del grupo II deberían ser considerados como *C. kefyr*. Sólo 1 aislado identificado bioquímicamente como *C. glabrata* obtuvo un fragmento de 762 pb (grupo II) el cual pudiera ser *C. kefyr*.

Para el grupo III con 703 pb, sólo se encontró a *C. cantarellii* reportada por Esteve-Zarzoso et. al.<sup>24</sup> como única especie con este tamaño de fragmento, por lo que, los aislados que obtuvieron un producto de amplificación de este tamaño (703 pb) debieran ser identificados como *C. cantarelli*. Sin embargo, el único aislado identificado como *C. cantarelli* no amplificó un producto de 703 pb, así que se sugiere que este aislado no sea considerado como tal especie. Los aislados que amplificaron un fragmento del grupo III fueron los siguientes: 2 aislados identificados bioquímicamente como *C. kefyr* y 2 aislados identificados como *C. albicans*, por lo que estos 4 aislados podrían ser *C. cantarelli*.

En el grupo IV con 575 pb correspondió a *C. norvegica*,<sup>24</sup> no se encontró reportes de otra especie de *Candida* con el mismo fragmento, así que se sugiere que los aislados que amplificaron un producto de 575 pb corresponden a esta especie. Encontramos que ningún aislado identificado bioquímicamente como esta especie amplificó un producto del grupo IV. Los siguientes 6 aislados identificados bioquímicamente como otra especie las cuales amplificaron un producto del grupo IV: 3 aislados identificados bioquímicamente como *C. krusei*, 1 aislado identificado como *C. albicans*, 1 aislado como *C. parapsilosis* y 1 aislado no identificado.

Los grupos anteriores, I, II, III y IV, amplificaron un producto correspondiente a una sola especie. Con esto, podemos decir que *C. glabrata* (grupo I), *C. kefyri* (grupo II), *C. cantarelli* (grupo III) y *C. norvegica* (grupo IV) pueden fácilmente distinguirse de las demás especies utilizando únicamente la PCR con los iniciadores ITS1 e ITS4 y así poder confirmar la identificación bioquímica para estas especies. Sin embargo, como veremos más adelante, los grupos V, VI y VII corresponden a más de una especie, por lo que no es posible distinguir con certeza de que especie se trata, ya que estas especies están relacionadas filogenéticamente entre sí de una manera muy cercana<sup>56</sup> lo cual dificulta la identificación molecular usando solamente los iniciadores (ITS1 e ITS4), por lo que se deberá utilizar un método molecular adicional de identificación como es el uso de enzimas de restricción para digerir el fragmento obtenido con los iniciadores ITS1 e ITS4<sup>4,8,19,24,43,58</sup> y así poder confirmar la identificación bioquímica para estas especies.

El grupo V correspondió a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, especies que obtuvieron un fragmento de 523 pb. Este fragmento coincide con los trabajos de Williams et. al.<sup>43</sup> y Pinto et. al.<sup>4</sup> Debido a la relación filogenética que tienen estas especies no es posible distinguir una de otra, sin embargo, lo que podemos decir es que los aislados identificados bioquímicamente como estas especies que no amplificaron un producto dentro de este grupo V (523 pb) no debieran ser considerados como tales especies. Así pues el porcentaje de los aislados que amplificaron un producto de 523 pb fueron los siguientes: *C. krusei* 90.6%, *C. tropicalis* 80%, *C. albicans* 61.5% y *C. parapsilosis* 50%. Los aislados identificados bioquímicamente como otra especie pero que amplificaron un producto de 523 pb fueron las siguientes: 4 aislados como *C. glabrata*, 3 aislados como *C. zeylanoides*, 1 aislado como *C. viswanathii*, 3 aislados como *C. guilliermondii*, 2 aislados como *C. norvegensis*, 1 aislado como *C. lusitaniae*, 1 aislado como *C. incommunis*, 1 aislado

como *C. firmetaria*, 1 aislado como *C. lypolitica* y 8 aislados no identificados. Se sugiere que estos 25 aislados sean considerados para estas 4 especies.

El grupo VI con un producto amplificado de 442 pb se encontraron todos los aislados de *Prototheca zopffii* (100%) y *C. slooffii* (100%) siendo los únicos aislados con este resultado. Sin embargo, no se encontró algún reporte sobre el tamaño de fragmento con los iniciadores ITS1 e ITS4, por lo que no se sabe si este tamaño de fragmento es el que compete a *P. zopffii* y *C. slooffii*. Empero, siendo que todos los aislados pertenecientes a estas especies presentaron un tamaño de fragmento de 442 pb (grupo VI), se sugiere que es el fragmento esperado para estas especies. Pero por otro lado también existen especies de *Candida* que amplifican un producto con el mismo tamaño que son: *C. incommunis*,<sup>24</sup> *C. norvegensis*,<sup>58</sup> *C. rugosa*<sup>58</sup> y *C. firmetaria* (antes *C. lambica*.). Ninguno de los aislados identificados bioquímicamente como estas últimas especies amplificó un producto de 442 pb por lo que no debieran ser considerados como tales especies. Los aislados identificados bioquímicamente como otras especies que se encontraron dentro de este grupo fueron: 2 aislados como *C. glabrata*, 1 aislado como *C. albicans*, 3 aislados como *C. zeylanoides*, 4 como *C. viswanathii*, 1 aislado como *C. parapsilosis*, 2 aislados de *C. slooffii*, 1 aislado de *C. brumptii* y 17 aislados no identificados. Así que se sugiere que estos 31 aislados sean considerados para estas 6 especies.

*C. lypolitica*,<sup>4,24,50,58</sup> *C. intemerdia*<sup>58</sup> y *C. lusitaniae*<sup>58</sup> son especies que encontramos dentro del grupo VII (390 pb), sólo 1 aislado de *C. lusitaniae* (50%) y 1 aislado de *C. intermedia* (25%) amplificaron un producto de 390 pb. Empero, los aislados identificados bioquímicamente como otra especie pero que amplificaron un producto de 390 pb son los siguientes: 1 aislado identificado bioquímicamente como *C. krusei*, 1 aislado como *C. viswanathii*, 1 aislado de *C. guilliermondii*, 1 aislado como *C. tropicales*, 1 aislado

como *C. brumptii* y 2 aislados no identificados. Por lo que estos 7 aislados debieran ser considerados para estas 3 especies.

De los aislados identificados bioquímicamente como *C. brumptii* y *C. viswanathii*, no se encontraron reportes que indiquen el tamaño del fragmento con los iniciadores utilizados y los resultados no fueron lo suficientemente consistentes para decir que el fragmento compete a la especie identificada bioquímicamente. En *C. viswanathii* el 66% de los aislados mostraron un producto de amplificación de 442 pb (grupo VI). *C. brumptii* con sólo dos aislados tuvo un tamaño de fragmento diferente en cada uno, uno de 442 pb (grupo VI) y otro de 390 pb (grupo VII). Empero, no podemos asegurar que el fragmento que tuvo la mayoría de los aislados sea la que compete a cada especie, porque si en las especies identificadas bioquímicamente como *C. norvegica*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides* y *C. lypolitica* donde el tamaño del fragmento se distingue de las demás especies, no pudo confirmarse ningún aislado, existe la posibilidad de que ninguna de éstas especies (*C. brumptii*, y *C. viswanathii*) estén correctamente identificadas.

El uso de métodos tradicionales de identificación se han venido utilizando desde hace mucho tiempo en el laboratorio de micología de investigación o diagnóstico, sin embargo, debido a que dependen de las características fenotípicas del hongo pueden llegar a causar una identificación errónea, ya que en algunos ensayos bioquímicos la diferencia entre especies radica en una sola prueba, la cual puede verse afectado por la edad del cultivo, la temperatura y tiempo de incubación, la concentración del inóculo e inclusive el manejo de cada persona.<sup>59,60,61</sup> Y por último estos métodos tradicionales de identificación pueden tardar de 3 días hasta 3 semanas para obtener un resultado final.<sup>24,57</sup> Los métodos moleculares de identificación no poseen estos inconvenientes, son métodos más fidedignos y precisos para la discriminación de especies, que están basados en el análisis del ADN que

es estable. De ahí que el 36.46% de los aislados identificadas bioquímicamente como una especie de *Candida* no hayan coincidido con la identificación molecular para la misma. Para *P. zopfii*, *C. slooffii*, *C. glabrata* y *C. krusei*, la identificación bioquímica coincidió en un 100%, 100%, 91.8% y 93.3% respectivamente, con la identificación molecular, por lo que éstos métodos tradicionales de identificación fueron adecuados para estas cuatro especies, ya que es un porcentaje que entra en el rango (90-98%) que debe tener un buen método de identificación de acuerdo a Freydiere et.al.<sup>59</sup>

Esto no quiere decir que la identificación bioquímica sea adecuada sólo para *P. zopfii*, *C. slooffii*, *C. glabrata* y *C. krusei*. En cuanto a *C. glabrata* y *C. krusei* tal vez el número de aislados haya ayudado a mantener un bajo porcentaje de error; para *P. zopfii* siendo parte de otro reino, no posee características que competen al género *Candida* por lo que bioquímicamente es muy diferente. En el caso de *C. albicans*, debería ser difícil la inadecuada identificación utilizando métodos tradicionales, ya que esta especie posee características únicas (con excepción de *C. dubliniensis*<sup>19</sup>) como son formación del tubo germinal, formación de clamidoconidias y crecimiento a un pH de 3.5.<sup>19,23</sup> Sin embargo, encontramos un reporte de Reece et. al.<sup>62</sup> donde muestran una inadecuada identificación bioquímica de un aislado de *C. albicans*, estos autores utilizaron una PCR que identificó a este aislado como *C. tropicalis*. Coignard et. al.<sup>63</sup> también encontraron resultados similares, estos autores utilizaron sondas de ADN para identificar especies de *Candida*, donde encontraron que aislados de sangre identificados como *C. albicans* eran *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; aislados identificados como *C. glabrata* eran *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; aislados identificados como *C. parapsilosis* eran *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*; y aislados identificados como *C. glabrata* eran *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. albicans*. Así pues,

se sugiere una inadecuada identificación bioquímica para todas las demás especies a pesar de poseer características únicas como es en el caso de *C. albicans*.

Los iniciadores universales (ITS1 e ITS4) fueron utilizados en este trabajo por el número variado de especies (21 especies) obtenidas de leche de vacas, y se necesitaban iniciadores que amplificaran un producto de PCR a un amplio rango de especies, lo cual se pudo lograr.

En este trabajo *C. glabrata*, *C. cantarelli*, *C. norvegica* y *C.kefyr* pudieron ser discriminados, ya que poseen un fragmento distinto a las demás especies. En cuanto a los aislados no identificados bioquímicamente, el 48.8% pudo ser identificado con la técnica de PCR utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 como único método, y los restantes pudieron agruparse dependiendo del producto amplificado y así reducir las posibles especies a las cuales pertenecen.

Los métodos de identificación molecular para la identificación y caracterización de levaduras se están usando cada vez más ya que los resultados son más fidedignos y el tiempo de resolución es más rápido que en los métodos tradicionales de identificación, como se observó en este trabajo.

## 5. CONCLUSIONES

La técnica de PCR, utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4, confirmó la identificación bioquímica de los aislados de leche de vacas de *C. glabrata*, *C. cantarelli*, *C. norvegica* y *C. kefyr* sin utilizar otro método de identificación.

La identificación molecular coincidió, en un 100% para *P.zopfii*, en un 100% para *C. sloofii*, en un 93.3% para *C. krusei* y en un 91.8% para *C. glabrata*, con la identificación bioquímica.

Se logró la identificación, utilizando la técnica de PCR, con los iniciadores ITS1 e ITS4, del 48.8% de las especies no identificadas bioquímicamente.

Para las especies con el mismo tamaño de fragmento será necesario utilizar un método adicional, como es el uso de enzimas de restricción, para llegar a la correcta identificación.

## 6. LITERATURA CITADA

1. Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 36: 1634-1641.
2. Hungerford LL, Campbell CL, Smith A. Veterinary mycology laboratory manual. USA: Iowa University Press, 1998
3. Van Cutsem J, Rochette F. Mycoses in domestic animals. Bélgica, Janssen Research Foundation, 1991.
4. Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Ferreira JAG, Tandler M. RDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Can J Microbiol.* 2004; 50: 514-520.
5. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.* 2003; 98: 1027-1032.
6. Campos de Pinho JR, Regina GF, Augusto CR, Christine RH, Soares JH. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21: 24-28.
7. Xu J, Millar BC, Moore JE, McClurg R, Walker MJ, Evans J, Hedderwick S, McMullan R. Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* spp isolated from bloodstream infections. *J Clin Pathol.* 2002; 55: 774-777.
8. Korabečná M, Liška V, Fajfrlík K. Primers ITS1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S r RNA gene region in clinical isolates of fungi. *Folia Microbiol.* 2003; 48: 233-238.

9. Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis.* 1993; 168: 779-783.
10. De Baere T, Van Keerberghen A, Van Hauwe P, De Beenhouwer H, Boel A, Verschraegen G, Claeys G, Vaneechoutte M. An interlaboratory comparison of ITS-PCR for the identification of yeasts, using the ABI Prism 310 and CEQ8000 capillary electrophoresis systems. *BMC Microbiology.* 2005; 5: 14. Disponible en [www.biomedcentral.com/1471-2180/5/14](http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/14).
11. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts, a taxonomic study. 4a ed. The Netherlands: Elsevier Science, 1998.
12. Boldo XM, Villa-Tanaca L, Zuñiga G, Hernández-Rodríguez C. Genetic Diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4799-4804.
13. Segal E, Baum GL. Pathogenic yeasts and yeasts infections. USA: CRC Press Inc., 1994.
14. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3260-3265.
15. King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA, Merz WG. Comparison of four DNA-based methods for strain delineation of *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1467-1470.
16. Velegraki A, Kambouris ME, Skiniotis G, Savala M, Mitroussia-Ziouva A, Legakis NJ. Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immun Med Microbiol.* 1999; 23: 303-312.

17. Park, S, Wong M, Marras SAE, Cross EW, Kiehn TE, Chaturvedi V, Tyagi S, Perlin D. Rapad Identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2829-2836.
18. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(8): 2873-2879.
19. Williams DW, Coulter WA, Wilson MJ, Potts JC, Lewis MAO. Identification of *Candida dubliniensis* based on ribosomal DNA sequence analysis. *Br J Biomed Sci.* 2001; 58: 11-16.
20. Segundo ZC. Producción de anticuerpos monoclonales contra la enolasa de *Candida albicans* (tesis de maestría). DF México: ENCB.IPN. 2001.
21. Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3: 32-45.
22. Wickes BL, Hicks JB, Merz WG, Kwon-Chung KJ. The molecular analysis of synonymy among medically important yeasts within the genus *Candida*. *J General Microbiol.* 1992; 138:901-907.
23. Luna CS. Aislamiento, identificación y conservación de levaduras aisladas de leche de vacas clínicamente sanas o con mastitis clínica crónica (tesis de licenciatura). DF México: FMVZ-UNAM. 2005.
24. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP análisis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 329-337.

- 
25. Flores BJ. Seguimiento del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* (Biosaf SC47) en lechones usando la técnica de PCR en las regiones interdelta del retrotransposon Ty1/Ty2 (tesis de maestría). DF México: FMVZ-UNAM. 2004.
  26. Török T, Rockhold D, King AD. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hidridization in yeast identification. *Inter J Food Microbiol.* 1993; 19: 63-80.
  27. Guillamon JM, Barrio E, Querol A. Characterization of wine yeasts strains of *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetics and geographic origin. *Syst Appl Microbiol.* 1996; 19:122-132.
  28. Orberá OT. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21:15-19.
  29. Maiwald M, Kappe R, Sonntag HG. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. 1994; 32: 115-122.
  30. Randall KS. Amplification of genomic DNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 13-21.
  31. Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP análisis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol.* 1998; 169:387-392.
  32. Ness F, Lavallée F, Dubourdiou D, Aigle M, Dulau L. Identification of yeasts strains using the polymerase chain reaction. *J Sci Food Agric.* 1993; 62:89-94.
  33. Valente P, Gouveia FC, Lemos GA, Pimentel D, van Elsas JD, Mendonça-Hagler; Hagler AN. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiol Lett.* 1996; 137:253-256.

- 
34. Einsele H, Hebart H, Soller G, Löffler J, Rothenhöfer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 1997, 35:1353-1360.
  35. Baquero C, Mercedes M, Sentandreu R, Valentin E. Identification of *Candida albicans* by polimerase chain reaction amplification of CaYST1 gene intron fragment. *Rev Iberoam Micol.* 2002, 19:80-83.
  36. Jordan JA. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol.* 1994, 32:2962-2967.
  37. Crampin AC, Matthews RC. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. *J Med Microbiol.* 1993; 39: 1353-1360.
  38. Maneu V, Martínez J, Gozalbo D. Identification of *Candida albicans* clinical isolates by PCR amplification of an EFB1 gene fragment containing an intron-interrupted open reading frame. *Med Mycol.* 2000; 38:123-127.
  39. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. Rapid detection of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol.* 1995, 33:319-325.
  40. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol.* 2002, 40:87-109.
  41. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol.* 1994; 40:358-364.

- 
42. Reyes E, Godoy P, Fishman O, Cifuentes V. Caracterización de una levadura emergente. *Ciencia & Trabajo*. Disponible en [www.cienciaytrabajo.cl](http://www.cienciaytrabajo.cl) /Año 7/Num 16/Abril/Junio 2005/78/84.
43. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MAO, Potts JC. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenetic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*. 1995, 33:2476-2479.
44. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
45. Espinosa JC, Fernandez-Gonzalez M, Ubeda J, Briones A. Identification of wine yeasts by PCR-RFLP without previous isolation on plate. *Food Technol*. 2002; 40(2):157-160.
46. Gupta AK, Kholi Y, Summerbell RC. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(5):1869-1875.
47. Valente P, Gouveia FC, Lemos GA, Pimentel D, Mendonça-Hagler; Hagler AN. PCR-amplified ITS length variation within the yeasts genus *Metschnikowia*. *J Gen Appl Microbiol*. 1997; 43:179-181.
48. Smole Mozina S, Dlačny D, Deak T, Raspor P. Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspota* yeasts by PCR ribotyping. *Lett Appl Microbiol*. 1997; 24: 311-315.
49. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, Lafe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(6):2302-2310.

50. Deak T, Chen J, Beuchat LR. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(10):4340-4344.
51. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeasts efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 1987, 57:267-272.
52. Müller FMC, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol.* 1998, 36: 1625-1629.
53. Hernández FH, Manzano PG. Extracción de ADN. V Diplomado en Micología Médica. 2004, junio 14 a julio 9. México DF. Facultad de Medicina. UNAM.
54. Wayne WD. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. México: Limusa Wiley, 2004: 15-56.
55. Sherman F. Guide to yeasts genetics and molecular biology. New York: Academic Press, 1991: 3-21.
56. Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E. Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast.* 1993, 9:1199-1206.
57. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol.* 2002, 19:25-29.
58. Fujita S, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol.* 2001, 39:3617-3622.

59. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology*. 2001, 39: 9-33.
60. Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PHM. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2003, 41: 1357-1362.
61. Freydiere AM, Odds FC. Commercial kits for yeast identification: concerns for standardization. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis*. 2001, 20: 366-367.
62. Reece K, Smith R, Walton D, Lising M, Manry J, Bittner T, Shah K, Young S, Healy M. Molecular fingerprinting of clinical *Candida* isolates using automated rep-PCR. *Candida and Candidiasis*. 2004 Marzo 24-28. Austin, (Texas) USA. American Society of Microbiology.
63. Coignard C, Hurst SF, Benjamin LE, Brandt ME, Warnock DW, Morrison CJ. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification using DNA probes. *J Clin Microbiol*. 2004, 42: 858-861.

**CUADRO 1.** Estudios previos de autores que obtuvieron los tamaños de los productos de PCR con los iniciadores ITS1 e ITS4 de diferentes especies de *Candida* spp.

<b>ESTUDIOS PREVIOS</b>			
<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Pares de bases</b>	<b>Autor</b>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	550	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	520	Williams et.al. <sup>43</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	540	Williams et.al. <sup>19</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	536	Ferrer et.al. <sup>18</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	530	Pinto et.al. <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	520	Cirak et.al. <sup>5</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	550	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	532	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>cantarelli</i>	700	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>firmetaria</i>	434	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>firmetaria</i>	307	Chen et.al. <sup>49**</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	800	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	800	Williams et.al. <sup>43</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	820	Ferrer et.al. <sup>18</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	950	Pinto et.al. <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	800	Cirak et.al. <sup>5</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	900	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	874	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>guilliermondii</i>	600	Williams et.al. <sup>43</sup>
<i>Candida</i>	<i>guilliermondii</i>	630	Pinto et.al. <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>guilliermondii</i>	625	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>guilliermondii</i>	603	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>incommunis</i>	425	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>intermedia</i> var. <i>Intermedia</i>	425	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>intermedia</i>	386	Fujita et.al. <sup>58</sup>

Continuación del Cuadro 1.

<b>ESTUDIOS PREVIOS</b>			
<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Pares de bases</b>	<b>Autor</b>
<i>Candida</i>	<i>kefyr</i>	750	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>kefyr</i>	722	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	520	Williams et.al. <sup>43</sup>
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	510	Ferrer et.al. <sup>18</sup>
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	520	Cirak et.al. <sup>5</sup>
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	530	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	500	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	350	Pinto et.al. <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	350	Deak et.al. <sup>50</sup>
<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	380	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	450	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	359	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>lusitaniae</i>	375	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>lusitaniae</i>	255	Chen et.al. <sup>49**</sup>
<i>Candida</i>	<i>norvegica</i>	580	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>norvegensis</i>	482	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	550	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	520	Williams et.al. <sup>43</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	520	Ferrer et.al. <sup>18</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	530	Pinto et.al. <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	520	Cirak et.al. <sup>5</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	550	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	516	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>stellatoidea</i>	520	Williams et.al. <sup>43</sup>
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	550	Esteve-Zarzoso
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	530	Pinto et.al. <sup>4</sup>
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	550	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	521	Fujita et.al. <sup>58</sup>
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	620	Esteve-Zarzoso et.al. <sup>24</sup>
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	650	Deak et.al. <sup>50</sup>
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	600	Korabečná et.al. <sup>8</sup>
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	621	Fujita et.al. <sup>58</sup>

**CUADRO 4.** Tabla de contingencia de *C. albicans*.

	<b>Grupo 1</b> n=1	<b>Grupo 3</b> n=2	<b>Grupo 4</b> n=1	<b>Grupo 5</b> n=8	<b>Grupo 6</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 7.69%	2 15.39%	1 7.69%	0 0.00	1 7.69%	5 38.46%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00%	0 0.00%	0 0.00%	8 61.54%	0 0.00%	8 61.54%
<b>TOTAL</b>	1 7.69%	2 15.39%	1 7.69%	8 61.54%	1 7.69%	13 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 5.** Tabla de contingencia de *C. cantarelli*.

	<b>Grupo 6</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 100.00%	1 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 100.00%	1 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 6.** Tabla de contingencia de *C. glabrata*.

	<b>Grupo 1</b> n=79	<b>Grupo 2</b> n=1	<b>Grupo 5</b> n=4	<b>Grupo 6</b> n=2	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00%	1 1.16%	4 4.65%	2 2.33%	7 8.14%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	79 91.86%	0 0.00%	0 0.00%	0 0.00%	79 91.86%
<b>TOTAL</b>	79 91.86%	1 1.16%	4 4.65%	2 2.33%	86 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 7.** Tabla de contingencia de *C. guilliermondii*.

	<b>Grupo 1</b> n=1	<b>Grupo 5</b> n=3	<b>Grupo 7</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 20.00%	3 60.00%	1 20.00%	5 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 20.00%	3 60.00%	1 20.00%	5 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 8.** Tabla de contingencia de *C. incommunis*.

	<b>Grupo 5</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 100.00%	1 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 100.00%	1 100.00%

n=número de aislados

**CUADRO 9.** Tabla de contingencia de *C. intermedia*.

	<b>Grupo 1</b> n=3	<b>Grupo 7</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	3 75.00%	1 25.00%	4 100.00%
<b>TOTAL</b>	3 75.00%	1 25.00%	4 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 10.** Tabla de contingencia de *C. kefyri*.

	<b>Grupo 1</b> n=1	<b>Grupo 2</b> n=2	<b>Grupo 3</b> n=2	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 20.00%	0 0.00%	2 40.00%	3 60.00%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00%	2 40.00%	0 0.00%	2 40.00%
<b>TOTAL</b>	1 20.00%	2 40.00%	2 40.00%	5 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 11.** Tabla de contingencia de *C. krusei*.

	<b>Grupo 1</b> n=1	<b>Grupo 4</b> n=3	<b>Grupo 5</b> n=70	<b>Grupo 7</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 1.33%	3 4.00%	0 0.00%	1 1.33%	5 6.66%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00	0 0.00	70 93.34	0 0.00	70 93.34%
<b>TOTAL</b>	1 1.33%	3 4.00%	70 93.34%	1 1.33%	75 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 12.** Tabla de contingencia de *C. firmetaria*.

	<b>Grupo 5</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 100.00%	1 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 100.00%	1 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 13.** Tabla de contingencia de *C. lypholitica*.

	<b>Grupo 5</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 100.00%	1 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 100.00%	1 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 14.** Tabla de contingencia de *C. lusitanae*.

	<b>Grupo 5</b> n= 1	<b>Grupo 7</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 50.00%	0 0.00%	1 50.00%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00%	1 50.00%	1 50.00%
<b>TOTAL</b>	1 50.00%	1 50.00%	2 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 15.** Tabla de contingencia de *C. macedoniensis*.

	<b>Grupo 1</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 100.00%	1 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 100.00%	1 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 16.** Tabla de contingencia de *C. norvegensis*.

	<b>Grupo 5</b> n=2	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	2 100.00%	2 100.00%
<b>TOTAL</b>	2 100.00%	2 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 17.** Tabla de contingencia de *C. norvegica*.

	<b>Grupo 5</b> n=5	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	5 100.00%	5 100.00%
<b>TOTAL</b>	5 100.00%	5 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 18.** Tabla de contingencia de *C. parapsilosis*.

	<b>Grupo 4</b> n=2	<b>Grupo 5</b> n=2	<b>Grupo 6</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	2 50.00%	0 0.00%	1 25.00%	3 75.00%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00%	2 25.00%	0 0.00%	1 25.00%
<b>TOTAL</b>	2 50.00%	1 25.00%	1 25.00%	4 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 19.** Tabla de contingencia de *C. tropicalis*.

	<b>Grupo 5</b> n=4	<b>Grupo 7</b> n=1	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	0 0.00%	1 20.00%	1 20.00%
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	4 80.00	0 0.00	4 80.00%
<b>TOTAL</b>	4 80.00%	1 20.00%	5 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 20.** Tabla de contingencia de *C. zeylanoides*.

	<b>Grupo 1</b> n=1	<b>Grupo 5</b> n=3	<b>Grupo 6</b> n=3	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	1 14.29%	3 42.86%	3 42.86%	7 100.00%
<b>TOTAL</b>	1 14.29%	3 42.86%	3 42.86%	7 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 21.** Tabla de contingencia de *P. zopfii*.

	<b>Grupo 6</b> n=4	
<b>Aislados que coincidieron con la identificación bioquímica</b>	4 100.00%	4 100.00%
<b>TOTAL</b>	4 100.00%	4 100.00%

n = número de aislados

**CUADRO 22.** Tabla de contingencia de especies no identificadas.

	<b>Grupo 1</b> n=17	<b>Grupo 3</b> n=4	<b>Grupo 4</b> n=1	<b>Grupo 5</b> n=8	<b>Grupo 6</b> n=13	<b>Grupo 7</b> n=2	
<b>Aislados que NO coincidieron con la identificación bioquímica</b>	17 37.78%	4 8.89%	1 2.22%	8 17.78%	13 28.89%	2 4.44%	45 100.00%
<b>TOTAL</b>	17 37.78%	4 8.89%	1 2.22%	8 17.78%	13 28.89%	2 4.44%	45 100.00%

n = número de aislados