



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E**  
**INVESTIGACIÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CANDIDA* MEDIANTE LA  
PRUEBA MOLECULAR "POLIMORFISMO DEL DNA  
AMPLIFICADO AL AZAR-REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA" (RAPD-PCR),  
EN UNA POBLACIÓN MEXICANA

**T E S I S**

**QUE PRESENTA**

**ALMA LAURA BAIRES VÁRGUEZ**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

TUTOR: DR. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA  
ASESOR: CÉSAR HUGO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

**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.

**"Tened paciencia y tendréis ciencia"**  
**Baltasar Gracián**

**"No menos que el saber me place el dudar"**  
**Demófilo**

## Agradecimientos

A mi familia, motor de mi vida:  
Ma. del Carmen Vázquez Sánchez, Ricardo Baires  
Vázquez, Aída Y. Baires Vázquez, Rocío Baires Vázquez,  
Alejandro R. Baires Vázquez,  
Ofelia Ginéz Camacho, Paulina G. Baires Martínez,  
Cristian Baires Ginéz, Frida X. Baires Ginéz

A mi hija:  
Fabiola García Baires, gracias por tu infinita paciencia, por todo tu apoyo, por tu amor

A mis amigos y amigas, por acompañarme en los momentos más gratos y en los  
desafiantes:  
C.D. E.E. Carlos Tinajero Morales, C.D. Rosalba A. Santabalbina Venegas, C.D. Leonor  
Rodríguez Minor, M. en C. Sergio Sánchez García, Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas,  
Ing. Francisco Peñalba Rosales, Leticia Jardón Barrañón, Pilar Tappan Esquivel

A James R. Lombard:  
Jim, gracias por tu amor, calidez y frescura

A mi tutor Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda:  
Dr. gracias por creer en mi y por todo el apoyo que me brindó durante la realización de  
mis estudios de maestría

Al Dr. César Hugo Hernández Rodríguez y a la Dra. Lourdes Villa Tanaca:  
Gracias por abrirme las puertas del Instituto Politécnico Nacional y por ser el principal  
vehículo para la cristalización de mis objetivos; gracias por su calidez y paciencia

A la Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie:  
Gracias por el tiempo y dedicación que me brindó en la revisión del presente trabajo;  
indudablemente sus conocimientos y experiencia enriquecieron el presente trabajo

De manera especial deseo agradecer a mis profesores y autoridades de la División de  
Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, por la dedicación y  
sensibilidad con la que día a día realizan sus labores académico universitarias en  
beneficio de nuestra superación.

Gracias a mi Alma Mater, Universidad Nacional Autónoma de México

<b>I. RESUMEN</b> .....	3
<b>II. ABSTRACT</b> .....	4
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
III.1 Infecciones fúngicas .....	5
III.2 Candidosis .....	7
III.3 <i>Candida albicans</i> .....	9
III.3.1 Taxonomía .....	9
III.3.2 Metabolismo celular .....	19
III.3.3 Composición de la pared celular .....	20
III.3.4 Factores de virulencia .....	25
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	30
IV.1 Métodos de identificación en <i>Candida</i> spp. ....	30
IV.2 Cultivo .....	31
IV.3 Técnicas microscópicas .....	32
IV.4 Tubo germinativo .....	32
IV.5 Métodos enzimáticos .....	33
IV.6 Métodos de aglutinación .....	37
IV.7 Pruebas bioquímicas .....	37
IV.8 Pruebas moleculares .....	40
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	47
V.1 Objetivo general .....	47
V.2 Objetivos específicos .....	47
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	49
<b>VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	50
<b>VIII. JUSTIFICACIÓN</b> .....	53
<b>IX. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	56
IX.1 Tipo de estudio .....	56
IX.2 Población de estudio y muestra .....	56
IX.3 Tipo de muestra .....	56
IX.4 Tamaño de muestra .....	56
IX.5 Variables .....	57
IX.5.1 Independiente .....	57
IX.5.2 Dependiente .....	57
IX.6 Metodología .....	57
IX.6.1 Microorganismos .....	57
IX.6.2 Conservación de las cepas .....	58
IX.6.3 Medios de cultivo .....	58
IX.6.4 Identificación de las cepas aisladas de <i>Candida</i> .....	59
IX.6.4.1 Formación de clamidoconidios .....	60
IX.6.4.2 Formación de tubo germinativo .....	60
IX.6.5 Técnicas de manipulación de DNA .....	61
IX.6.6 Polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD) .....	61
IX.6.7 Electroforesis .....	62
IX.7 Análisis estadístico .....	63
<b>X. RESULTADOS</b> .....	67
<b>XI. DISCUSIÓN</b> .....	76
<b>XII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	88

# I. RESUMEN

Se han desarrollado numerosos métodos para diferenciar especies de *Candida* que incluyen sistemas comerciales tales como API 20C y ID 32C. Diversos estudios han propuesto que la prueba molecular del polimorfismo del DNA amplificado al azar-Reacción en cadena de la polimerasa, (RAPD-PCR), podría ser usada directamente como una herramienta fácil y segura para la identificación de diversas especies patógenas. Probamos la sensibilidad y especificidad de la prueba molecular (RAPD-PCR) con el primer OPE-18) y comparamos la prueba bioquímica (ID 32C). Adicionalmente, se comparó la identificación de *Candida albicans* con las pruebas biológicas (producción de tubo germinativo y formación de clamidoconidios) para determinar su sensibilidad y especificidad, así como sus valores predictivos. Un total de 92 aislamientos (20 *C. albicans*, 14 *C. glabrata*, 15 *C. tropicalis*, 11 *C. lusitaniae*, 10 *C. guilliermondii*, 5 *C. parapsilosis*, 7 *C. krusei*, 1 *C. pelliculosa*, 2 *C. rugosa* y 7 *C. kefyr*) fueron obtenidas de diferentes sitios clínicos y analizadas. Además, se incluyeron 7 cepas de referencia.

Los patrones obtenidos con la prueba molecular RAPD-PCR y el primer OPE-18 para la identificación de aislamientos clínicos, fueron consistentes y los diferentes ensayos independientes revelaron reproducibilidad de las bandas. El RAPD-PCR con el primer OPE-18 es un método muy específico y sensible para la identificación de especies de *Candida* patógenas incluidas *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. kefyr* y *C. lusitaniae*.

## II. ABSTRACT

Numerous methods developed to differentiate species of *Candida* include test kits, such as the API 20C or ID 32C yeast identification systems. Several studies have proposed that randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis could be directly used as an easy secure tool for the identification of several pathogenic species.

We assessed the sensitivity of the molecular test (RAPD with the primer OPE-18) and compared to the biochemical test ID 32C system). Additionally identification of *C. albicans* was compared with the biological test (germ tube test and chlamydospore production), to determine its sensitivity and specificity, as well as its predictive values, were performed. A total of 92 isolates (20 *C. albicans*, 14 *Candida glabrata*, 15 *C. tropicalis*, 11 *C. lusitaniae*, 10 *C. guilliermondii*, 5 *C. parapsilosis*, 7 *C. krusei*, 1 *C. pelliculosa*, 2 *C. rugosa* and 7 *C. kefyr*) obtained from different clinical sites were analyzed. In addition, 7 reference strains were included.

The RAPD-PCR patterns obtained with the primer OPE-18 for the identification of clinical isolates were consistent, and the different independent assays revealed reproducibility of the band patterns. The RAPD-PCR with the OPE-18 primer is a very specific and sensitive method for the identification of important pathogenic *Candida* species including *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. kefyr* and *C. lusitaniae*.

# III. INTRODUCCIÓN

## III.1 INFECCIONES FÚNGICAS

En recientes años, la frecuencia de infecciones fúngicas ha aumentado constantemente. Aunque estas infecciones en general son menos frecuentes que las bacterianas, por lo menos dos aspectos las hacen cada vez más importantes: Primero, las infecciones oportunistas en hospederos inmunocomprometidos representan cada vez más una causa común de mortalidad y morbilidad. Algunos factores han contribuido a este aumento en infecciones oportunistas: La expansión de trastornos severos en poblaciones con inmunocompromiso tales como bajo peso al nacer, número creciente de pacientes con la infección del virus de la inmunodeficiencia humana, neutropenia inducida por terapia prolongada y profunda con quimioterapia, inmunosupresión post trasplante o quemaduras severas, incremento en procedimientos médicos invasivos tales como cirugía extensiva y el uso creciente de dispositivos protésicos y catéteres vasculares junto con tratamiento a base de corticoesteroides y antimicrobianos de amplio espectro. La segunda razón que fundamenta el aumento de infecciones por *C. albicans* es que, aunque muchos compuestos antifúngicos se encuentran en el mercado, estas drogas son a veces limitadas en su uso debido a su toxicidad y efectos colaterales. Los agentes antifúngicos disponibles

actualmente son pocos y pertenecen sólo a un limitado número de diferentes clases químicas. Una razón para este progreso lento es que, como las células de mamíferos, los hongos son eucariotas y por lo tanto, los agentes que inhiben la síntesis de proteínas, de RNA y DNA, tienen un gran potencial de toxicidad [De Backer et al, 2000].

Un problema adicional que empezó a surgir aproximadamente hace 9 años, es la resistencia a los antifúngicos en la clínica [Siegman-Igra & Rabaw, 1992; Boschman et al, 1998]. La utilidad de los azoles (itraconazol y fluconazol como representantes típicos), los cuales son en este momento las drogas antifúngicas de elección, han disminuido en recientes años debido al incremento en la incidencia de resistencia, un complejo fenómeno que involucra algunos mecanismos moleculares [Rex et al, 1995].

En el siglo quinto a.C., Hipócrates describió el algodoncillo, y al hacerlo, fue el primero en describir una infección fúngica. Desde entonces, se ha probado que el agente etiológico primario del algodoncillo, *C. albicans*, es la causa de muchas formas de enfermedad, algunas de las cuales ponen en riesgo la vida humana. *C. albicans* es la levadura más frecuentemente aislada asociada con infecciones humanas [Hazen, 1995].

## III.2 CANDIDOSIS

Las infecciones causadas por *Candida* spp. son denominadas candidosis o candidiasis, términos usados en la literatura como sinónimos. La Sociedad Internacional para la Micología Humana y Animal ha sugerido el término "candidosis" [Odds et al, 1992], mientras que el Consejo Internacional para la Organización de las Ciencias Médicas recomienda "candidiasis" [CIOMS, 1982].

Algunos factores tales como la virulencia, resistencia del hospedero y varios factores ambientales incluyendo el consumo de carbohidratos y el uso de drogas antimicrobianas [Scully et al, 1994], influyen el riesgo para el desarrollo de candidosis [Samaranayake, 1990]. A pesar del intenso trabajo de investigación, no se ha encontrado un factor único de virulencia que cause candidosis [Cutler, 1991; Odds, 1994]. Más bien una combinación de factores de virulencia tales como adhesinas, rápido cambio fenotípico, crecimiento filamentoso y secreción de enzimas hidrolíticas, parecen ser los responsables del desarrollo de candidosis, puesto que diferentes estados de candidosis expresan diferentes factores de virulencia [Cutler, 1991].

Existe una asociación entre la candidosis y enfermedades que inducen la supresión de las defensas del hospedero tanto sistémicas

como locales [Lamey & Samaranayake, 1988]. Por ejemplo, en desórdenes endocrinos con inmunocompromiso, incluyendo la diabetes mellitus, se incrementa la probabilidad de desarrollar candidosis [Dorocka-Bobkowska et al, 1996]. En enfermedades malignas sin terapia la incidencia de candidosis es mayor que en sujetos sanos [Scully et al, 1994]. Las terapias inmunosupresiva y corticoesteroides disminuyen las defensas del hospedero contra infecciones microbianas y a candidosis [Odds, 1994] y el uso de antimicrobianos de amplio espectro suprime la competencia de la microbiota bacteriana nativa [Seelig, 1966], predisponiendo al hospedero a un sobre crecimiento de *Candida* y subsecuentemente al desarrollo de candidosis. En hospederos inmunocomprometidos, la candidosis puede desarrollarse como una infección endógena [Powderly et al, 1993; Voss et al, 1994] pero también puede deberse a la sustitución de cepas comensales por nuevos microorganismos invasores [Powderly et al, 1993; Schmid et al, 1992]. Asimismo, la alteración del estado nutricional del sujeto, incluyendo deficiencia de hierro [Higgs, 1973; Fletcher et al, 1975] y deficiencia de folato [Samaranayake & MacFarlane, 1981], están asociados a candidosis.

*C. albicans* y especies relacionadas son patógenos oportunistas que viven como comensales en una variedad de áreas corporales, con la capacidad de infectar tejidos como respuesta a un cambio en la fisiología

del hospedero. En el estado comensal, *Candida* spp. es parte de la microbiota de sujetos sanos. *Candida* spp. es ubicuo en la cavidad bucal, el tracto gastrointestinal, ano e ingles de individuos sanos y también del canal vaginal y vulva de mujeres sanas. *Candida* spp. también coloniza una gran cantidad de individuos sanos y puede alcanzar sorpresivamente altas densidades sin la manifestación de síntomas de enfermedad. *C. albicans* ha sido descrita como la especie predominante (~70%) y *C. glabrata* y *C. tropicalis* las segundas más frecuentes (~7% cada una) [Odds, 1987]. El rango de frecuencias reportado en los diferentes estudios de comensalismo en áreas específicas corporales fue extremadamente amplio. Estos estudios demostraron que la cavidad bucal fue el área corporal más frecuentemente colonizada, seguida del área vulvo-vaginal [Lockhart et al, 1997; Marco et al, 1999].

### **III.3 *Candida albicans***

#### **III.3.1 Taxonomía**

Los hongos son un grupo numeroso de organismos clasificados en Reino Fungi perteneciente al dominio Eukarya. El Reino Fungi incluye desde los conspicuos champiñones hasta muchas formas microscópicas tales como los mohos y las levaduras. Se han descrito 70,000 especies y posiblemente en la actualidad existan 1.5 millones de especies esperando a ser identificadas y descritas [Hawksworth, 1997].

El reino *Fungi*, el cual constituye uno de los siete reinos [Corliss, 1992], ha sufrido cambios sustanciales en el arreglo de varias jerarquías taxonómicas, especialmente con técnicas de comparación de características moleculares tales como RNA ribosomal y DNA. Actualmente, los hongos son ubicados en tres reinos: *Chromista*, *Fungi* y *Protozoa* [Hawksworth, 1997] (Fig.1).

### ***Chromista***

Este reino es llamado algunas veces *Heterokonta*, contiene predominantemente organismos unicelulares, filamentosos y fotosintéticos, cuya pared celular carece de quitina y  $\beta$ -glucanas pero contiene celulosa; muchos *chromistas* son de vida libre y fotosintéticos; el reino incluye algas doradas y cafés y diatomeas, entre otros. Corliss en 1994 [Corliss, 1992], aceptó 10 phyla en el reino. Solo dos hongos del reino *Chromista* son de importancia médica: *Pythium insidiosum* y *Rhinosporidium seeberi*.

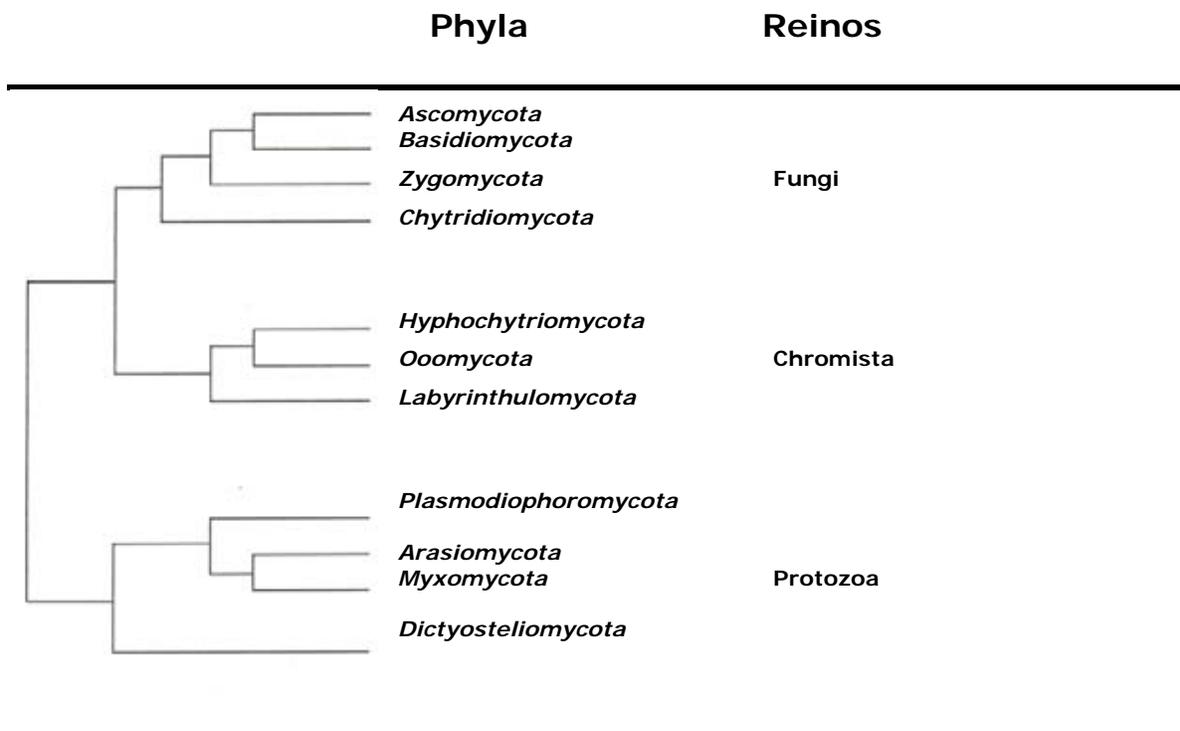


Fig. 1. Esquema de las relaciones entre los diferentes phyla de hongos, basadas sobre la evidencia de rRNA disponible (tomado de *Medical Mycology*, vol. 4, 9ª ed., Ed. Arnold, Gran Bretaña, 1998).

### *Fungi*

Los organismos que pertenecen a los hongos verdaderos, son llamados por algunos investigadores como *Eumycota*, son no fotosintéticos, obtienen nutrientes por absorción; su pared celular contiene quitina y  $\beta$ -glucanas; son unicelulares o filamentosos; son saprobios, mutualistas o parásitos. Muchos están íntimamente asociados con organismos particulares en relaciones obligadas, incluyendo plantas, otros hongos, algas y cianobacterias (especialmente líquenes), insectos y muchos vertebrados (incluyendo al hombre). Casi todos los hongos de importancia médica pertenecen a este reino [Hawksworth, 1997].

### ***Protozoa***

Los miembros de este reino se distinguen por ser unicelulares, plasmodiales y fagotróficos; carecen de una pared celular verdadera; algunas especies contienen cloroplastos y son fotosintéticos. Las especies son principalmente mutualistas y parásitos microscópicos.

Sería importante mencionar que *Pneumocystis carinii*, un organismo responsable de la muerte de muchas víctimas del SIDA, fue considerado alguna vez protozoario. Sin embargo, información molecular contundente ha demostrado que este organismo pertenece al reino *Fungi*, donde ocupa una posición basal cercana a la división entre la *Ascomycota* y la *Basidiomycota* [Corliss, 1992].

En la actualidad, existe un acuerdo casi total entre los micólogos para aceptar la existencia de cuatro divisiones (phyla) en el reino *Fungi*: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota*, sistema que ha sido adoptado en la nueva edición del *Diccionario de los Hongos* [Hawksworth, 1997] (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificaciones de los hongos utilizadas en las dos últimas décadas

<b>FUNGI<sup>a</sup></b>	<b>MYCOTA<sup>b</sup></b>	<b>EUMYCOTA<sup>c</sup></b>	<b>PROTOZOA<sup>d</sup></b>
<b>Myxomycota</b>	<b>Myxomycota</b>	Basidiomycota	Acrasiomycota
Acrasiomycetes	Acrasiomycetes	Ascomycota	Dictyosteliomycota
(Labyrinthuales)	Plasmodiophoromycetes	Zycomycota	Myxomycota
Myxomycetes	Labyrinthulomycetes	Chytridiomycota	<i>Myxomycetes</i>
Plasmodiophoromycetes	<b>Oomycota</b>	<b>CHROMISTA<sup>c</sup></b>	<i>Protosteliomycetes</i>
<b>Eumycota</b>	Oomycetes	Heterokonta	Plasmodiophoromycota
<b>Mastigomycotina</b>	Hyphochytriomycetes	<i>Pseudomycotina</i>	<b>CHROMISTA<sup>d</sup></b>
Chytridiomycetes	<b>Chytridiomycota</b>	<i>Oomycetes</i>	Hyphochytriomycota
Hypochytriomycetes	Chytridiomycetes	<i>Hyphochytriomycetes</i>	Labyrinthulomycota
Oomycetes	<b>Eu-Mycota</b>	<i>Labyrinthista</i>	Oomycota
<b>Zygomycotina</b>	Zigomycetes	<i>Labyrinthulea</i>	<b>FUNGI<sup>d</sup></b>
Zygomycetes	Endomycetes	<b>PROTOZOA<sup>c</sup></b>	Ascomycota
Trichomycetes	Ustomycetes	Myxomycota	Basidiomycota
<b>Ascomycotina</b>	Ascomycetes	Plasmodiophoromycota	<i>Basidiomycetes</i>
Hemiascomycetes	Basidiomycetes		<i>Teliomycetes</i>
Plectomycetes	Deuteromycetes		<i>Ustomycetes</i>
Discomycetes			Chytridiomycota
Pyrenomycetes			Zygomycota
Loculoascomycetes			<i>Trichomycetes</i>
Laboulbeniomycetes			<i>Zygomycetes</i>
<b>Basidiomycotina</b>			
Teliomycetes			
Hymenomycetes			
Gasteromycetes			
<b>Deuteromycotina</b>			
Blastomycetes			
Hyphomycetes			
Coelomycetes			

Nota: El Reino aparece en negritas y mayúsculas; phyla termina en –mycota; subphyla en –mycotina; clases en –mycetes; subclases en –mycetidae.

Tomado de: <sup>a</sup>Ainsworth, Sparrow and Sussman (1973). <sup>b</sup>von Arx (1981). <sup>c</sup>Barr (1992). <sup>d</sup>Hawksworth et al (1995).

Las cuatro divisiones contempladas en el reino Fungi (Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota) son principalmente caracterizadas por diferentes métodos de reproducción. El concepto más importante recientemente desarrollado en la clasificación ha sido el total rechazo sobre cualquier unidad formal de clasificación para numerosos hongos que no tienen una fase sexual conocida y que se reproducen mediante ciclos asexuales. Estos hongos fueron incluidos en la categoría *Deuteromycotina*, *Deuteromycetes* o *Fungi Imperfecti* en clasificaciones propuestas durante la década de los noventa e incluía las clases *Coelomycetes* (formadores de esporas en estructuras

especializadas), *Hyphomycetes* (formadores de esporas no surgidas dentro de estructuras discretas) y *Agonomycetes* (no formadores de esporas). Con el incremento en la información ultraestructural sobre la pared celular y los septos, y más recientemente en base a la información de las secuencias moleculares, se ha aclarado que los hongos asexuales pueden ser ubicados con toda seguridad en una de las cuatro divisiones (Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota) en ausencia de la fase sexual [Guarro et al, 1999], y que es completamente inaceptable llamarlos como si constituyeran un taxón principal separado de alto nivel [Collier et al, 1998]. Es más apropiado referirse a estos hongos simplemente como 'mitospóricos' reflejando con esto que carecen de un estado meiótico [Hull et al, 2000].

*C. albicans*, una levadura diploide, ha sido clasificada como asexual porque no se han reportado observaciones directas de apareamiento o meiosis. Estudios poblacionales en *C. albicans* indican que puede ocurrir un bajo nivel de intercambio genético, pero no existe evidencia concluyente de recombinación sexual. La aparente ausencia de reproducción sexual en *C. albicans* es especialmente intrigante porque sus parientes en la familia de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*) han retenido ciclos sexuales. De

hecho la reproducción sexual es común en todo el reino fungi, desde las levaduras hasta los champiñones. Aunque el apareamiento y la meiosis no han sido observadas en *C. albicans*, genes homólogos que funcionan tanto en el apareamiento (GPA1, STE20 y STE6) como en la meiosis (DMC1) en *Saccharomyces cerevisiae* han sido identificados en *C. albicans*. El rango completo de las funciones de estos genes en *C. albicans* no ha sido determinado, pero su presencia sugiere que esta levadura tiene un ciclo sexual críptico o que carece de ciclo sexual y los productos de estos genes han sido elegidos para diferentes propósitos [Odds et al, 1988].

En tratados antiguos de taxonomía, las especies del género *Candida* que carecían de una fase sexual (teleomorfa) fueron designados Deuteromycetes, la clase de hongos que no se reproducen sexualmente. En la actualidad, se han descrito las fases teleomorfas de algunas especies de *Candida* tanto patógenas como no patógenas (tabla 2), pero por razones de familiaridad, estos organismos (especialmente los patógenos) han retenido su designación como especies de *Candida*.

**Tabla 2. Lista parcial de especies patógenas de *Candida***

Reportada en 1988	Lista actual	Estado teleomorfo (sexual)
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	No descrito
<i>C. tropicales</i>	<i>C. tropicales</i>	No descrito
<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	No descrito
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	No descrito
<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>C. viswanathii</i>	<i>C. viswanathii</i>	No descrito
	<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
	<i>C. dubliniensis</i>	No descrito
	<i>C. famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	<i>C. inconspicua</i>	No descrito
	<i>C. utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>

Tomado de Odds, 1988.

En la tabla 3, se ilustra un esquema actual sobre la taxonomía de *Candida* en estado anamórfico (asexual) y su fase teleomórfica (sexual), así como la de *Sacharomyces*, hongo emparentado muy cercanamente con *Candida*.

**Tabla 3. Clasificación de *Candida* en estado anamórfico y teleomórfico y *Sacharomyces***

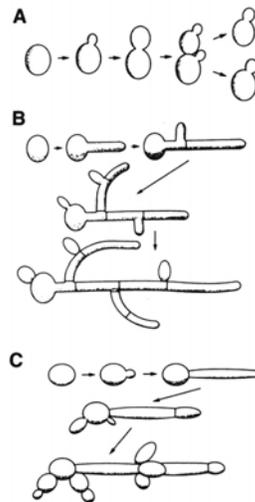

---

<b>Phylum:</b> Ascomycota
<b>Clase:</b> Hemyascomycetes
<b>Orden:</b> Saccharomycetales
<b>Familia:</b> Metschnikowiaceae
<b>Género:</b> Clavispora
<b>Familia:</b> Saccharomycetaeae
<b>Género:</b> <i>Debaryomyces</i>
<i>Issatchenkia</i>
<i>Pichia</i>
<i>Kluyveromyces</i>
<i>Sacharomyces</i>
<b>Familia:</b> Candidaceae (anamórfico)
<b>Género:</b> <i>Candida</i>

---

Tomado de Calderone, 2002

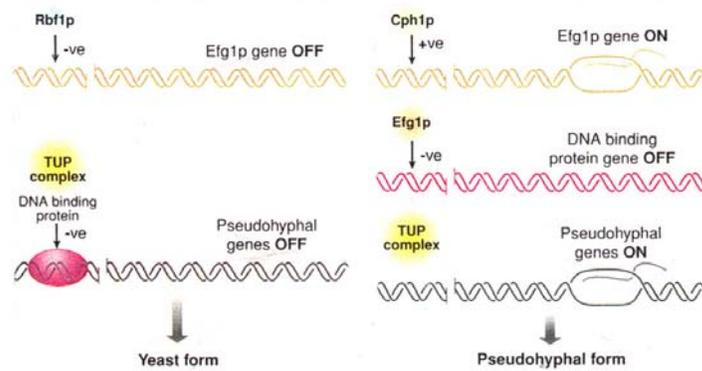
El género *Candida* comprende más de 150 especies [Odds, 1987] los cuales característicamente son levaduras asporógenas capaces de formar pseudohifas. Las especies del género *Candida* se caracterizan primariamente por su morfología colonial, asimilación de carbono y su capacidad fermentativa. Crecen bien en un rango de temperatura que, dependiendo de la especie, va de 20°C a 38°C [Arendorf & Walker, 1979] y dentro de un rango de pH que fluctúa entre 2.5 a 7.5 [Odds, 1987; Arendorf & Walker, 1979], aunque a bajo pH [Odds, 1980] inclusive por debajo de pH 2 [Corner & Magee, 1997] se favorece especialmente su proliferación. *C. albicans* puede crecer en una variedad de formas que van desde levadura hasta hifa y pseudohifa. Así, *C. albicans* no es, como usualmente se ha descrito, dimórfica, es mas propiamente considerada polimórfica [Shepherd et al, 1985] (Fig. 2); la relación entre las diferentes morfologías de *C. albicans* aún no son bien comprendidas; sin embargo, Braun y Johnson en 1997 [Magee, 1997] demostraron que *C. albicans* requiere de un represor transcripcional TUP1 para mantener la forma levaduriforme; cuando ambas copias del gen TUP1 son suprimidas (fenotipo designado  $\text{Tup}^-$ ), el organismo crece exclusivamente en forma de pseudohifa [Shepherd et al, 1985] (Fig. 3).



**Fig. 2. Tipos de crecimiento en especies de *Candida***

Todas las especies crecen como levadura (A), y muchas producen algún tipo de pseudohifa (C). *C. albicans* y *C. dubliniensis* también forman hifas verdaderas (B). La gemación en especies de *Candida* ocurre en numerosos sitios de la superficie celular. Cuando los brotes o yemas incrementan su tamaño, se separan de la célula madre para cumplir con las fases finales de la mitosis. La formación de hifas es iniciada por un crecimiento externo (tubo germinativo) seguido de extensión apical.

Tomado de Odds, 1988.



**Fig. 3 . Modelo para la regulación del crecimiento en forma de pseudohifa en *C. albicans*.**

Los genes requeridos para el crecimiento pseudohifal están bajo control negativo de un complejo constituido por Tup1p y probablemente otras proteínas. Cuando este complejo es elegido por una proteína de unión a DNA, los genes se apagan (izquierda). Cuando la proteína de unión a DNA está ausente, los genes son transcritos y la célula crece en forma de pseudohifa (derecha).

La proteína de unión a DNA es regulada negativamente por Efg1p; cuando EFG1 es sobreexpresado, la síntesis de la proteína de unión a DNA es impedida y las células están en la forma de pseudohifa. EFG1 es regulado negativamente por Rbf1p y positivamente regulado por Cph1p cuando éste último es activado por la cascada de la MAP quinasa. Cuando RBF1 es suprimido, Efg1p se sobreexpresa y los genes de pseudohifa se prenden. Cuando CPH1 es suprimido, Efg1p no se activa y las células no pueden encender los genes de la forma pseudohifal.

Tomado de SCIENCE • VOL. 277 • 4 JULY 1997 • [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

### III.3.2 Metabolismo celular

*C. albicans* puede crecer en medios de cultivos simples que contengan una fuente de carbono (glucosa), nitrógeno (sales de amonio) y fosfato; los rangos de temperatura y pH fluctúan entre 20 a 40°C y 2 a 8, respectivamente. *C. albicans* fermenta glucosa, galactosa y maltosa con formación de ácido y gas; de esta manera, el patrón de asimilación y fermentación de azúcares es usado en la diferenciación de especies del género [Sandhu et al, 1979].

Respecto al transporte de nutrientes, se piensa que en *C. albicans* el transporte de azúcares y aminoácidos al interior de la célula se lleva a cabo por la vía de las permeasas. Las permeasas son proteínas integrales de membrana capaces de transportar activamente muchas sustancias al interior de la célula. En este sistema de transporte activo, el principal papel de la ATPasa de la membrana plasmática es mantener el gradiente electroquímico de protones (fuerza motriz) a través de la membrana plasmática para el transporte de nutrientes [Sandhu et al, 1979]. El transporte de péptidos ocurre por la vía de un sistema de transporte mediado por acarreadores; mientras que la toma del aminoáucar N-acetilglucosamina (GlcNAc) ocurre mediante un sistema inducible [Sandhu et al, 1979; Gopal et al, 1982]; en el interior de la célula el GlcNAc es dividido entre la vía catabólica para su conversión a

fructosa-6-fosfato y la vía anabólica para la síntesis de quitina [Singh & Datta, 1979; Chattaway et al, 1973].

*C. albicans* posee todas las enzimas necesarias para llevar a cabo la ruta metabólica de la glucólisis o vía Embden-Meyerhof, la hexosa monofosfato y el ciclo del ácido tricarboxílico [Corner & Magee, 1997]; también se han encontrado actividades enzimáticas asociadas con la síntesis y degradación de carbohidratos tanto en fase levaduriforme como en fase micelial [Ram et al, 1983]. De manera análoga a otras células eucariotas, en *C. albicans* la enzima fosfofructocinasa participante en la vía metabólica de la glucólisis resultó ser una enzima alostérica [Sullivan et al, 1983]. Finalmente, el glucógeno constituye el principal almacén de carbohidrato intracelular; sin embargo, algunos experimentos indican que la trehalosa también constituye un almacén de energía [Chaffin et al, 1998].

### **III.3.3 Composición de la pared celular**

La pared celular de *C. albicans* actúa como una barrera permeable y es la estructura que mantiene la forma característica del hongo. Por ser la estructura más externa de la célula, la pared celular media la interacción física inicial entre el microorganismo y el ambiente, incluyendo el hospedero [Gopal et al, 1984].

Los primeros estudios establecieron que la pared celular de *C. albicans* y *S. cerevisiae* son cualitativamente similares [Ram et al, 1983; Chaffin et al, 1998]. Estudios realizados a partir de paredes purificadas de células levaduriformes y tubos germinativos de *C. albicans*, indican que la pared celular está compuesta por lípidos (2%), proteínas (3-6%), quitina (0.6-2.7%), manoproteínas (20-23%) y glucanas (47-60%); sin embargo, durante la formación del tubo germinativo el contenido de quitina se incrementa 4 veces, mientras el contenido de manoproteínas y glucanas no muestran variaciones significativas [Ram et al, 1983]. Las  $\beta$ -glucanas, manoproteínas y quitina representan los polisacáridos principales de la pared celular:

- $\beta$ -glucanas: polímeros ramificados de glucosa con enlaces  $\beta$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,6).
- Quitina: polímeros no ramificados de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) con enlaces  $\beta$ -(1,4).
- Mananas: polímeros de manosa covalentemente asociados con proteínas (glico[mano]-proteínas).

Los polímeros microfibrilares ( $\beta$ -glucanas y quitina) representan los componentes estructurales de la pared celular; forman un esqueleto rígido que proporciona propiedades físicas importantes a la célula. Cuantitativamente, las  $\beta$ -glucanas son el principal constituyente

formando el 47-60% del peso de la pared celular [Elorza et al, 1983]. La quitina es el componente menor pero el más importante de la pared de *C. albicans*, particularmente del septo entre compartimentos celulares independientes, de las cicatrices de desprendimiento de las células hijas y del anillo alrededor de la constricción entre la célula madre y la yema o brote [Calderone & Braun, 1991].

Los polímeros de manosa (mananas) no existen como tal, pero se encuentran en asociación covalente con proteínas (manoproteínas); representan cerca del 40% del polisacárido total de la pared celular y son el principal material de la matriz de la pared celular [Sandhu et al, 1979; Reiss & Morrison, 1993]. El término "manana" también ha sido usado para referirse al principal componente inmunodominante soluble presente en la capa externa de la pared celular de *C. albicans* llamado "fosfomanoproteínas" o "complejos fosfopéptido mananas" constituidos por homopolímeros de D-manosa, proteínas (3-5%) y fosfatos (1-2%) [Kobayashi et al, 1997]. Los polímeros de manosa están unidos a las proteínas a través de asparagina (por enlaces N-glicosídicos a través de 2 GlcNAc [di-N-acetilquitobiosa] residuos) y treonina o serina (por enlaces O-glicosídicos, álcali lábil) residuos [Calderone, 2002].

La quitina es un polisacárido constituido únicamente por residuos de N-acetilglucosamina (NAG) unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1,4). Al

igual que el polisacárido de la pared de muchos microorganismos [formado por 2 clases de azúcares: N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) unidos por un enlace  $\beta$ -(,4) respectivamente], la quitina también es sustrato de la lisozima, una glucosidasa que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,4) de ambos sustratos [Cabib et al, 1982].

La quitin sintetasa en *C. albicans* está localizada principalmente en la membrana plasmática [Cabib et al, 1982], lo cual coincide con la idea de una enzima transmembranal que cataliza la síntesis vectorial del polímero quitina. Aproximadamente más del 80% de la quitin sintetasa en las preparaciones de membrana a partir de células levaduriformes de *C. albicans* se encuentra en forma de zimógeno (precursor inactivo). La formación de tubo germinativo y el crecimiento micelial son acompañados por un incremento (1.4 y 2 veces respectivamente) de los niveles enzimáticos (activación del zimógeno) y actividad enzimática específica (5 veces en ambos casos). La forma de zimógeno ha sido activada *in vitro* por proteinasas exógenas y una proteinasa vacuolar B [Reiss & Morrison, 1993], pero tal fenómeno *in vivo* aún es dudoso [Kapteyn et al, 1994]. Por otro lado, la enzima quitinasa muestra un pico de actividad durante el crecimiento levaduriforme de *C. albicans* indicando que tal vez puede ser requerida para digerir los excesos de

quitina en el citoplasma o en la hidrólisis localizada de la quitina de pared [Cabib et al, 1982].

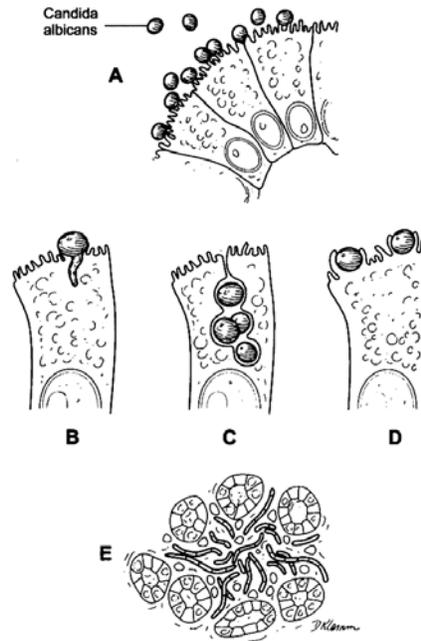
Respecto a la organización de la pared celular, Surarit et al en 1998 reportaron la presencia de enlaces glicosídicos entre la glucana y la quitina. Evidencias recientes indican que las manoproteínas pueden establecer asociaciones covalentes con las  $\beta$ -glucanas [Ladgé & Boucias, 1990; Klis et al, 1997]. Por lo tanto, se ha sugerido que las  $\beta$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,6)-glucanas están unidas a las proteínas por enlaces fosfodiéster, un proceso que puede involucrar la participación de un ancla GPI (Glicosil fosfatidil inositol) [Ladgé & Boucias, 1990]. Recientemente, Kollár y col., analizaron la interacción de los 4 componentes principales de la pared celular e indicaron que las  $\beta$ -(1,6)-glucanas tienen algunas ramas de  $\beta$ -(1,3)-glucanas que pueden estar unidas a extremos reductores de quitina. La  $\beta$ -(1,6)-glucana y manoproteínas están unidas a través del ancla GPI. Los extremos reductores de las  $\beta$ -(1,6)-glucanas pueden estar unidas a los extremos no reductores de  $\beta$ -(1,3)-glucanas.

Finalmente, se ha propuesto la siguiente secuencia que da origen a la estructura de la pared celular [Klis et al, 1997; Klotz & Smith, 1991]:

**Manoproteínas-GPI -  $\beta$ -(1,6)-glucana  $\beta$ -(1,3)-glucana-Quitina**

### III.3.4 Factores de Virulencia

La adherencia de *C. albicans* se debe a características químicas y estructurales de la pared. El compuesto químico que permite la unión es una manoproteína y la capa fibrilar que recubre la pared; otras moléculas de adherencia son las adhesinas (lectinas y glicoproteínas de superficie) que interactúan con la fibronectina, la laminina y la fibrina, presentes en la superficie de las mucosas. Esta interacción puede ser influenciada por la temperatura, el pH, nutrientes, IgA secretoria e hidrofobicidad de la superficie celular [Greenfield, 1992; Staib et al, 1999]. En *C. albicans*, las levaduras son consideradas responsables de la colonización del epitelio, pero la hifa es considerada como una estructura invasiva [Cutler, 1991]. El crecimiento micelial, iniciado por la formación del tubo germinativo [Cutler, 1991; Hawser & Douglas, 1994], incrementa las propiedades de adherencia de las levaduras [Odds, 1994; Samaranayake & MacFarlane, 1981].



**Fig. 4. Interacción de *C. albicans* con la superficie de la mucosa.**  
**(A)** Adherencia y colonización de las células epiteliales. **(B)** Fase de transición dimórfica previa a la invasión de las células epiteliales. **(C)** La persorción de las levaduras promueve el ingreso del organismo. **(D)** La fagocitosis inducida por células endoteliales puede contribuir a la invasión de las células epiteliales. La invasión de la superficie de la mucosa es probablemente seguida por diseminación linfática o sanguínea a tejidos tales como hígado donde ocurren agregados locales de formas filamentosas. **(E)** La presencia de formas filamentosas en la sangre pueden promover la invasión a otros tejidos.

Tomado de Cole et al. 1993; *Mycol. Res.* **97**: 385-408.

Diversos estudios han mostrado la capacidad de *C. albicans* para adherirse a superficies plásticas tales como prótesis dentales y catéteres intravenosos mediante la formación de biopelículas; éstos, son de importancia crítica en la progresión de la candidemia debido a que le confieren resistencia antifúngica a los microorganismos contenidos en la

biomasa; los medicamentos tienen una pobre penetración en los microorganismos contenidos en el biofilm [Cabib et al, 1982].

La especie más frecuentemente aislada en el biofilm es *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. kefyr* [Pope & Cole, 1981].

En un modelo experimental en ratones [Cabib et al, 1982], se demostró que la diseminación sistémica de *C. albicans* a través del tracto gastrointestinal puede efectuarse mediante el fenómeno denominado *persorpción* (proceso en el cual partículas relativamente grandes pasan a través de la pared del tracto gastrointestinal y entran a los vasos sanguíneos o linfáticos); existe evidencia abundante en la literatura que establece que partículas inertes tales como esferas de cloruro de polivinilo, gránulos de almidón y las levaduras, incluyendo a *C. albicans* pueden transmigrar la pared del tracto digestivo mediante la *persorpción* ocasionando candidemia.

Se ha demostrado que *C. albicans* puede emitir largos filamentos capaces de invadir tejidos profundos donde se localiza una mayor cantidad de nutrientes; este fenómeno es conocido como *tigmotropismo*. [Soll, 1992]

*C. albicans* evade las defensas del hospedero debido a la modulación tanto de los mecanismos de defensa fagocíticos como de la respuesta inmune, mediante las propiedades de su superficie incluyendo hidrofobicidad y por modificaciones en la estructura de su superficie a través del cambio fenotípico (phenotypic switching). Cuando *C. albicans* es sometida a estrés nutricional, es capaz de adaptarse a diferentes microambientes del hospedero mediante el cambio rápido de su fenotipo [Sweet & Douglas, 1991] o secretando compuestos quelantes de bajo peso molecular conocidos como sideróforos [Howard, 1999; Borg M & Ruchel R, 1990]. Adicionalmente, *C. albicans* y otras especies del género *Candida* secretan hidrolasas, incluyendo proteinasas, fosfolipasas, lipasas, hexosaminidasas y fosfomonoestereasas [Odds, 1994; Wu & Samaranayake, 1999; White & Agabian, 1995]. Dentro de las enzimas hidrolíticas secretadas, las Aspartil Proteinasas Secretadas (Sap) son las más ampliamente estudiadas [Odds, 1994]. Se ha demostrado que el patrón isoenzimático Sap de *C. albicans* es determinado por el tipo de células, mientras que los niveles de producción son afectados por los factores ambientales, y la transición levadura-hifa y el switching fenotípico pueden determinar cuál de las isoenzimas Sap es producida [Krogh et al, 1987]. *C. albicans* también produce metabolitos ácidos incluyendo ácidos carboxílicos de cadena corta y sustancias tóxicas tales como nitrosaminas carcinogénicas [Jarvis, 1995]. La actividad

enzimática y metabólica de *C. albicans* daña las células del hospedero y consecuentemente puede interrumpir las funciones celulares.

**Tabla 4. Factores de virulencia en *C. albicans***

---

**Factor de virulencia**

Adherencia  
Persorpción  
Dimorfismo  
Tubo germinativo  
Rápido cambio fenotípico  
Tigmotropismo  
Hidrofobicidad de superficie  
Mimetismo molecular  
Interferencia con la fagocitosis, respuesta inmune y complemento  
Sinergismo con ciertas bacterias  
Hidrolasas extracelulares (proteinasas, lipasas)  
Anafilotoxinas  
Toxinas asesinas  
Nitrosaminas  
Metabolitos ácidos  
Porcentaje de crecimiento  
Bajos requerimientos nutricionales

---

Modificado de Ruechel (1990), Cutler (1991) y Odds (1994)

## IV. ANTECEDENTES

### IV.1 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN EN *CANDIDA* spp.

La incidencia de la candidosis diseminada se ha incrementado en años recientes por el aumento en el número de sujetos inmunodeprimidos y pacientes postquirúrgicos, cuyas condiciones promueven el desarrollo de esta enfermedad [Pfaller, 1995; Jones, 1990]. El advenimiento de nuevas drogas antifúngicas ha fortalecido el manejo clínico de la candidosis [Rex et al, 1995]; sin embargo, el diagnóstico de las especies patógenas del género *Candida* sigue siendo difícil [Kobayashi et al, 1997; Wingard, 1995]. Además, aunque la profilaxis con fluconazol en el trasplante de médula ósea ha reducido la incidencia de candidemia causada por *C. albicans*, la incidencia de infecciones primarias causadas por otras especies de *Candida* que son congénitamente resistentes al fluconazol, principalmente *C. krusei* y *C. glabrata*, se ha incrementado. De ahí que la temprana detección e identificación de las especies de *Candida* sea de vital importancia para la instauración de la terapia antifúngica adecuada [Wingard, 1995].

El diagnóstico microbiológico es un paso esencial en el establecimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas y aunque su característica fundamental es la identificación del agente etiológico, en la actualidad incluye también la determinación de la

sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y la utilización de métodos de tipificado que permitan la diferenciación intraespecífica de los aislamientos. Siempre que sea posible, la identificación de los aislamientos fúngicos debe realizarse a nivel de especie, ya que esta información puede ser muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se dispongan de los resultados de sensibilidad *in vitro* [Ponton, 2002].

## IV.2 CULTIVO

El cultivo de la muestra clínica es el método más utilizado en el diagnóstico de la candidosis, ya que una vez aislado el agente etiológico puede realizarse la identificación a nivel de especie, los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y los estudios de caracterización intraespecífica. Como contrapartida a sus grandes ventajas, encontramos que el diagnóstico es más lento, ya que suele ser incapaz de dar resultados antes de 24 h, porque hay que sumar al tiempo necesario para que crezca el hongo el que se requiere para la identificación. El tiempo de crecimiento fúngico está genéticamente determinado y puede variar desde unas pocas horas a varios días. En general, las levaduras pueden detectarse de 24-48 h de cultivo, mientras que los hongos filamentosos necesitan más tiempo y pueden presentar grandes diferencias. Por ejemplo, *Mucor* y *Rhizopus* producen colonias visibles en 48 h mientras que *Histoplasma capsulatum* y otros

hongos dimórficos, entre ellos *C. albicans*, requieren entre 5 a 21 días [Quindós et al, 2000].

### **IV.3 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

Las posibilidades de obtener resultados en tiempo real en el diagnóstico micológico actual son limitadas y se centran en la observación directa de la muestra tomada del paciente. Este tipo de diagnóstico se basa actualmente en la observación microscópica directa de la muestra o utilizando tinciones de rápida realización como la tinta china, el blanco de calcoflúor y otros fluorocromos, o la tinción de Gram y es de gran utilidad en el estudio de muestras clínicas de pacientes con micosis que afectan la piel y las mucosas [Quindós et al, 2000], pero también puede ser de utilidad en el diagnóstico de micosis invasivas como la meningoencefalitis criptocócica y algunas infecciones por hongos filamentosos [Freydiere et al, 1997]. Las principales limitaciones de las técnicas microscópicas son su relativamente baja sensibilidad, su incapacidad en la mayor parte de los casos, para identificar el hongo a nivel de especie y la imposibilidad de realización de estudios de sensibilidad antifúngica [Quindós et al, 2000].

### **IV.4 TUBO GERMINATIVO**

La formación del tubo germinativo ha sido y es el sistema más utilizado para la detección de *C. albicans*. Se basa en la capacidad que

tiene esta especie para producir estructuras filamentosas típicas después de 2-4 horas de incubación a 35-37°C en suero de conejo, oveja o caballo, siempre partiendo de una colonia aislada; sus inconvenientes son:

- Un 5% de las cepas de *C. albicans* no producen estas estructuras
- Otras especies producen estructuras similares que pueden conducir a errores en la identificación
- Se requiere de personal experimentado en la preparación de la suspensión y para la observación microscópica [Willinger et al, 1994].

#### **IV.5 MÉTODOS ENZIMÁTICOS**

Se basan en detectar la presencia de enzimas características de *C. albicans*. El método consiste en la conjugación de moléculas fluorogénicas o cromogénicas a los sustratos de las enzimas de interés. La enzima, al actuar sobre el sustrato, liberará las moléculas conjugadas que pueden ser observadas bajo lámpara de rayos UV (en el caso de las moléculas fluorogénicas) o a simple vista por cambio de color (moléculas cromogénicas) [San Millan et al, 1996].

En la observación fluorogénica suelen utilizarse sustratos conjugados a 4-metilumbeliferil (4-MU):

4-MU-sustrato → 4-metilumbeliferona(fluorogénica) + sustrato acción  
de la enzima

En el caso de los sustratos conjugados a moléculas cromogénicas la variedad de posibilidades es mayor:

Sustrato-*p*-nitroanilida → sustrato + *p*-nitroanilida acción de la enzima

El estudio de la actividad enzimática sobre sustratos concretos se ha aplicado desde hace unos años a la identificación rápida de levaduras, sobre todo de *C. albicans*. Existen métodos rápidos con sustratos fluorogénicos y cromogénicos, con una sensibilidad y especificidad similar a la prueba del tubo germinativo y más rápidos que ésta, pero menos específicos que la asimilación de compuestos de carbono [Willinger et al, 1994]. Los que utilizan sustratos fluorogénicos (necesitan lámpara de Wood para la lectura) detectan beta-galactosaminidasa y L-prolinaminopeptidasa (Albistrip, RapID Albicans, Albicans-Sure, BactiCard Candida) o solamente beta-galactosaminidasa (MUAG test); los que utilizan sustratos cromogénicos detectan beta-galactosaminidasa y L-prolinaminopeptidasa (Candi Albicans Screen, Murex *C. albicans* CA50).

Existen también métodos rápidos manuales que combinan la detección de actividad enzimática con otras características bioquímicas [Willinger et al, 1994]. El sistema Fongiscreen puede identificar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *Cryptococcus neoformans* en 4

horas, mediante siete tests: reducción del tetrazolio, asimilación de trehalosa y cinco actividades enzimáticas; su sensibilidad y especificidad son del 100%. El sistema RapID Yeast Plus utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de las levaduras de interés clínico en 4-5 horas, pero su rendimiento es solamente de un 85%. El mismo problema tiene el sistema automatizado Baxter MicroScan de 4 horas.

Un avance importante en la identificación de los hongos levaduriformes y de algunos dermatofitos son los medios diferenciales con sustratos fluorogénicos y cromogénicos para la detección de la enzima beta-galactosaminidasa, ya que permiten la identificación por el color y la morfología de las colonias [Rousselle, 1994]. Cuando se utilizan como medios de aislamiento primario puede realizarse una identificación de algunas especies de *Candida* en 24-48 h. Los medios diferenciales se dividen en fluorógenicos (Fluoroplate Candida y SDCA-MUAG agar), cuando las enzimas del hongo degradan componentes del medio que dan lugar a compuestos fluorescentes y cromogénicos, o cuando la actividad enzimática del hongo se detecta porque se producen colonias con un color característico. Los medios cromogénicos (Albicans ID, Candiselect, Candichrom) son los más utilizados porque no necesitan luz uv para la observación de las colonias y porque pueden identificar un número mayor de especies que los fluorogénicos [Ponton et al, 2000].

Generalmente *Candida* spp. crece bien sobre medios comunes micológicos y bacteriológicos, incluyendo agar dextrosa Sabouraud, agar sangre y agar sangre de caballo. *C. albicans* y *C. dubliniensis* crecen en presencia de ciclohexamida. Las colonias de *Candida* spp. crecen a temperaturas entre 25 y 37°C con una textura suave o rugosa, color blanco o beige cuando crecen en agar glucosa-peptona. Especies del género *Candida* mezcladas en muestras biológicas pueden ser distinguidas mediante el uso de medios con compuestos cromogénicos como CHROMagar; este medio fue descrito por Odds y Bornaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*. Sin embargo, CHROMagar es únicamente útil para la identificación presuntiva de ciertas especies de importancia médica: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* [Al Mosaid et al, 2001]. Después de 48 h de incubación a 37°C en este medio, *C. albicans* aparece como colonias de color verde, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45°C, *C. tropicalis* azul oscuro y *C. krusei* color rosa. *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentan una estrecha relación filogenética. Ambas poseen la capacidad de adherirse a superficies epiteliales, de secretar proteinasas, de producir tubos germinativos y clamidoconidios, por lo que pueden identificarse erróneamente en el laboratorio; se han reportado diversas pruebas fenotípicas para diferenciarlas [Peltroche-Llacsahuanga et al, 2000; Land et al, 1991]. *C. dubliniensis*, especie del

género aislada inicialmente de la cavidad oral de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, adquiere en CHROMagar un color verde oscuro; sin embargo, el color característico de *C. dubliniensis* sobre CHROMagar, puede perderse si se resiembró o se almacena. La sensibilidad de este medio es de 8,8% a las 24 hrs y de 89,1% a las 48 hrs; su especificidad es del 100%.

#### **IV.6 MÉTODOS DE AGLUTINACIÓN**

Actualmente, existen técnicas de aglutinación que ofrecen una buena alternativa diagnóstica por su rapidez (5 minutos), sensibilidad y especificidad. Así, el test Bichro-Latex Albicans utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos de *C. albicans*; esta prueba presenta una sensibilidad y una especificidad del 100%; el test Krusei color va dirigido a la identificación de *C. krusei*; la sensibilidad de esta prueba es del 100% y su especificidad es del 95%; el test Candida Check posibilita identificar las especies más frecuentes en clínica y detectar los serotipos A y B de *C. albicans* [Quindós, 1997].

#### **IV.7 PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

La fermentación y asimilación de compuestos de carbono son las pruebas más utilizadas en la identificación de levaduras. El auxonograma o capacidad de las levaduras para utilizar o asimilar

diferentes compuestos de carbono es la prueba de identificación hasta especie más utilizada. El sistema ID 32C (BioMérieux, France), aunque algo lento, suele ser muy específico. Existen otros sistemas comerciales que combinan las pruebas nutricionales con otras de actividad enzimática y/o fisiológicas (Auxacolor, Uni-Yeast-Tek, API 20C AUX, API ID 32C, Vitek YBC [Salkin, 1987]).

La galería Auxacolor (Bio-Rad) es un sistema de identificación basado en la asimilación de 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras. El crecimiento de la levadura se visualiza por el cambio de un indicador de pH [Hoppe, 1999].

El sistema Uni-Yeast-Tek (Remel) contiene un medio con agar para la asimilación diferencial de siete hidratos de carbono; también incorpora una cubeta central con agar harina de maiz-Tween 80 para determinar el crecimiento micelial y la producción de clamidoconidios; además, está provisto de agar urea, agar para la asimilación y reducción de nitratos y de un caldo con extracto de carne al 2.6% (con 0.05% de glucosa) para realizar la prueba del tubo germinativo.

En la actualidad se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación (9). La galería API 20C AUX (bioMérieux) se compone de

20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras solo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. Las lecturas de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

La galería ID 32C (bioMèrieux) permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API.

Las tarjetas Yeast Biochemical Card (YBC) del sistema Vitek (bioMèrieux) permiten la identificación de organismos levaduriformes y afines de forma automatizada; este sistema permite identificar 36 especies diferentes de levaduras: 16 especies del género *Candida*, 6 de *Cryptococcus*, 3 de *Rhodotorula*, 2 de *Thrichosporon*, 3 de *Geotrichum*, 2 de *Prototheca*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*. En la actualidad, se cuenta con una versión actualizada de este sistema denominado Vitek 2 totalmente automatizado para la detección del metabolismo fúngico que puede

identificar levaduras y organismos afines en tan solo 15 h. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos una consola satélite para el almacenamiento de la información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado. El sistema Vitek 2 permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*, y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación. [Willinger et al, 1994].

#### **IV.8 PRUEBAS MOLECULARES**

Los miembros del género *Candida* son patógenos oportunistas humanos, y algunas especies del género están presentes en las superficies mucosas de la boca, tracto gastrointestinal y vagina como comensales. Dependiendo del estado de salud del individuo, las especies del género *Candida* son capaces de producir una amplia diversidad de entidades clínicas, que van desde infecciones superficiales hasta invasivas. Aunque frecuentemente las infecciones por especies del género *Candida* ocurren en sujetos inmunosuprimidos, también la candidosis superficial es causa de morbilidad. Actualmente, en México el diagnóstico de laboratorio de la candidosis se basa en la observación microscópica y en el cultivo. Bajo circunstancias normales, la identificación de la candidemia por estos métodos puede tomar de 2 a 5

días. Sin embargo, debido a que algunos especímenes clínicos de aislamientos de *Candida* han presentado crecimiento lento, la identificación a nivel de especie puede llevar un mayor período de tiempo. Además, como los procedimientos de identificación común miden las características fenotípicas de las especies de *Candida*, los resultados pueden ser variables y algunas veces ambiguos. La patogenicidad y susceptibilidad antifúngica de algunos miembros del género *Candida* pueden variar de una especie a otra, lo cual además, requiere una identificación rápida y específica a nivel de especie para tomar decisiones terapéuticas apropiadas. En la obtención de un pronóstico preciso y por razones terapéuticas y epidemiológicas, es esencial la identificación exacta del agente etiológico de un aislamiento clínico de *Candida*. Los procedimientos rutinarios para la identificación de especies de *Candida*, además de la observación microscópica y el cultivo, son la evaluación de varias reacciones bioquímicas. Los sistemas comerciales de asimilación de carbohidratos son ampliamente utilizados en la identificación de especies de *Candida* y de otros géneros de levaduras con importancia médica. Sin embargo, algunas de las reacciones bioquímicas atribuibles a ciertas especies varía entre diferentes cepas de la misma especie, y se ha registrado una considerable variación que puede generar problemas en la identificación [Freydiere et al, 1997].

Desde mediados de los años ochenta, las técnicas moleculares han permitido desarrollar métodos de tipificación altamente reproducibles y sensibles [Howell et al, 1996; Berenguer J et al, 1996].

La tipificación molecular de hongos en general y de especies de *Candida* puede realizarse analizando:

1. El cariotipo electroforético [Pujol et al, 1997].
2. El perfil isoenzimático o de enzimas multilocus (MLEE) [Scherer & Stevens, 1987].
3. El polimorfismo de la restricción del DNA genómico (REA) [Scherer & Stevens, 1987; Voss, 1995].
4. El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de algún DNA previamente obtenido o amplificado por PCR y posteriormente digerido con enzimas de restricción como:
  - a) El rDNA [Yates-Siilata et al, 1995].
  - b) El DNA mitocondrial [King et al, 1995].
  - c) El espaciador transcrito interno (ITS) de rDNA [Wipf et al 1999].
5. El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de macrorestricción (MRFLP) del DNA genómico digerido con enzimas de corte raro [King et al, 1995].

6. El polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD) mediante:
  - a) Oligos cortos al azar [Lehmann et al, 1992; Pujol et al, 1997; Cresti et al, 1999].
  - b) Oligo "core" de M13 [Berenguer J et al, 1996].
7. El perfil generado mediante PCR basado en secuencias repetidas (REP-PCR) [Redkar et al, 1996].
8. La hibridación con sondas dirigidas contra regiones moderadamente repetidas como:
  - a) La sonda RPS1 [Lockhart et al 1995]
  - b) Los elementos repetidos 2 [Lischewski et al, 1995].
  - c) La sonda CARE2 [Pujol et al, 1997].
  - d) La sonda Ca3 [Schmid et al, 1992; Boerlin P et al, 1995; Pujol et al, 1997].
9. La generación de "huellas digitales" (fingerprinting) con oligonucleótidos de DNA genómico [Sullivan et al 1993].

Estos métodos tienen la capacidad de diferenciar cepas fenotípicamente idénticas o altamente relacionadas.

Los primeros métodos moleculares usados para la generación de "huellas digitales" (fingerprinting) de cepas de *C. albicans* fueron: la cariotipificación [Sullivan et al 1995], el polimorfismo de la restricción del DNA genómico (REA) [Iwaguchi et al, 1990] y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de DNA previamente

obtenido o amplificado por PCR y posteriormente digerido con enzimas de restricción [Cresti et al, 1999]. La cariotipificación electroforética ha permitido determinar el número y tamaño de los cromosomas de *Candida* spp. [Iwaguchi et al, 1990]. El polimorfismo de la restricción del DNA genómico (REA) determina la variación en el genoma usando varias endonucleasas de restricción para detectar diferencias en los sitios de corte (en las secuencias de DNA). Con la prueba RFLP, los fragmentos obtenidos por REA son hibridizados (fingerprinting) con un número mayor de fragmentos de restricción genómicos que RFLP. Sin embargo, la prueba RFLP tiene una mayor habilidad de discriminación en aislamientos clínicos que la prueba REA [Redkar et al, 1996], probablemente debido a que la prueba RFLP presenta una menor dificultad en la interpretación de las "huellas digitales" (fingerprinting).

Existe una amplia variedad de sondas dirigidas contra regiones moderadamente repetidas y empleadas para la discriminación intraespecie de *C. albicans* tales como: Sondas rDNA [Scherer & Stevens, 1988], sondas de DNA mitocondrial [Yates-Siilata et al, 1995], sonda 27A *C. albicans*-específica [Boerlin P et al, 1996], la sonda Ca3 [Schmid et al, 1992; Lockhart et al, 1997]. La prueba RFLP, especialmente con la sonda Ca3 ampliamente usada, ha sido reproducible y satisfactoria en la diferenciación de aislamientos de *C. albicans*. También mediante estudios de hibridación con la sonda Ca3 se

ha encontrado que cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes con VIH, tienen una reducida diversidad genética comparada con la de las cepas de referencia [Schmid et al, 1992]. Sin embargo, varios estudios han concluido que los métodos de cariotipificación son menos discriminatorios que, por ejemplo el RFLP, el RAPD o la hibridación con la sonda 27A, y que son menos prácticos para aplicarse como herramientas epidemiológicas y clínicas [Diaz-Guerra et al 1997].

A finales de los ochenta, las técnicas de biología molecular REA y RFLP fueron introducidas en la genotipificación de *C. albicans*; más tarde, a principios de los noventa, la prueba RAPD fue introducida para la detección de "huellas digitales" (fingerprinting) en aislamientos de *C. albicans*.

En la amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD) [Williams et al 1990], el DNA genómico es utilizado como plantilla y amplificado a baja temperatura; se emplea un único "cebador" (primer) constituido generalmente por 9 ó 10 bases y de una secuencia arbitraria. La prueba RAPD es más rápida y técnicamente menos exigente en su aplicación que las pruebas REA y RFLP y, además, requiere de cantidades más pequeñas del DNA blanco. Sin embargo, la reproducibilidad de la prueba RAPD depende de la cuidadosa estandarización de las condiciones de la PCR, y el poder discriminatorio depende del "cebador" (primer) utilizado [Williams et al 1990; Dassanayake & Samaranayake

2000]. Aunque la prueba RFLP ha sido mas discriminadora que el RAPD [Pujol et al 1997] y la prueba REA [Díaz-Guerra et al 1997], presenta dos grandes desventajas: el tiempo prolongado y la laboriosidad en su desarrollo, lo que la convierte en una herramienta poco satisfactoria en estudios epidemiológicos.

En un estudio donde se comparan REA, RAPD y PFGE, se analizó la variabilidad entre aislamientos de diferentes localizaciones geográficas y se encontró que REA y RAPD tuvieron una mayor capacidad discriminadora [Clemons et al, 1997].

# V. OBJETIVOS

## V.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar y comparar la prueba molecular RAPD-PCR utilizando el primer OPE-18 con el sistema de identificación ID 32C para la identificación de diferentes especies de *Candida* aisladas de especímenes clínicos.

## V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia de especies de *Candida* de los aislamientos clínicos utilizando el sistema ID 32C.
2. Determinar la frecuencia de especies de *Candida* de los aislamientos clínicos utilizando la prueba molecular RAPD-PCR utilizando el primer OPE-18.
3. Determinar presuntivamente la frecuencia de especies de *Candida* de los aislamientos clínicos utilizando las pruebas biológicas de formación de tubo germinativo y desarrollo de clamidoconidios.
4. Determinar la sensibilidad de la prueba molecular comparándola con el sistema ID 32C que es utilizado de rutina y esta ampliamente validado.
5. Determinar la especificidad de la prueba molecular comparándola con el sistema ID 32C que es utilizado de rutina y esta ampliamente validado.

6. Determinar la sensibilidad de las pruebas biológicas de formación de tubo germinativo y producción de clamidoconidios en la identificación de *C. albicans* comparando con la identificación del sistema ID 32C.
7. Determinar la especificidad de las pruebas biológicas de formación de tubo germinativo y producción de clamidoconidios en la identificación de *C. albicans* comparando con la identificación del sistema ID 32C.
8. Determinar los valores predictivos de la prueba molecular en la identificación de especies de *Candida*.
9. Determinar los valores predictivos de las pruebas biológicas de formación de tubo germinativo y producción de clamidoconidios en la identificación de *C. albicans*.

## VI. HIPÓTESIS

- La identificación de especies de *Candida* utilizando la prueba molecular de RAPD-PCR es diferente que utilizando el sistema ID 32C.
- La identificación de *C. albicans* utilizando la prueba molecular de RAPD-PCR es diferente que utilizando las pruebas biológicas presuntivas de formación de tubo germinativo y desarrollo de clamidoconidios.
- Es alta la sensibilidad ( $\geq 90\%$ ) de la prueba molecular al compararla con el sistema ID 32C.
- Es alta la especificidad ( $\geq 90\%$ ) de la prueba molecular al compararla con el sistema ID 32C.
- Es baja la sensibilidad ( $\leq 90\%$ ) de las pruebas biológicas de formación de tubo germinativo y producción de clamidoconidios en la identificación de *C. albicans* comparando con la identificación del sistema ID 32C.
- Es baja la especificidad ( $\leq 90\%$ ) de las pruebas biológicas de formación de tubo germinativo y producción de clamidoconidios en la identificación de *C. albicans* comparando con la identificación del sistema ID 32C.

## VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de la década de los ochenta, se ha observado un incremento significativo en la frecuencia de infecciones fúngicas causadas por especies del género *Candida*. Este hecho se debe principalmente al dramático incremento en el número de sujetos con compromiso inmunológico congénito o adquirido como: Enfermedad granulomatosa crónica, neutropenia, infección por VIH, cáncer, transplante de órganos, diabetes mellitus, quemaduras, administración prolongada de antimicrobianos de amplio espectro, desnutrición prematura y el uso indiscriminado de terapias antifúngicas, todos ellos considerados como importantes factores de riesgo.

En nuestro país, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico microbiológico tanto privados como institucionales, establecen la terapéutica para los casos de candidosis basándose en pruebas morfológicas (emisión de tubo germinativo y formación de clamidoconidios), cuyo valor diagnóstico hoy en día es endeble debido a que la literatura reporta en infinidad de estudios que *C. albicans* no es la única especie del género con capacidad de filamentación y formación de clamidoconidios, un 5% de los aislamientos de *C. albicans* no producen tubo germinativo, además de presentarse falsos positivos en otras

especies del género como *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; en años recientes otras especies del género han surgido como agentes etiológicos de candidosis, tal es el caso de *C. dubliniensis*, cuyas características fenotípicas son muy similares a las de *C. albicans* y que además presenta un fenotipo in vitro resistente al fluconazol. De igual forma, las pruebas bioquímicas basadas en la asimilación y fermentación de sustratos mediante sistemas comerciales han sido ampliamente difundidas en México; sin embargo, estas pruebas están basadas en el crecimiento fúngico y requieren entre 15 y 72 hrs para la obtención de resultados. El principal reto del diagnóstico micológico continuará siendo la identificación rápida y eficiente de un número cada vez mayor de hongos patógenos para el ser humano.

En México, las técnicas de biología molecular para la identificación de hongos son todavía experimentales y su aplicación está limitada a trabajos de investigación o laboratorios de referencia, sin embargo, constituyen una alternativa muy importante para realizar la identificación de los hongos. El aspecto más interesante de estas técnicas radica en su gran especificidad, que permite, por una parte la diferenciación de hongos muy similares y, por otra, la identificación de hongos poco frecuentes o que no produzcan las estructuras morfológicas utilizadas habitualmente en la clasificación.

El presente trabajo pretende proponer la prueba molecular RAPD-PCR (polimorfismo del DNA amplificado al aza-reacción en cadena de la polimerasa), para identificación de especies del género *Candida*, ya que genera perfiles que pueden ser utilizados como una "huella digital" (fingerprinting) para distinguir especies y algunos marcadores amplificados se pueden elegir y proponer para ser utilizados en la identificación o en el diagnóstico específico.

## VIII. JUSTIFICACIÓN

En las dos últimas décadas ha habido un progresivo aumento en la frecuencia de infecciones fúngicas causadas por especies del Género *Candida*. Este hecho se debe fundamentalmente al dramático incremento en el número de sujetos con compromiso inmunológico en los que se incluyen: pacientes con terapia antimicrobiana o inmunosupresora, neutropenia, infección por VIH, cáncer, transplante de órganos, diabetes mellitus, quemaduras, así como en pacientes expuestos a procedimientos médico-quirúrgicos extensos.

El diagnóstico de la candidemia sigue siendo un reto importante para los médicos porque los pacientes comúnmente presentan síntomas no específicos. Esto es especialmente cierto en neonatos con bajo peso al nacer; el 30% de todos los casos de candidosis sistémica neonatal no son diagnosticados hasta la autopsia. Los métodos empleados actualmente en el diagnóstico de candidemia dependen del hemocultivo; sin embargo, existen problemas inherentes con este método porque el hemocultivo frecuentemente requiere de volúmenes no fácilmente obtenidos de infantes con bajo peso al nacer y adicionalmente se requiere de varios días antes de que el microorganismo pueda ser detectado e identificado. De hecho, del 40 al 60% de todos los

hemocultivos son negativos para especies de *Candida*, a pesar de la diseminación visceral fúngica.

Las infecciones por levaduras del género *Candida* representan cerca del 80% de las infecciones fúngicas nosocomiales; sin embargo, se ha reportado una alta incidencia de especies emergentes no-*C. albicans* asociadas con diversos cuadros clínicos y con alta resistencia a diversos antifúngicos, debido en gran parte, al incremento en sus factores de virulencia como resultado del proceso de adaptación a las condiciones del hospedero.

En virtud de lo anterior, el diagnóstico microbiológico conforma la piedra angular en el establecimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas y aunque su característica fundamental es la identificación del agente etiológico, incluye también la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y la utilización de métodos de tipificación que permitan la diferenciación intraespecífica de los aislamientos; sin embargo, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico microbiológico, en nuestro país, al efectuar el diagnóstico de candidosis, únicamente reportan la presencia de levaduras, y en algunos casos, realizan la identificación presuntiva de *C. albicans* mediante las pruebas de emisión de tubo germinativo y formación de clamidoconidios, sin la utilización de los diferentes métodos como es el caso de las técnicas de biología

molecular que permiten la identificación del agente causal hasta nivel de especie.

La velocidad en la obtención de esta identificación es un aspecto fundamental en la medicina actual, ya que un diagnóstico rápido posibilitará la prescripción de un tratamiento antifúngico específico.

El presente estudio tiene como propósito fundamental, ampliar el panorama en el área de identificación fúngica mediante el uso de sondas moleculares específicas unidas a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, ya que tiene la especificidad y la sensibilidad necesarias para identificar especies fúngicas en un mínimo de tiempo.

# IX. MATERIALES Y MÉTODOS

## IX.1 TIPO DE ESTUDIO

Observacional transversal de comparación

## IX.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

Se estudiaron 92 aislamientos clínicos que forman parte de la colección de 256 cepas preclasificadas del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

## IX.3 TIPO DE MUESTRA

Muestra representativa calculada por asignación aleatoria simple consecutiva

## IX.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El universo de trabajo comprende un total de 256 cepas, del cual se obtuvo una muestra representativa mediante la siguiente fórmula de la OPS:

$$n = \frac{K^2 N p q}{(N-1) e^2 + k^2 p q}$$

Donde:

n= total de la población

p=prevalencia esperada = 14% para *C. albicans* (0.14)

q=1-p (1 – 0.14) = 0.86

e=Límite de error deseado (error B)

K=Múltiple del error estándar (múltiplo de 4)

Admitiendo un 95% de certeza diagnóstica como estimador deseado de confiabilidad.

El resultado del cálculo de la muestra representativa fue de 90 muestras, se estudiaron 92 aislamientos.

## **IX.5 VARIABLES**

### **IX.5.1 Independiente**

Identificación de especies de *Candida*.

### **IX.5.2 Dependiente**

Método de identificación de especies, ID 32C, RAPD-PCR y pruebas biológicas.

## **IX.6 METODOLOGÍA**

### **IX.6.1 MICROORGANISMOS**

Para la realización de este trabajo se utilizaron aislamientos obtenidos de cuatro laboratorios microbiológicos procedentes de México, D.F., Guadalajara, Monterrey y Guanajuato.

Un total de 92 aislamientos (17 *C. albicans*, 14 *C. glabrata*, 15 *C. tropicalis*, 11 *C. lusitaniae*, 10 *C. guilliermondii*, 5 *C. parapsilosis*, 7 *C. krusei*, 1 *C. pelliculosa*, 2 *C. rugosa*, 2 *C. dubliniensis*, 1 *C. colliculosa* y 7 *C. kefyr*), obtenidos de diferentes sitios clínicos. Se incluyeron las siguientes cepas de referencia:

*C. albicans* ATCC10231-ENCB-IPN

*C. guilliermondii* IP047.50-FM

*C. tropicalis* CBS1904-IP203.60-FM

*C. krusei* LSH271-IP208.52-FM

*C. parapsilosis* LSH240-IP205.52-FM

*C. kefyr* IP513.56-FM

*C. glabrata* ATCC66032

### IX.6.2 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Las levaduras fueron crecidas a 37°C en placas de Agar Dextrosa Sabouraud y posteriormente conservadas en glicerol al 25% a -70°C.

### IX.6.3 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados a lo largo de este trabajo para la conservación de levaduras y purificación específica de levaduras del género *Candida* fueron los siguientes:

- **Medio selectivo para *Candida* (Nickerson):** Extracto de levadura 1 g/l, glicocola 10 g/l, dextrosa 10 g/l, indicador de sulfito de bismuto 7 g/l y agar 15 g/l a un pH final de 7.2
- **Medio de conservación Agar de Dextrosa Sabouraud:** Dextrosa 40 g/l, mezcla de peptonas 10 g/l, agar bacteriológico 15 g/l con un pH final de 5.6

- **Medios enriquecidos:** YEPD (extracto de levadura 1%, dextrosa 2% y peptona 2%); YEPD-Suero al 0.2%
- **Agar harina de maíz más tween 80:** Harina de maíz 62.5 g, agua destilada 1500 ml, Tween 80 15 ml, agar 19 g
- **Medio mineral Lee:** para la inducción de micelio en *C. albicans*:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  p.2 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5 g/l, NaCl 5 g/l, dextrosa 12.5 g/l, prolina 0.5 g/l, biotina 0.01 g/l

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los suplementos nutricionales se esterilizaron por filtración y se adicionaron a los medios estériles.

#### **IX.6.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS DE *Candida***

La identificación inicial de las cepas se realizó con base en su morfología colonial y microscópica. La morfología colonial se determinó a partir de cultivos puros en agar Dextrosa Sabouraud, incubados a 30°C durante 24-48 h observando textura, superficie, color del anverso y del reverso, así como la presencia o ausencia de pigmento. La morfología microscópica se realizó a partir de preparaciones teñidas con la técnica de Gram y con azul de algodón lactofenol. Todas las levaduras fueron identificadas por la formación de tubo germinativo en medio Lee y la producción de clamidoconidios en agar harina de maíz.

#### **IX.6.4.1 FORMACIÓN DE CLAMIDOCONIDIOS**

Se prepararon cajas Petri con agar harina de maíz adicionada con Tween 80 al 10%: Se tomó una asada de la cepa haciendo tres cortes paralelos a 10 mm de distancia entre sí con un ángulo de 45°; se sembró en otra caja, de la forma indicada en el paso 2, una cepa de *C. albicans* ATCC 10231 como testigo positivo; se incubó a 30°C durante 24-48 h. Posteriormente se colocó sobre un cubreobjetos estéril el inóculo presionando ligeramente con la pinza sobre el agar para evitar el contacto con el objetivo del microscopio; a continuación, se colocó la caja Petri abierta sobre la platina y se observó al microscopio a 10X y 40X, para buscar estructuras fúngicas características como blastoconidios, pseudohifas, hifas verdaderas y clamidoconidios, así como su organización. Se comparó la filamentación con las cepas de referencia.

#### **IX.6.4.2 FORMACIÓN DE TUBO GERMINATIVO**

Para la formación de tubo germinativo se utilizó la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC 10231 y medio Lee precalentado a 39°C; el cultivo en medio Lee se incubó a 37°C durante 1 h; finalmente se observaron al microscopio a 10X y 40X para buscar las estructuras que determinan el diagnóstico presuntivo.

La identidad de los aislamientos se corroboró por el sistema de identificación de levaduras ID 32C (BioMérieux, France), basado en la asimilación de carbohidratos y la asociación de las especies con ayuda del software APILAB (BioMérieux, France).

#### **IX.6.5 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA**

Para la extracción de DNA, las levaduras fueron crecidas en cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud a 37°C por 24-48 h. Una colonia fue subcultivada toda la noche en caldo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) a 37°C en agitación a 200 rpm. El DNA fue extraído de todas las levaduras mediante el kit DNeasy (Qiagen, USA).

La cuantificación y calidad de las muestras de DNA se realizó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Lambda 1<sup>a</sup>, Perkin Elmer, USA) midiendo la relación de absorbancias a 260 y 280 nm. Se consideró que 1 DO a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble cadena (Maniatis et al 1989). Sólo se utilizaron muestras de DNA con una relación de absorbancias 260/280 de aproximadamente 1.8.

#### **IX.6.6 POLIMORFISMO DEL DNA AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)**

El DNA cromosómico de todas las cepas de *Candida* de aislados clínicos y de las cepas de referencia fue usado para el RAPD con el

primer OPE-18 (ggactgcaga) (Gibco BRL, USA) y aplicando las condiciones de amplificación descritas por Lockhart, 1997. Las condiciones de PCR fueron:

Desnaturalización	1 min	94°C
Alineamiento	1 min	36°C
Extensión	2 min	72°C
Ciclos	38	

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo utilizando las concentraciones específicas de cada componente que son indicadas a continuación:

Cl <sub>2</sub> Mg	1 µl (2mM)
dNTPs	2 µl (0.5 µl por cada uno)
Primer	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0.24 µl (1.2 U)
Regulador enzimático	1X
DNA templete	1 µl (10 ng/µl)

#### **IX.6.7 ELECTROFORESIS**

La separación de los fragmentos obtenidos por RAPD, se realizó mediante electroforesis con geles de agarosa al 1.2% utilizando 5-10 µl de muestra de cada producto obtenido de PCR, en buffer amortiguador TAE 1 X a 80 V durante 2-3 h de corrimiento.

Para visualizar las bandas, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml por ml de agua desionizada durante 20 min, seguido de 30 min de lavado en agua desionizada. Las bandas fueron visualizadas, fotografiadas y documentadas con un

transiluminador UV Tagle Eye System (Stratagene, USA). El tamaño de los fragmentos se calculó por comparación con el DNA del Ladder de 1 Kb de extensión (Invitrogen) y con ayuda del programa Sigma Gel Versión 1.0 (Jandel Scientific Co., 1995).

### **IX.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La evaluación del desempeño de una prueba diagnóstica comienza por la cuantificación (estimación, más bien) de la magnitud de los errores que pueden cometerse o, su inverso, la magnitud de los aciertos que se cometen al intentar "adivinar" un diagnóstico a partir de los resultados que brinde dicho procedimiento.

En 1947, Yerushalmy introduce los términos de sensibilidad y especificidad como indicadores estadísticos que evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica.

Nota: La referencia al artículo original de Yerushalmy es la siguiente:

Yerushalmy J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. Pub Health Rep 1947; 62: 1432-49.

La sensibilidad y la especificidad son las medidas tradicionales y básicas del valor diagnóstico de una prueba. Miden la discriminación

diagnóstica de una prueba en relación a un criterio de referencia, que se considera la verdad.

Estos indicadores en principio permiten comparar directamente la eficacia de una prueba con la de otras y esperar resultados similares cuando son aplicadas en diferentes países, regiones o ámbitos.

Para evaluar el desempeño de la prueba molecular RAPD-PCR en la identificación de especies del género de *Candida* se tomó como “estándar de oro” a la prueba bioquímica convencional API 32C. La eficiencia de la prueba molecular RAPD-PCR se realizó a través de la Sensibilidad (Sen) y Especificidad (Esp), también se consideraron los valores predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) (26).

La Sen, se considera como la probabilidad que tiene la prueba molecular RAPD-PCR de detectar verdaderos positivos, es decir el total de positivos que dió la prueba molecular RAPD-PCR y la prueba bioquímica convencional API 32C sobre el total de positivos que dio la prueba bioquímica convencional API 32C ( $A / A + C$ ).

La Esp, se considera como la probabilidad que tiene la prueba molecular RAPD-PCR de detectar verdaderos negativos, es decir el total de negativos que dió la prueba molecular RAPD-PCR y la prueba bioquímica convencional API 32C sobre el total de negativos que dió la prueba bioquímica convencional API 32C ( $D / B + D$ ).

Si la especificidad y la sensibilidad son altas, la medición es de alta validez. La sensibilidad y la especificidad deben ser consideradas juntas, de forma separada su significado se pierde. Generalmente estas dos características varían inversamente. Cuando los criterios para la interpretación de resultados de una prueba son cambiados para incrementar la sensibilidad la especificidad disminuye, y el número de falsos-positivos se verá aumentado. De manera similar, incrementar la especificidad de la prueba puede resultar en una disminución de la sensibilidad y en un incremento del número de los falsos-negativos.

El VPP equivale a la probabilidad condicional de que la prueba molecular RAPD-PCR con un resultado positivo tengan realmente un resultado positivo y VPN indica la probabilidad condicional de que la prueba molecular RAPD-PCR con un resultado negativo tengan realmente un resultado negativo.

Se utilizó la Sen y 1-Esp para construir la Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) y determinar el área bajo la curva, con la finalidad de evaluar la bondad que tiene la prueba para identificar correctamente: 1.0 se considera prueba perfecta y 0.5 prueba inútil [Hanley, 1982].

Tabla 5. Tabla de contingencia de 2x2

		API 32C		Total
		Positivos	Negativos	
RAPD-PCR	Positivos	a	b	a+b
	Negativos	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d

Donde:

**a** = número de aislamientos identificados como positivo por ambas pruebas (Verdaderos positivos).

**b** = número de aislamientos identificados como positivos por RAPD-PCR cuando API 32C identifica como negativos (Falsos positivos).

**c** = número de aislamientos identificados como negativos por RAPD-PCR cuando API 32C identifica como positivos (Falsos negativos).

**d** = número de aislamientos identificados como negativos por ambas pruebas (Verdaderos negativos).

Puede apreciarse que cada celda de la tabla refleja una característica que también suele calificarse de la manera siguiente:

**a** = Verdaderos positivos (VP)

**b** = Falsos positivos (FP)

**c** = Falsos negativos (FN)

**d** = Verdaderos negativos (VN).

## X. RESULTADOS

En el presente trabajo se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba molecular RAPD-PCR, utilizando la prueba bioquímica API 32C como la prueba de referencia la cual ha sido ampliamente validada y es de aplicación rutinaria. Adicionalmente se comparó la identificación de *C. albicans* con las pruebas biológicas (formación de tubo germinativo y producción de clamidoconidios), para determinar su sensibilidad y especificidad, así como sus valores predictivos tanto positivos como negativos.

La Figura 5 muestra los productos representativos de RAPD-PCR para cada especie de *Candida* usando cepas de referencia. Este trabajo revela que el uso de RAPD-PCR con el primer OPE-18 descrito por Lockhart es altamente discriminatorio para identificar las especies más frecuentemente encontradas en especímenes clínicos (Fig. 6).

La tabla 6 muestra los pesos moleculares de las bandas monomórficas consideradas en la identificación de las diferentes especies de *Candida*. El análisis de estas bandas reveló perfiles altamente consistentes.

La sensibilidad de la prueba molecular RAPD-PCR para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. pelliculosa* y *C. colliculosa* fue del 100%. Es decir, la prueba molecular RAPD-PCR fue capaz de identificar como positivo a todos los aislamientos que la prueba bioquímica API 32C presentó como positivo para todas las especies de *Candida* antes mencionadas.

Para *C. kefyr* y *C. parapsilosis*, la sensibilidad de la prueba molecular RAPD-PCR fue de 87.50% y 62.50% respectivamente, por lo que la prueba molecular RAPD-PCR fue capaz de identificar como positivo al 87.50% y 62.50% de los aislamientos identificados como positivos por la prueba bioquímica API 32C de *C. kefyr* y *C. parapsilosis*, respectivamente.

La especificidad de la prueba molecular RAPD-PCR para *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* fue del 100%. Por lo que la prueba molecular RAPD-PCR fue capaz de identificar como negativos a todos los aislamientos que la prueba bioquímica API 32C presentó como negativos para todas las especies de *Candida* antes mencionadas. Para *C. rugosa*, *C. pelliculosa* y *C. colliculosa*, la especificidad fue de 98.90%. Esto significa que sólo el 98.90% de los aislamientos fueron identificados como negativos por la prueba molecular RAPD-PCR del total que fueron identificados como

negativos por la prueba bioquímica API 32C. La especificidad que se presentó para *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. albicans* fue de 98.84%, 97.59% y 85.00% respectivamente.

El valor predictivo positivo de la prueba molecular RAPD-PCR para *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* fue del 100%. El 100% de las especies identificadas como positivas por la prueba molecular RAPD-PCR eran positivas. Se presentó un valor predictivo positivo en *C. krusei*, *C. albicans* y *C. lusitaniae* de 85.71%, 85.00% y 81.82% respectivamente. Para *C. rugosa*, *C. pelliculosa* y *C. colliculosa* presentó la prueba molecular RAPD-PCR 50.00% de valor predictivo positivo. Es decir, que la prueba molecular RAPD-PCR tiene el valor de predicción de un 50.00% para *C. rugosa*, *C. pelliculosa* y *C. colliculosa*.

El valor predictivo negativo de la prueba molecular RAPD-PCR para y *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. pelliculosa* y *C. colliculosa* fue del 100%. Por lo que la prueba molecular RAPD-PCR tiene la capacidad predictiva negativa del 100% de detectar a esas especies. Para *C. kefir*, *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis* el valor predictivo negativo fue de 98.82%, 97.82% y 96.55% respectivamente.

El rendimiento global de la prueba molecular RAPD-PCR para *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis* fue del 100.00%, para *C. krusei*

de 99.42%, *C. lusitaniae* 98.80%, *C. albicans* 98.00%, *C. kefyr* 93.75% y *C. parapsilosis* de 81.25%. Cabe señalar que las especies que no se mencionan no se presentan su rendimiento global a causa de que la muestra no permitió tener los elementos para evaluar la prueba.

La formación de tubo germinativo mostró una sensibilidad y especificidad del 82.35% y 98.67%, respectivamente, mientras que en la prueba de producción de clamidoconidios, la sensibilidad y especificidad fue del 76.47% y 100.00%, respectivamente (Tablas 8 y 9).

En resumen, la prueba RAPD-PCR con el primer OPE-18 es un método sensible y específico para la identificación de especies de *Candida* de importancia médica incluyendo *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*.

Tabla 6. Bandas monomórficas diagnósticas obtenidas por RAPD-PCR

ESPECIE	TAMAÑO(pb)
<i>C. albicans</i>	2,219; 1,391; 994
<i>C. glabrata</i>	1,049; 949
<i>C. guilliermondii</i>	2,864; 1,638; 935; 835; 585
<i>C. kefyr</i>	1,638; 1,508; 917; 667
<i>C. krusei</i>	3,052; 1,505; 961
<i>C. lusitaniae</i>	2,101; 1,982; 1,055; 836
<i>C. parapsilosis</i>	1,232; 759
<i>C. rugosa</i>	1,330; 1,036; 775; 498
<i>C. tropicalis</i>	1,839; 1,638; 810; 706; 602
<i>C. pelliculosa</i>	2,000; 830

Tabla 7. Prueba RAPD-PCR utilizada en la identificación de especies de *Candida* en comparación con la prueba Bioquímica API 32C

Especie	n	API 32C		RAPD-PCR		API 32C vs RAPD-PCR				f %	Sen %	Esp %	VP+ %	VP- %	Área ROC %
		+	-	+	-	+/+	+/-	-/+	-/-						
<i>C. albicans</i>	92	17	75	20	72	17	3	0	72	18.48	100.00	96.00	85.00	100.00	98.00
<i>C. dubliniensis</i>	92	2	90	0	92	0	0	2	90	2.17	0.00	100.00	0	97.82	—
<i>C. glabrata</i>	92	14	78	14	78	14	0	0	78	15.22	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
<i>C. guilliermondii</i>	92	10	82	10	82	10	0	0	82	10.87	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
<i>C. kefyr</i>	92	8	84	7	85	7	0	1	84	8.70	87.50	100.00	100.00	98.82	93.75
<i>C. krusei</i>	92	6	86	7	85	6	1	0	85	6.52	100.00	98.84	85.71	100.00	99.42
<i>C. lusitaniae</i>	92	9	83	11	81	9	2	0	81	9.78	100.00	97.59	81.82	100.00	98.80
<i>C. parapsilosis</i>	92	8	84	5	87	5	0	3	84	8.70	62.50	100.00	100.00	96.55	81.25
<i>C. tropicalis</i>	92	15	77	15	77	15	0	0	77	16.30	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
<i>C. rugosa</i>	92	1	91	2	90	1	1	0	90	1.09	100.00	98.90	50.00	100.00	—
<i>C. pelliculosa</i>	92	1	91	1	90	1	1	0	90	1.09	100.00	98.90	50.00	100.00	—
<i>C. colliculosa</i>	92	1	91	0	90	1	1	0	90	1.09	100.00	98.90	50.00	100.00	—
<b>Total</b>		92		92						100.00					

Sen = Sensibilidad, Esp = Especificidad, VP+ = Valor predictivo positivo, VP- = Valor predictivo negativo, Área

ROC = Área bajo la curva ROC, f = Frecuencia, n = Tamaño de la muestra

Tabla 8. PRUEBA BIOLÓGICA (FORMACIÓN DE TUBO GERMINATIVO EN LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Candida albicans</i> EN COMPARACIÓN CON LA PRUEBA BIOQUÍMICA API 32C															
Especie	N	API 32C		TUBO GERMINATIVO		ID 32C vs TUBO GERMINATIVO				f %	Sen %	Esp %	VP+ %	VP- %	Área ROC %
		+	-	+	-	+/+	+/-	-/+	-/-						
<i>C. albicans</i>	92	17	75	15	77	14	1	3	74	18.48	82.35	98.67	93.33	96.10	94.12

Sen = Sensibilidad, Esp = Especificidad, VP+ = Valor predictivo positivo, VP- = Valor predictivo negativo, Área

ROC = Área bajo la curva ROC, f = Frecuencia, n = Tamaño de la muestra

Tabla 9. PRUEBA BIOLÓGICA (PRODUCCIÓN DE CLAMIDOCONIDIOS) EN LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Candida albicans</i> EN COMPARACIÓN CON LA PRUEBA BIOQUÍMICA API 32C															
Especie	n	API 32C		CLAMIDOCONIDIOS		ID 32C vs CLAMIDOCONIDIOS				f %	Sen %	Esp %	VP+ %	VP- %	Área ROC %
		+	-	+	-	+/+	+/-	-/+	-/-						
<i>C. albicans</i>	92	17	75	13	79	13	0	4	75	18.48	76.47	100.00	100.00	94.94	86.24

Sen = Sensibilidad, Esp = Especificidad, VP+ = Valor predictivo positivo, VP- = Valor predictivo negativo, Área

ROC = Área bajo la curva ROC, f = Frecuencia, n = Tamaño de la muestra

<zFig. 5. PATRONES DE RAPD-PCR CON DNA GENÓMICO DE CEPAS DE COLECCIÓN Y EL PRIMER OPE-18.

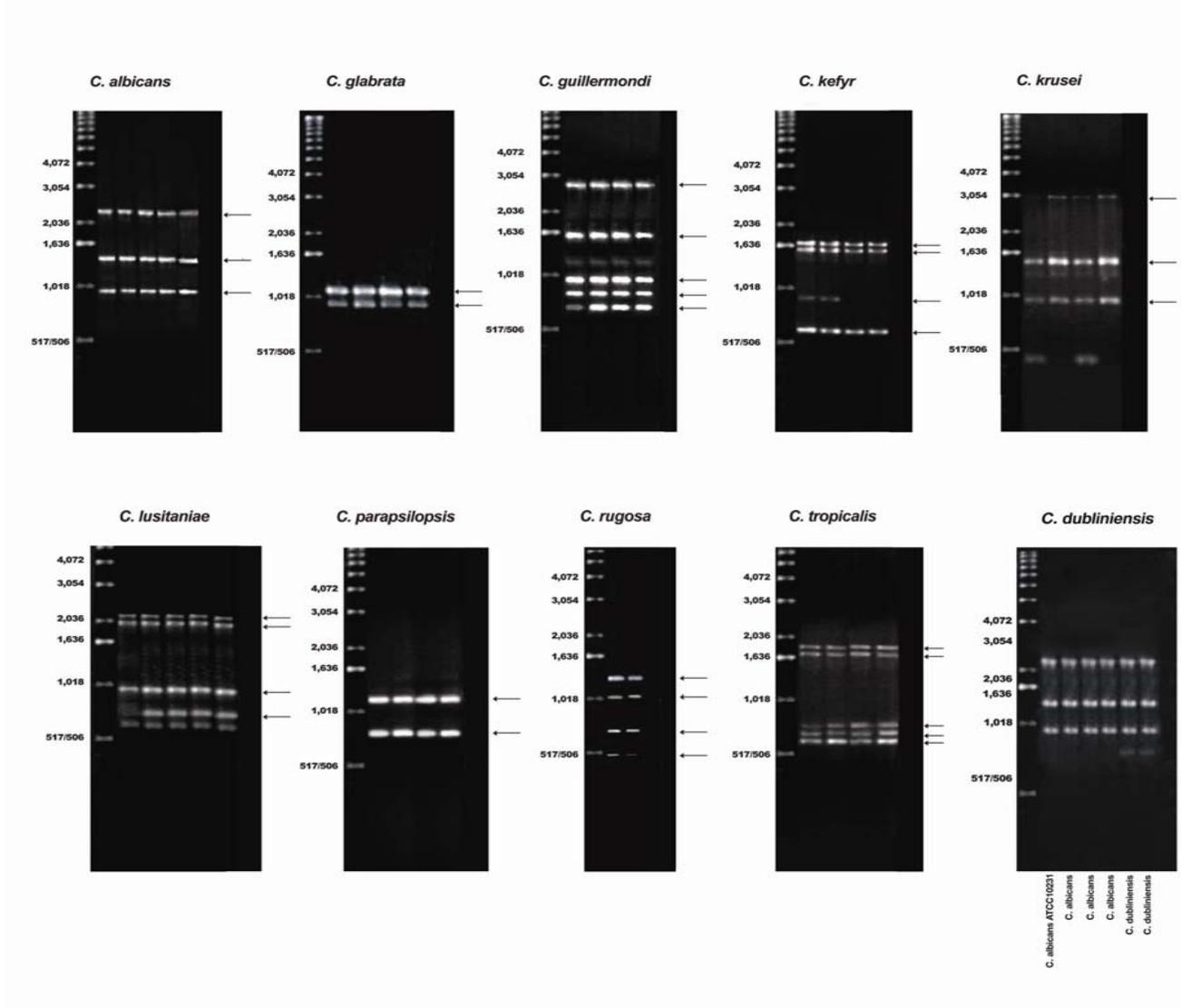
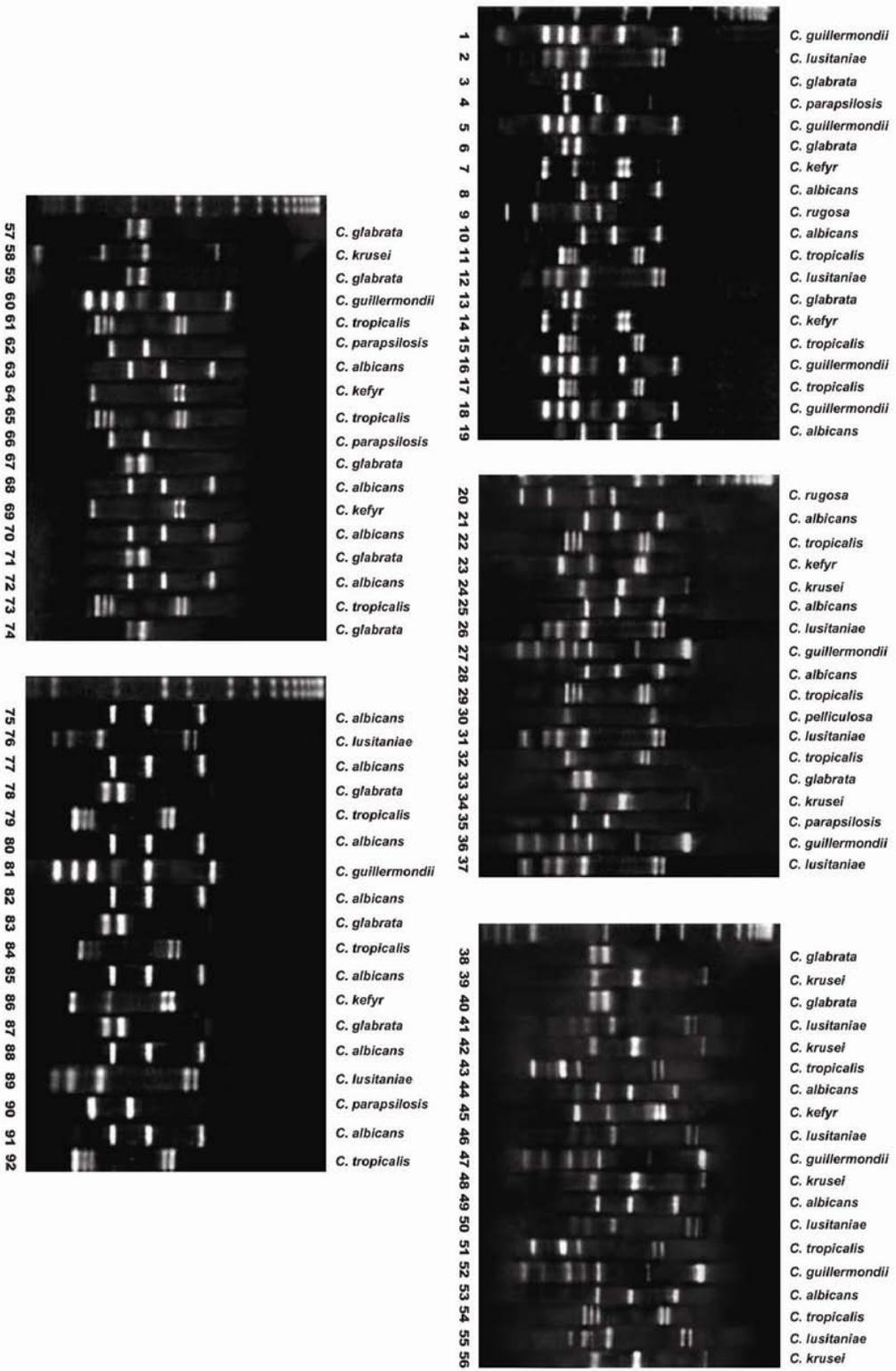


Fig. 6. PATRONES DE RAPD-PCR CON DNA GENÓMICO DE CEPAS DE COLECCIÓN Y EL PRIMER OPE-18.



## XI. DISCUSIÓN

El método del tubo germinativo, ha sido y es la prueba biológica más empleada para la detección de *C. albicans*; sin embargo, este método posee las siguientes desventajas: un 5% de los aislamientos de *C. albicans* no producen estas estructuras, y, además, pueden presentarse falso positivos en otras especies del género como *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* que producen estructuras semejantes a un tubo germinativo [Mackenzie, 1962].

Esto puede ser corroborado con los resultados de nuestro estudio ya que al comparar la formación de tubo germinativo con la prueba bioquímica API 32C, encontramos que el API 32C identificó 17 aislamientos como *C. albicans*, mientras que la prueba de formación de tubo germinativo identificó 15 aislamientos como *C. albicans*, de los cuales uno resultó falso positivo, representando éste último el 6.6% de los aislamientos, valor cercano al reportado en la literatura [Mackenzie, 1962].

Los 92 aislamientos incluidos en nuestro estudio fueron identificados a nivel de especie con la prueba molecular RAPD-PCR (amplificación aleatoria de DNA polimórfico) con el primer OPE-18 siguiendo el método de Lockhart et al [1997].

Los patrones obtenidos fueron especie-específicos; sin embargo al contrastar el patrón de bandeo que obtuvimos para las diferentes especies incluidas en nuestro trabajo con el patrón de bandeo de otros estudios, encontramos importantes diferencias. Ejemplo de ello se ilustra en la Fig. 7 en la que incluimos el patrón de bandeo que

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<p><b>Al Mosaid</b> A, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. Differentiation of <i>Candida dubliniensis</i> from <i>Candida albicans</i> on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. J Clin Microbiol 2001;39(1):323-7.</p>
<p><b>Arendorf</b> TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. Br Dent J 1979;147(10):267-72.</p>
<p><b>Bautista-Munoz</b> C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C. Identification of <i>Candida</i> spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between <i>Candida albicans</i> and <i>Candida dubliniensis</i> by direct PCR methods. J Clin Microbiol 2003;41(1):414-20.</p>
<p><b>Berenguer</b> J, Diaz-Guerra TM, Ruiz-Diez B, Bernaldo de Quiros JC, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant <i>Candida albicans</i> strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patient. J Clin Microbiol 1996;34(6):1542-5.</p>
<p><b>Boerlin</b> P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Dorussel C, Pagani JL, Chave JP and Billie J. Typing <i>Candida albicans</i> oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1996;34:1235-1248.</p>
<p><b>Boerlin</b> P, Boerlin-Petzold F, Dorussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JP, et al. Cluster of oral atypical <i>Candida albicans</i> isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. J Clin Microbiol 1995;33(5):1129-35.</p>
<p><b>Borg</b> M, Ruchel R. Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of <i>Candida albicans</i> and <i>Candida tropicalis</i>. J Med Vet Mycol 1990;28(1):3-14.</p>
<p><b>Boschman</b> CR, Bodnar UR, Tornatore MA, Obias AA, Noskin GA, Englund K, et al. Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center. Antimicrob Agents Chemother 1998;42(4):734-8.</p>
<p><b>Cabib</b> E, Roberts R, Bowers B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. Annu Rev Biochem 1982;51:763-93.</p>
<p><b>Calderone</b> RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of <i>Candida albicans</i>. Microbiol Rev 1991;55(1):1-20.</p>
<p><b>Calderone</b> RA. <i>Candida</i> and Candidiasis. Washintong DC; 2002.</p>
<p><b>Chaffin</b> WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of <i>Candida albicans</i>: identification, function, and expression. Microbiol</p>

Mol Biol Rev 1998;62(1):130-80.
<b>Chang</b> HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. J Clin Microbiol 2001;39(10):3466-71.
<b>Chattaway</b> FW, Bishop R, Holmes MR, Odds FC, Barlow AJ. Enzyme activities associated with carbohydrate synthesis and breakdown in the yeast and mycelial forms of <i>Candida albicans</i> . J Gen Microbiol 1973;75(1):97-109.
<b>CIOMS</b> . Council for International Organizations of Medical Sciences: Mycoses. International nomenclature of diseases, CIOMS (World Health Organization), 1982, II, part 2
<b>Clemons</b> KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among <i>Candida albicans</i> isolates from different geographic locales by three genotypic methods. J Clin Microbiol 1997;35(6):1332-6.
<b>Coleman</b> DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of <i>Candida</i> species other than <i>Candida albicans</i> as opportunistic pathogens. Med Mycol 1998; 36 (Suppl 1): 156-165.
<b>Collier</b> L, Balouws A, Sussman M. Microbiology and Microbial Infections. 9 ed. New York; 1998.
<b>Corliss</b> JO. Should there be a separate code of nomenclature for the protists? Biosystems 1992;28(1-3):1-14.
<b>Corner</b> BE, Magee PT. <i>Candida</i> pathogenesis: unravelling the threads of infection. Curr Biol 1997;7(11):R691-4.
<b>Crampin</b> AC, Matthews RC, Hall D, Evans EGV. PCR fingerprinting <i>Cryptococcus neoformans</i> by random amplification of polymorphic DNA. J Med Vet Mycol 1993; 31:463-465.
<b>Cresti</b> S, Posteraro B, Sanguinetti M, Guglielmetti P, Rossolini GM, Morace G, et al. Molecular typing of <i>Candida</i> spp. by random amplification of polymorphic DNA and analysis of restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA repeats. New Microbiol 1999;22(1):41-52.
<b>Cutler</b> JE. Putative virulence factors of <i>Candida albicans</i> . Annu Rev Microbiol 1991;45:187-218.
<b>Dassanayake</b> RS, Samaranayake LP. Characterization of the genetic diversity in superficial and systemic human isolates of <i>Candida parapsilosis</i> by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Apmis 2000;108(2):153-60.
<b>De Backer</b> MD, Magee PT, Pla J. Recent developments in molecular genetics of <i>Candida albicans</i> . Annu Rev Microbiol 2000;54:463-98.

<b>Dembry</b> LM, Vazquez JA, Zervos MJ. DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. <i>Infect Control Hosp Epidemiol</i> 1994;15(1):48-53.
<b>Diaz-Guerra</b> TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among <i>Candida albicans</i> isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. <i>J Clin Microbiol</i> 1997; 35:856-861.
<b>Dorocka-Bobkowska</b> B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. <i>J Oral Pathol Med</i> 1996;25(8):411-5.
<b>Einsele</b> H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. <i>J Clin Microbiol</i> 1997;35(6):1353-60.
<b>Ellsworth</b> DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artfactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. <i>Biotechniques</i> 1993(2);14:214-217.
<b>Elorza</b> MV, Rico H, Gozalbo D, Sentandreu R. Cell wall composition and protoplast regeneration in <i>Candida albicans</i> . <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> 1983;49(4-5):457-69.
<b>Fenn</b> JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, et al. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. <i>J Clin Microbiol</i> 1994;32(5):1184-7.
<b>Fletcher</b> J, Mather J, Lewis MJ, Whiting G. Mouth lesions in iron-deficient anemia: relationship to <i>Candida albicans</i> in saliva and to impairment of lymphocyte transformation. <i>J Infect Dis</i> 1975;131(1):44-50.
<b>Freydiere</b> AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid identification of <i>Candida albicans</i> and <i>C. krusei</i> colonies. <i>J Clin Microbiol</i> 1997;35(4):877-80.
<b>Freydiere</b> AM, Buchaille ML and Guille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of <i>Candida</i> species in clinical specimens. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> 1997;16:464-467.
<b>Gopal</b> P, Sullivan PA, Shepherd MG. Enzymes of N-acetylglucosamine metabolism during germ-tube formation in <i>Candida albicans</i> . <i>J Gen Microbiol</i> 1982;128(10):2319-26.
<b>Gopal</b> PK, Shepherd MG, Sullivan PA. Analysis of wall glucans from yeast, hyphal and germ-tube forming cells of <i>Candida albicans</i> . <i>J Gen Microbiol</i> 1984;130(12):3295-301.
<b>Greenfield</b> RA. Host defense system interactions with <i>Candida</i> . <i>J Med Vet Mycol</i> 1992;30(2):89-104.

<b>Guarro</b> J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. <i>Clinical Microbiology Reviews</i> 1999;12(3):454-500.
<b>Gwakisa</b> PS, Kemp SJ, Teale AJ. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. <i>Anim Genet</i> 1994, 25:89-94.
<b>Hanley</b> JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. <i>Radiology</i> 1982;143:29-36.
<b>Hawksworth</b> DL. [Fungi and biodiversity: international incentives]. <i>Microbiologia</i> 1997;13(2):221-6.
<b>Hawser</b> SP, Douglas LJ. Biofilm formation by <i>Candida</i> species on the surface of catheter materials in vitro. <i>Infect Immun</i> 1994;62(3):915-21.
<b>Hazen</b> KC. New and emerging yeast pathogens. <i>Clin Microbiol Rev</i> 1995;8(4):462-78.
<b>Higgs</b> JM. Chronic mucocutaneous candidiasis: iron deficiency and the effects of iron therapy. <i>Proc R Soc Med</i> 1973;66(8):802-4.
<b>Holmberg</b> K, Feroze F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for genotypic mapping of <i>Candida albicans</i> strains. <i>J Ciin Lab Anal</i> 1996; 10:59-69.
<b>Hoppe</b> , JE and Frey P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of <i>Candida albicans</i> . <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> 1999;18:188-191.
<b>Howard</b> DH. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. <i>Clin Microbiol Rev</i> 1999;12(3):394-404.
<b>Howell</b> SA, Anthony RM, Power E. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of <i>Candida albicans</i> . <i>Lett Appl Microbiol</i> 1996;22(2):125-8.
<b>Hull</b> CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the "asexual" yeast <i>Candida albicans</i> in a mammalian host. <i>Science</i> 2000;289(5477):307-10.
<b>Iwaguchi</b> S, Homma M, Tanaka K. Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in <i>Candida albicans</i> . <i>J Gen Microbiol</i> 1990;136(12):2433-42.
<b>Jarvis</b> WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on <i>Candida</i> species. <i>Clin Infect Dis</i> 1995;20(6):1526-30.
<b>Jones</b> JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. <i>Clin Microbiol Rev</i>

1990;3(1):32-45.
<b>Kapteyn JC, Montijn RC, Dijkgraaf GJ, Klis FM.</b> Identification of beta-1,6-glycosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of <i>Candida albicans</i> . Eur J Cell Biol 1994;65(2):402-7.
<b>King D, Rhine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA, Merz WG.</b> Comparison of four DNA-based methods for strain delineation of <i>Candida lusitanae</i> . J Clin Microbiol 1995;33(6):1467-70.
<b>Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, Sanchez SE, Cantu RA, Rinaldi MG, Patterson TF.</b> Detection of <i>Candida dubliniensis</i> in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar <i>Candida</i> screening and susceptibility testing of isolates. J Clin Microbiol 1998; 36:3007-3012.
<b>Klis FM, Caro LH, Vossen JH, Kapteyn JC, Ram AF, Montijn RC, et al.</b> Identification and characterization of a major building block in the cell wall of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Biochem Soc Trans 1997;25(3):856-60.
<b>Klotz SA, Smith RL.</b> A fibronectin receptor on <i>Candida albicans</i> mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. J Infect Dis 1991;163(3):604-10.
<b>Kobayashi H, Suzuki J, Tanaka S, Kiuchi Y, Oyamada H, Iwadate N, et al.</b> Structure of a cell wall mannan from the pathogenic yeast, <i>Candida catenulata</i> : assignment of <sup>1</sup> H nuclear magnetic resonance chemical shifts of the inner alpha-1,6-linked mannose residues substituted by a side chain. Arch Biochem Biophys 1997;341(1):70-4.
<b>Krogh P, Hald B, Holmstrup P.</b> Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting <i>Candida albicans</i> and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. Carcinogenesis 1987;8(10):1543-8.
<b>Ladgé JP, Boucias D.</b> Fungal Cell Wall and Immune response. London; 1990.
<b>Lamey PJ, Samaranayake LP.</b> Oral candidosis: 2. Diagnosis and management. Dent Update 1988;15(8):328-31.
<b>Land GA, Salkin IF, el-Zaatari M, McGinnis MR, Hashem G.</b> Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based yeast identification system. J Clin Microbiol 1991;29(4):718-22.
<b>Lehmann PF, Lin D, Lasker BA.</b> Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus <i>Candida</i> by using random amplified polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1992;30(12):3249-54.

<p><b>Levin I</b>, Crittenden LB, Dodgson JB. Genetic map of the chicken Z chromosome using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. <i>Genomics</i> 1993; 16:224-230</p>
<p><b>Lischewski A</b>, Ruhnke M, Tennagen I, Schonian G, Morschhauser J, Hacker J. Molecular epidemiology of <i>Candida</i> isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. <i>J Clin Microbiol</i> 1995;33(3):769-71.</p>
<p><b>Lockhart SR</b>, Fritch JJ, Meier AS, Schröppel K, Srikantha T, Galask R and Soll DR. Colonizing populations of <i>Candida albicans</i> are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. <i>J. Clin. Microbiol</i> 1995;33:1501-1509.</p>
<p><b>Lockhart SR</b>, Joly S, Pujol C, Sobel JD, Pfaller MA, Soll DR. Development and verification of fingerprinting probes for <i>Candida glabrata</i>. <i>Microbiology</i> 1997;143 (Pt 12):3733-46.</p>
<p><b>Mackenzie DWR</b>. Serum germ tube identifications of <i>Candida albicans</i>. <i>J Clin Pathol</i>. 1962; 15:563-565.</p>
<p><b>Magee PT</b>. Which came first, the hypha or the yeast? <i>Science</i> 1997;277(5322):52-3.</p>
<p><b>Maniatis</b>, Sambrook, Fritsch. Molecular Cloning, a laboratory manual. <i>Cold Spring Harbor Laboratory Press</i>. 1989;13:42.</p>
<p><b>Marco F</b>, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, et al. Elucidating the origins of nosocomial infections with <i>Candida albicans</i> by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. <i>J Clin Microbiol</i> 1999;37(9):2817-28.</p>
<p><b>Martin C</b>, Roberts D, van Der Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. <i>J Clin Microbiol</i> 2000;38(10):3735-42.</p>
<p><b>Matthews R</b>. Molecular and cell biology of opportunistic infections in AIDS. <i>Candida</i>. <i>Mol Cell Biol Hum Dis Ser</i> 1993;2:205-28.</p>
<p><b>Melo AS</b>, de Almeida LP, Colombo AL, Briones MR. Evolutionary distances and identification of <i>Candida</i> species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). <i>Mycopathologia</i> 1998;142(2):57-66.</p>
<p><b>Meyer W</b>, Maszewska K, Sorrell TC. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between <i>Candida dubliniensis</i> and <i>Candida albicans</i>. <i>Med Mycol</i> 2001;39(2):185-93.</p>
<p><b>Mitchell TG</b>, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. <i>J Med Vet Mycol</i> 1994;32 Suppl 1:351-66.</p>

<p><b>Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, et al.</b> PCR-restriction enzyme analysis for detection of <i>Candida</i> DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. <i>J Clin Microbiol</i> 1999;37(6):1871-5.</p>
<p><b>Niesters HG, Goessens WH, Meis JF, Quint WG.</b> Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for <i>Candida</i> species. <i>J Clin Microbiol</i> 1993;31(4):904-10.</p>
<p><b>Odds FC, Abbott AB.</b> A simple system for the presumptive identification of <i>Candida albicans</i> and differentiation of strains within the species. <i>Sabouraudia</i> 1980;18(4):301-17.</p>
<p><b>Odds FC.</b> <i>Candida</i> infections: an overview. <i>Crit Rev Microbiol</i> 1987;15(1):1-5.</p>
<p><b>Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD.</b> <i>Candida</i> concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. <i>J Med Vet Mycol</i> 1988;26(5):277-83.</p>
<p><b>Odds F, Arai T, Disalvo A.</b> Nomenclature of the fungal diseases: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). <i>Journal of Veterinary and Medical Mycology</i> 1992;30:1-10</p>
<p><b>Odds FC.</b> Pathogenesis of <i>Candida</i> infections. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1994;31(3 Pt 2):S2-5.</p>
<p><b>Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Lutticken R, Haase G.</b> Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the microbial identification system (MIS) for <i>Candida (Torulopsis) glabrata</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. <i>Diagn Microbiol Infect Dis</i> 2000;38(4):213-21.</p>
<p><b>Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K.</b> Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. <i>PCR Methods Appl</i> 1993;2(4):341-345.</p>
<p><b>Pfaller MA.</b> Epidemiology of candidiasis. <i>J Hosp Infect</i> 1995;30 Suppl:329-38.</p>
<p><b>Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, et al.</b> Emerging pathogens. <i>Med Mycol</i> 2000;38 Suppl 1:225-36.</p>
<p><b>Ponton J.</b> Microbiological diagnosis of mycoses. <i>Rev Iberoam Micol</i> 2002;19(1):25-29.</p>
<p><b>Pope LM, Cole GT.</b> SEM studies of adherence of <i>Candida albicans</i> to the gastrointestinal tract of infant mice. <i>Scan Electron Microsc</i> 1981(Pt 3):73-80.</p>
<p><b>Powderly WG, Robinson K, Keath EJ.</b> Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. <i>J Infect Dis</i> 1993;168(2):463-6.</p>

<b>Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR.</b> Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting <i>Candida albicans</i> . J Clin Microbiol 1997;35(9):2348-58.
<b>Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Ruesga MT, Alonso-Vargas R, Miranda Y, Tur-Tur C, et al.</b> In vitro activity of a new liposomal nystatin formulation against opportunistic fungal pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19(8):645-8.
<b>Quindos G, San Millán R, Robert R, Bernard C, Pontón J.</b> Evaluation of Bichro-latex Albicans, a new method for rapid identification of <i>Candida albicans</i> . Journal of Clinical Microbiology 1997; 35: 1263-1265.
<b>Ram SP, Sullivan PA, Shepherd MG.</b> The in situ assay of <i>Candida albicans</i> enzymes during yeast growth and germ-tube formation. J Gen Microbiol 1983;129(8):2367-78.
<b>Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, Rinaldi MG, Del Vecchio VG.</b> DNA fingerprinting of <i>Candida rugosa</i> via repetitive sequence-based PCR. J Clin Microbiol 1996;34(7):1677-81.
<b>Reiss E, Morrison CJ.</b> Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Microbiol Rev 1993;6(4):311-23.
<b>Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais JP.</b> Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med Mycol 1998;36 Suppl 1:249-57.
<b>Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, Serody J, Edwards JE, et al.</b> Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. Clin Infect Dis 1995;21(4):994-6.
<b>Rousselle P, Freydiere AM, Coullierot PJ, de Montelos H and Guille Y.</b> Rapid identification of <i>Candida albicans</i> by using Albicans Id and fluoroplate agar plates. J Clin Microbiol 1994;32(12):3034-3036.
<b>Salkin, IF, Land NJ, Hurd and McGinnis PR.</b> Evaluation of Yestident and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. J Clin Microbiol 1987;25:625-627.
<b>Samaranayake LP, MacFarlane TW.</b> A retrospective study of patients with recurrent chronic atrophic candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1981;52(2):150-3.
<b>Samaranayake LP.</b> Oral candidosis: an old disease in new guises. Dent Update 1990;17(1):36-8.
<b>Sansinforiano, M.E.; Rabasco, A.; Martínez-Trancón, M. et al.</b> - Optimización de las condiciones RAPD-PCR en <i>Candida</i> spp. y <i>Cryptococcus</i> spp. Rev Iberoamer. Micol., 18: 65-69, 2001.

<p><b>San Millan R</b>, Ezkurra PA, Quindos G, Robert R, Senet JM, Ponton J. Effect of monoclonal antibodies directed against <i>Candida albicans</i> cell wall antigens on the adhesion of the fungus to polystyrene. <i>Microbiology</i> 1996;142 (Pt 8):2271-7.</p>
<p><b>Sandhu RS</b>, Mehta SK, Khan ZU, Singh MM. Role of <i>Aspergillus</i> and <i>Candida</i> species in allergic bronchopulmonary mycoses. A comparative study. <i>Scand J Respir Dis</i> 1979;60(5):235-42.</p>
<p><b>Scherer S</b> &amp; Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of <i>Candida</i> species. <i>J Clin Microbiol</i> 1987;25:675-679.</p>
<p><b>Schmid J</b>, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of <i>Candida albicans</i> strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. <i>J Clin Microbiol</i> 1992;30(4):935-41.</p>
<p><b>Schoofs A</b>, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of <i>Candida dubliniensis</i> isolates from HIV-infected patients. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> 1997; 16:296-300.</p>
<p><b>Scully C</b>, el-Kabir M, Samaranayake LP. <i>Candida</i> and oral candidosis: a review. <i>Crit Rev Oral Biol Med</i> 1994;5(2):125-57.</p>
<p><b>Seelig MS</b>. The role of antibiotics in the pathogenesis of <i>Candida</i> infections. <i>Am J Med</i> 1966;40(6):887-917.</p>
<p><b>Shepherd MG</b>, Poulter RT, Sullivan PA. <i>Candida albicans</i>: biology, genetics, and pathogenicity. <i>Annu Rev Microbiol</i> 1985;39:579-614.</p>
<p><b>Shin JH</b>, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of <i>Candida</i> species in blood cultures by a clinically useful PCR method. <i>J Clin Microbiol</i> 1997;35(6):1454-9.</p>
<p><b>Siegman-Igra Y</b>, Rabaw MY. Failure of fluconazole in systemic candidiasis. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> 1992;11(2):201-2.</p>
<p><b>Singh B</b>, Datta A. Regulation of N-acetylglucosamine uptake in yeast. <i>Biochim Biophys Acta</i> 1979;557(1):248-58.</p>
<p><b>Soll DR</b>. High-frequency switching in <i>Candida albicans</i>. <i>Clin Microbiol Rev</i> 1992;5(2):183-203.</p>
<p><b>Soll DR</b>. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. <i>Clin Microbiol Rew.</i> 2000; 332-370.</p>
<p><b>Staib P</b>, Kretschmar M, Nichterlein T, Kohler G, Michel S, Hof H, et al. Host-induced, stage-specific virulence gene activation in <i>Candida albicans</i> during infection. <i>Mol Microbiol</i> 1999;32(3):533-46.</p>

<p><b>Steffan P</b>, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Akins RA. Identification of <i>Candida</i> species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. In: J Clin Microbiol; 1997. p. 2031-9.</p>
<p><b>Sullivan DJ</b>, Yin CY, Molloy C, Templeton MD, Shepherd MG. An analysis of the metabolism and cell wall composition of <i>Candida albicans</i> during germ-tube formation. Can J Microbiol 1983;29(11):1514-25.</p>
<p><b>Sullivan DJ</b>, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, Shanley D and Coleman D. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of <i>Candida</i> species other than <i>C. albicans</i> and of atypical <i>Candida</i> species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. J Clin Microbiol 1993;31:2124-2133.</p>
<p><b>Sullivan DJ</b>, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. <i>Candida dubliniensis</i> sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995;141 (Pt 7):1507-21.</p>
<p><b>Sweet SP</b>, Douglas LJ. Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of <i>Candida albicans</i>. J Gen Microbiol 1991;137(4):859-65.</p>
<p><b>Taylor J</b>, Jacobson D, Fisher M. THE EVOLUTION OF ASEXUAL FUNGI: Reproduction, Speciation and Classification. Annu Rev Phytopathol 1999;37:197-246.</p>
<p><b>Thanos M</b>, Schönian G, Meyer W, Schweynoch C, Graser Y, Mitchell T, Presber W, Tietz H. Rapid identification of <i>Candida</i> species by DNA fingerprinting with PCR. J Clin Microbiol 1996; 34(3):615-621.</p>
<p><b>Vazquez JA</b>, Gupta S, Villanueva A. Potential utility of recombinant human GM-CSF as adjunctive treatment of refractory oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17(11):781-3.</p>
<p><b>Voss A</b>, Pfaller MA, Hollis RJ, Rhine-Chalberg J and Doebbeling BN. Investigation of <i>Candida albicans</i> transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods.. J Clin Microbiol 1995;33:576-580.</p>
<p><b>Wahyuningsih R</b>, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of <i>Candida albicans</i> DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol 2000;38(8):3016-21.</p>
<p><b>Welsh J</b>, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 1990; 18:7213-7218.</p>
<p><b>White TC</b>, Agabian N. <i>Candida albicans</i> secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J Bacteriol</p>

1995;177(18):5215-21.
<b>Williams</b> , J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. <i>Nucleic Acids Res.</i> 1990. 18(22): 6531-6535.
<b>Williams</b> DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of <i>Candida</i> species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. <i>J Clin Microbiol</i> 1995;33(9):2476-9.
<b>Willinger</b> B, Berger A, Li L, Hirschl AM, Aspöck C, Makristathis AI. Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting <i>Candida albicans</i> . <i>Lett Appl Microbiol</i> 1994;18:47-49.
<b>Wingard</b> JR. Importance of <i>Candida</i> species other than <i>C. albicans</i> as pathogens in oncology patients. <i>Clin Infect Dis</i> 1995;20(1):115-25.
<b>Wipf</b> , D., A. Fribourg, J. C. Munch, B. Botton and F. Buscot. Diversity of the internal transcribed spacer of rDNA in morels. <i>Can. J. Microbiol</i> 1999;45:769-778.
<b>Wu</b> T, Samaranayake LP. The expression of secreted aspartyl proteinases of <i>Candida</i> species in human whole saliva. <i>J Med Microbiol</i> 1999;48(8):711-20.
<b>Yates-Siilata</b> KE, Sander DM, Keath EJ. Genetic diversity in clinical isolates of the dimorphic fungus <i>Blastomyces dermatitidis</i> detected by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. <i>J Clin Microbiol</i> 1995;33(8):2171-5.
<b>Yerushalmy</b> J. Statical problems in assesing methods of medical diagnosis, with special reference To X-ray tchniques. <i>Public Health Rep</i> 1947;62:1432-1449.