



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Candida*
PROVENIENTES DEL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, SSA. OPD.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ISRAEL MARTÍNEZ ESPINOSA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. ABEL GUTIÉRREZ RAMOS
VOCAL: QFB. MISAEL GONZÁLEZ IBARRA
SECRETARIA: DRA. HAYDEE TORRES GUERRERO
1er. SUPLENTE: DRA. SVETANKA DIMITROVA DINKOVA
2° SUPLENTE: QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICOLOGÍA BÁSICA, UNIDAD DE MEDICINA
EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

LABORATORIO DE INMUNOALERGOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICA, DIVISIÓN
DE INVESTIGACIÓN, HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, SSA. OPD.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. HAYDEE TORRES GUERRERO

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. MISAEL GONZÁLEZ IBARRA

SUSTENTANTE (S):

ISRAEL MARTÍNEZ ESPINOSA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	3
CANDIDOSIS	7
ASPECTOS CLÍNICOS	10
CANDIDOSIS SUPERFICIALES	10
CANDIDOSIS PROFUNDAS	12
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	12
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE PRUEBAS FENOTÍPICAS	13
ESTRUCTURA DEL GENOMA	16
CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DE <i>CANDIDA</i>	19
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i>	19
POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP).....	21
GENOTIPIFICACIÓN DE <i>C. ALBICANS</i> MEDIANTE MICROSATÉLITES	22
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y CEPAS.....	25
DIAGNÓSTICO DE CANDIDOSIS POR EXAMEN DIRECTO.....	25
AISLAMIENTO A PARTIR DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	26
IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	26
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS	30
EXTRACCIÓN DE DNA	30
AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS POR PCR	30
DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO ITS CON <i>MspI</i> (PCR-RFLP).....	31
DIFERENCIACIÓN DE <i>C. ALBICANS</i> Y <i>C. DUBLINIENSIS</i>	31
AMPLIFICACIÓN CON <i>PRIMERS</i> DUB DEL INTRÓN DEL GEN <i>ACT1</i> DE <i>C. DUBLINIENSIS</i>	31
DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO ITS CON <i>AvrII</i> (PCR-RFLP)	32
AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES DE <i>C. ALBICANS</i>	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RESULTADOS.....	35
DATOS DE PACIENTES Y AISLAMIENTOS	35
DIAGNÓSTICO DE CANDIDOSIS EN LABORATORIO DE RUTINA.....	36

IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	41
IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES.....	45
IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA</i> MEDIANTE PCR-RFLP CON <i>MspI</i>	46
DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE <i>C. ALBICANS</i> / <i>C. DUBLINIENSIS</i> PCR-RFLP CON <i>AvrII</i>	49
AMPLIFICACIÓN CON <i>PRIMERS DUB</i>	50
COMPARACIÓN ENTRE LA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y LA MOLECULAR.....	51
GENOTIPIFICACIÓN DE <i>C. ALBICANS</i> CON MICROSATÉLITES	54
DISCUSIÓN.....	68
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i>	68
FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE <i>CANDIDA</i>	70
GENOTIPIFICACIÓN DE <i>C. ALBICANS</i>	71
CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS	75
ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS	82
MEDIOS DE CULTIVO.....	82
SOLUCIONES PARA PCR.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. MORFOLOGÍAS MICROSCÓPICAS DE <i>CANDIDA</i>	4
TABLA 1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	5
FIGURA 2. DIMORFISMO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	6
FIGURA 3. MORFOLOGÍAS COLONIALES DE <i>C. ALBICANS</i> QUE SE OBSERVAN EN EL SWITCHING.....	7
CUADRO 1. VARIEDADES CLÍNICAS DE LA CANDIDOSIS. MODIFICADA DE ARENAS, 2008.	10
FIGURA 4. VARIEDADES CLÍNICAS DE LA CANDIDOSIS SUPERFICIAL.....	11
FIGURA 5. CANDIDOSIS GASTROINTESTINAL	13
FIGURA 6. CHROMAGAR <i>CANDIDA</i> , MEDIO CROMOGENICO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i>	14
TABLA 2. PRUEBAS FENOTÍPICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE <i>C. DUBLINIENSIS</i>	15
FIGURA 7. AGAR TABACO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE <i>C. ALBICANS</i> Y <i>C. DUBLINIENSIS</i>	15
FIGURA 8. ESTRUCTURA DEL rDNA, TRANSCRIPCIÓN Y PLEGAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES 18S, 5.8S Y 28S.	17
FIGURA 9. MECANISMO DE AUMENTO DE NÚMERO DE REPETICIONES DE UN MICROSATÉLITE.....	18
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS GENOMAS DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>CANDIDA</i>	19
FIGURA 10. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA	20
FIGURA 11. DIFERENCIACIÓN DE <i>C. ALBICANS</i> Y <i>C. DUBLINIENSIS</i> MEDIANTE PCR CON PRIMERS DUB.	21
FIGURA 12. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> POR PCR-RFLP UTILIZANDO MSPI.	22
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE MICROSATÉLITES ESPECÍFICOS DE <i>C. ALBICANS</i> . MODIFICADO DE SAMPAIO, 2005.	23
TABLA 5. SUSTRATOS QUE CONTIENE LA TIRA API 20C YEAST	27
FIGURA 13. ESQUEMA DEL MONTAJE DE LA TIRA API 20C YEAST.....	28
TABLA 6. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE <i>CANDIDA</i> SPP.	29
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE EDADES Y SEXO DE PACIENTES CON CANDIDOSIS DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO.....	35
TABLA 7. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS DE <i>CANDIDA</i> OBTENIDOS POR TIPO DE MUESTRA.....	37
FIGURA 15. ONICOMICOSIS POR <i>CANDIDA</i>	37
FIGURA 16. CANDIDOSIS CUTÁNEA EN INTERTRIGO SUBMAMARIO.....	38
FIGURA 17. CANDIDOSIS ORAL EN PACIENTE VIH/SIDA.....	38
FIGURA 18. EXAMEN DIRECTO CON KOH AL 20% DE RASPADO DE UÑAS (40x).....	39
FIGURA 19. EXAMEN DIRECTO CON KOH AL 20% DE ESPUTO (40x).	40
FIGURA 20. EXAMEN DIRECTO DE SEDIMENTO URINARIO (40x).	40
FIGURA 21. HEMOCULTIVO DE <i>C. ALBICANS</i> Y DESARROLLO EN ADS, MICOSEL Y BIGGY	41
FIGURA 22. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE <i>C. ALBICANS</i>	42
FIGURA 23. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>C. DUBLINIENSIS</i>	43
FIGURA 24. COLONIAS DE <i>C. TROPICALIS</i> EN CHROMAGAR <i>CANDIDA</i>	43
FIGURA 25. COLONIAS DE <i>C. GLABRATA</i> EN CHROMAGAR <i>CANDIDA</i>	44
FIGURA 26. PERFIL DE ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE <i>C. LUSITANIAE</i>	44

FIGURA 27. COLONIAS DE <i>C. LUSITANIAE</i> EN CHROMAGAR <i>CANDIDA</i>	45
FIGURA 28. A) PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LOS <i>PRIMERS</i> ITS Y B) DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS CON <i>MspI</i>	46
FIGURA 29. IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>CANDIDA</i> POR PCR-RFLP CON <i>MspI</i>	47
FIGURA 30. PATRONES DE ITS Y DIGESTIÓN CON <i>MspI</i> DEL AISLAMIENTO 464-12 (IDENTIFICADO COMO <i>C. LUSITANIAE</i>).	47
TABLA 8. TAMAÑO DE LOS AMPLIFICADOS CON LOS <i>PRIMERS</i> ITS Y DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN CON <i>MspI</i>	48
TABLA 9. AISLAMIENTOS IDENTIFICADOS INCORRECTAMENTE POR MÉTODOS FENOTÍPICOS Y CORREGIDOS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES.....	49
FIGURA 31. DIGESTIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS CON ITS1 E ITS4 CON <i>AvrII</i>	50
FIGURA 32. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LOS <i>PRIMERS</i> DUB.....	50
TABLA 10. FRECUENCIA DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> AISLADAS EN EL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO.....	51
FIGURA 33. FRECUENCIA DE CANDIDOSIS CAUSADAS POR <i>C. ALBICANS</i> Y ESPECIES NO <i>ALBICANS</i>	52
TABLA 11. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> COMO AGENTE CAUSAL EN DIFERENTES TIPOS DE CANDIDOSIS. IVU. INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS, ITR. INFECCIÓN DE TRACTO RESPIRATORIO.	52
FIGURA 34. BANDAS ESPECÍFICAS DE <i>C. LUSITANIAE</i> OBTENIDAS POR PCR-RFLP CON <i>MspI</i> EN TRES AISLAMIENTOS	53
FIGURA 35. AISLAMIENTOS DE <i>CANDIDA</i> IDENTIFICADOS POR PCR-RFLP CON <i>MspI</i>	53
FIGURA 36. PRODUCTOS DE LOS <i>PRIMERS</i> CAI, CAIII Y CAVI DE LOS AISLAMIENTOS 501-09, 423-12 Y 401-12.	55
FIGURA 37. PERFILES OBTENIDOS CON PEAKSCANNER DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS CON LOS <i>PRIMERS</i> CAI, CAIII Y CAVI DE LOS AISLAMIENTOS 164-12B Y CA-84.	56
TABLA 12. GENOTIPOS DE LOS AISLADOS DE <i>C. ALBICANS</i> DE ACUERDO AL NÚMERO DE REPETICIONES DE LOS <i>LOCI</i> CAI, CAIII Y CAVI. A1. ALELO 1, A2. ALELO 2.	57
TABLA 13. CARACTERÍSTICAS DE LOS <i>LOCI</i> MICROSATÉLITES TRABAJADOS EN ESTE ESTUDIO	58
FIGURA 38. DENDROGRAMA CIRCULAR QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> DE ACUERDO A LA DISTANCIA GENÉTICA CALCULADA POR LA GENOTIPIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES CAI, CAIII Y CAVI... ..	59
TABLA 14. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE AISLAMIENTOS DEL MISMO PACIENTE CON EL MISMO GENOTIPO.....	60
TABLA 15. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE AISLAMIENTOS DE DIFERENTES PACIENTES CON GENOTIPOS IGUALES O SIMILARES.	61
FIGURA 39. DENDROGRAMA RADIAL QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> DE ACUERDO A LA DISTANCIA GENÉTICA CALCULADA POR LA GENOTIPIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES CAI, CAIII Y CAVI... ..	62
FIGURA 40. ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>C. ALBICANS</i> ESTIMADA CON STRUCTURE.	63
FIGURA 41. DENDROGRAMA RADIAL QUE MUESTRA LOS GRUPOS FORMADOS POR GENOTIPIFICACIÓN CON LOS MICROSATÉLITES CAI, CAIII Y CAVI.	64
TABLA 16. AISLAMIENTOS DE <i>C. ALBICANS</i> PERTENECIENTES AL GRUPO I	65
TABLA 17. AISLAMIENTOS DE <i>C. ALBICANS</i> PERTENECIENTES AL GRUPO II	65
TABLA 18. AISLAMIENTOS DE <i>C. ALBICANS</i> PERTENECIENTES AL GRUPO III	66
TABLA 19. AISLAMIENTOS DE <i>C. ALBICANS</i> PERTENECIENTES AL GRUPO IV	66
TABLA 20. AISLAMIENTOS DE <i>C. ALBICANS</i> PERTENECIENTES AL GRUPO V	67

ABREVIATURAS

°C. Grados Celsius	mL. Mililitro
μL. microlitro	mm.milímetros
μm. micrómetro	mM.Milimolar
ADS. Agar dextrosa de Sabouraud	NCBI. Centro Nacional de Información
AHT80. Agar harina de maíz + Tween80 al 1%	Biotecnológica (del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
CHROMa. CHROMagar <i>Candida</i>	ng. Nanogramos
Dc. Distancia genética de acuerdo al modelo de Cavalli-Sforza	pb. Pares de bases
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	PCR. Reacción en Cadena de Polimerasa
dNTP's. Desoxirribonucleótidos.	pH. Potencial de iones hidrógeno
DP. Poder de discriminación	RAPD. Amplificación aleatorio de DNA
EDTA. Ácido etilendiaminotetracético	polimórfico (del inglés, <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>).
F. Femenino	rDNA. Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
h. horas	RFLP. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
HJM. Hospital Juárez de México	Rpm. Revoluciones por minuto
IgA. Inmunoglobulina A	s. segundos
IgE. Inmunoglobulina E	SIDA. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
ITS. Espaciador transcrito interno	Taqpolimerasa. Polimerasa de <i>Thermusaquaticus</i>
KOH. Hidróxido de potasio	UCI. Unidad de Cuidados Intensivos
LCR. Líquido ceforraquídeo	VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana
M. Masculino	YEPD. Agar extracto de levadura, dextrosa y peptona
mg. Miligramos	
MgCl ₂ . Cloruro de magnesio	
Min. Minutos	

Introducción

La candidosis es la infección por hongos más frecuente en pacientes hospitalizados. Esta se presenta con una gran variedad de formas clínicas, desde lesiones superficiales en piel y mucosas, hasta infecciones profundas de alto riesgo cuya evolución es rápida y de tratamiento complicado. El principal agente causal es *Candida albicans*, una levadura comensal de la microbiota del tracto gastrointestinal, sistema genitourinario y cavidad oral, que bajo condiciones de inmunosupresión se comporta como patógeno oportunista.

En los últimos años se ha observado un aumento en los casos de candidosis, principalmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (Diekema, *et al*, 2012). Este fenómeno es consecuencia del aumento en el tiempo de sobrevida que han brindado las nuevas terapias médicas y quirúrgicas a los pacientes en condiciones críticas. Ejemplo de ello es el aumento de los trasplantes de órgano sólido, el uso de nuevos fármacos quimioterapéuticos, antibióticos de amplio espectro y dispositivos médicos en los hospitales de tercer nivel de atención (Alangaden, *et al*, 2011).

La candidosis se presenta en pacientes con estancias prolongadas en el hospital y la mayoría de las veces son de origen endógeno (la levadura es parte de la microbiota del paciente). Sin embargo puede ser de origen exógeno debido a la transmisión de cepas persistentes de *Candida* en las instalaciones médicas, personal médico y de otros pacientes. La contaminación con *Candida* de catéteres venosos, sondas de nutrición parenteral y respiradores mecánicos es una de las principales causas de candidemia y neumonía.

De acuerdo al *National Healthcare Safety Network*, entre 2006 y 2007 *Candida* representó el cuarto patógeno causante de infecciones de torrente sanguíneo y tracto urinario asociadas a catéter, neumonía asociada a ventilador e infecciones postquirúrgicas (Hidron, *et al*, 2008).

Un estudio del *National Hospital Discharge Survey* estima que la frecuencia de la candidosis se ha incrementado en la población de los Estados Unidos de 23 por 100,

000 personas en 1996 a 29 por 100, 000 personas en 2003 (Pfaller, *et al*, 2007, Wolson, *et al*, 2002). La mortalidad atribuible a estas infecciones profundas en pacientes hospitalizados varía entre el 5% y el 71% (Falagas, *et al*, 2006).

Las herramientas que se utilizan en el laboratorio de rutina permiten el diagnóstico de la candidosis mediante el examen directo al microscopio, cultivo e identificación de especies de *Candida* mediante pruebas fenotípicas. Estas pruebas requieren de la experiencia del observador y pueden tardar entre 48 y 72 horas en la identificación del agente etiológico, además no permiten la identificación de infecciones nosocomiales por una misma cepa. Estas limitaciones y el reciente aumento en la frecuencia de infecciones por especies *no-albicans* que tienen diferentes susceptibilidades a los antifúngicos, hacen que la prevención de las infecciones fúngicas asociadas al cuidado hospitalario sea importante (Li, *et al*, 2013).

La utilización de la biología molecular para el diagnóstico de enfermedades es cada vez más frecuente y varios métodos para la detección e identificación de patógenos han sido diseñados. Entre estos, la utilización de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) son ampliamente utilizados para la identificación de especies de hongos y genotipificación de patógenos.

Estos métodos nos permiten obtener resultados de manera rápida y exacta en menos de 12 horas a partir de cultivos puro y dado que están basados en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (DNA), sus resultados son absolutos.

El objetivo de este trabajo es analizar la utilidad que tiene la identificación molecular de especies de *Candida* utilizando PCR-RFLP del espaciador transcrito interno (ITS) del DNA ribosómico (rDNA) y la genotipificación de *Candida albicans* utilizando PCR de tres *loci* de microsatélites (CAI, CAIII y CAVI) a partir de aislamientos clínicos de pacientes con diagnóstico de candidosis del Hospital Juárez de México (HJM) obtenidos de Enero de 2011 a Mayo de 2013.

Marco teórico

Características del género *Candida*

Candida es un género que agrupa aproximadamente 200 especies de levaduras que se caracterizan por reproducirse asexualmente mediante blastogénesis, carece de cápsula, forma pseudo hifas e hifas verdaderas y tiene una pared celular formada principalmente por β -(1,3)-D-glucanas y menor proporción por mananas, quitina y lípidos (Skinner, *et al*, 1960; Bowman, *et al*, 2006). Algunas especies pueden reproducirse sexualmente mediante ascosporas. Las principales especies de importancia médica son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis* (Arenas, 2008; Webster, *et al*, 2007).

Microscópicamente presentan las siguientes morfologías (Dismukes, *et al*, 2003):

- **Blastoconidio.** Células de forma ovoide o elíptica de 2 a 6 μm por 3 a 9 μm .
- **Pseudo hifa o pseudo micelio.** Son blastoconidios que se elongan, no se separan después de la gemación y permanecen unidos entre sí. En el sitio de unión se observan estrechamientos. Esta conformación permite compartir nutrientes a través del citoplasma en medios hostiles.
- **Hifa verdadera.** Es una estructura filamentosa de 2 a 3 μm de grosor por 5 a 20 μm , septadas e hialinas.
- **Tubo germinal.** Es una estructura de transición entre el blastoconidio y la hifa verdadera. Se observa una elongación que se forma a partir del blastoconidio. Esta prolongación crece de manera apical, no presenta estrechamiento en la base y es de aproximadamente el doble de largo que el blastoconidio que le dio origen.
- **Clamidoconidio.** Son células redondas de 8 a 12 μm de diámetro, con una pared gruesa y que se observan con un doble contorno. Estas se forman a partir de una hifa. Es una estructura de resistencia a condiciones hostiles en el medio y de reproducción asexual, a partir de la cual pueden brotar blastoconidios cuando las condiciones del medio sean las óptimas.

Es importante mencionar que *C. glabrata* es la única especie que no puede formar ninguna estructura filamentosa (tubo germinal, pseudo hifas ni hifas verdaderas) (Larone, 1993).

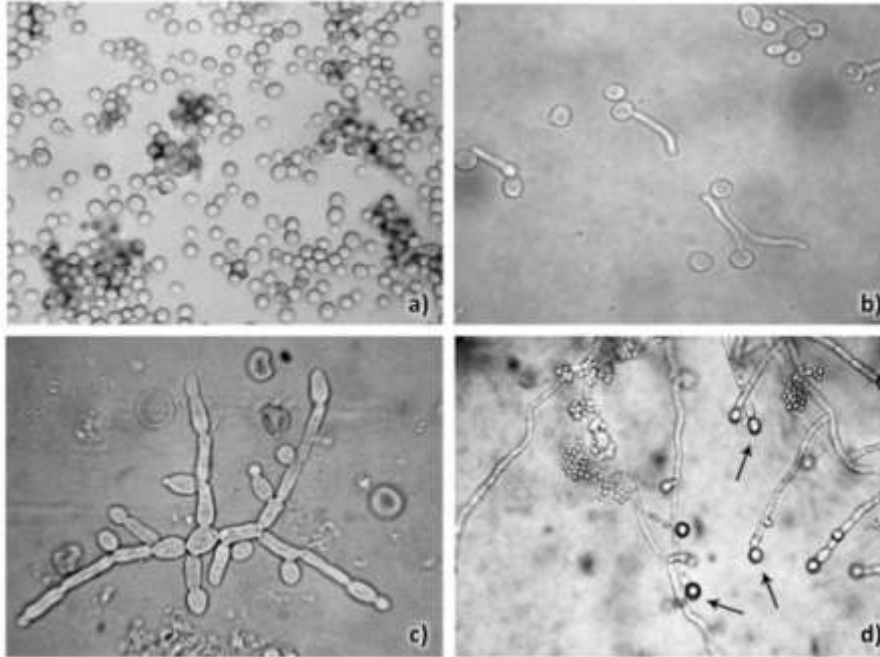


Figura 1. Morfologías microscópicas de *Candida*.
a) Blastoconidios, b) tubo germinal, c) pseudo hifas e d) hifas verdaderas y clamidoconidios (flechas). Examen directo (40x).

Macroscópicamente se observa que desarrollan colonias limitadas, redondas, convexas, de consistencia cremosa, color blanco a crema y de bordes definidos en medios como el agar dextrosa de Sabouraud (ADS). Crecen idealmente en pH ácidos, a una temperatura entre 25 ° C y 37 ° C, entre 24 a 48 h. Algunos aislamientos se pueden observar colonias acuminadas, arrugadas, cerebriformes o con un halo de micelio (Vargas, *et al*, 2000).

Anteriormente, la taxonomía del género se basó en características fenotípicas: criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Recientemente, los criterios de clasificación están basados en la secuencia de los genes del rDNA (Diezmann, *et al*, 2004). A continuación se presenta la clasificación taxonómica de Kendrick (fenotípica) y de Berbee & Taylor (por secuenciación del gen 18S) (Hibbett, *et al.*, 2007).

Tabla 1. Taxonomía del género *Candida*

	Kendrick(1971)	Berbee y Taylor (2001)
Dominio	<i>Eukarya</i>	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Deuteromycota</i>	<i>Ascomycetes</i>
Clase	<i>Blastomycetes</i>	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Cryptococcales</i>	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género anamorfo ¹	<i>Candida</i>	
Género teleomorfo ²	<i>Hansenula, Pichia, Kluyveromyces, Issatchenkia, Clavispora, Meyerozyma, entre otros.</i>	

Estas levaduras forman parte de la microbiota del ser humano y otros mamíferos. Colonizan el tubo digestivo (con excepción del estómago), la mucosa genital, la piel, las vías respiratorias superiores y urinarias. La comensalización inicia durante el nacimiento a través del canal de parto y por contacto con otros individuos colonizados (Bougnoux, *et al*, 2006).

Se estima que entre un 25% a 50% de los individuos sanos son portadores asintomáticos de *C. albicans* en la cavidad bucal (Silva-Rocha, *et al*, 2014; Xu, *et al*, 2003). En condiciones normales, la vagina se encuentra colonizada por *C. albicans* y excepcionalmente también por *C. glabrata* (Merenstein, *et al*, 2013). La colonización de especies no-*albicans* en piel sana es poco frecuente, sin embargo se pueden encontrar *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*.

Es importante mencionar que estas levaduras no son patógenos primarios y requieren de una severa disfunción del sistema inmunológico del hospedero, del estado nutricional y/o cambio fisicoquímicos severos para poder proliferar, invadir tejidos y causar enfermedad. Las siguientes características permiten a *Candida* comportarse como patógeno oportunista:

- ❖ **Tienen un contacto estrecho con el hospedero al ser parte de la microbiota** (Fernández-Martínez, *et al*, 2013, Merestein, *et al*, 2013).
- ❖ **Dimorfismo.** La formación de morfologías levaduriformes y filamentosas. Este fenómeno depende de las condiciones del medio, favoreciendo las estructuras

filamentosas en pH neutro o ligeramente básico y con cierta hostilidad. Los blastoconidios se adhieren con facilidad al epitelio y proliferan rápidamente en el tejido. Posteriormente, se forman pseudohifas e hifas verdaderas que tienen una actividad histolítica que permite la invasión del tejido y evasión de la respuesta inmunológica (Noble, 1980).

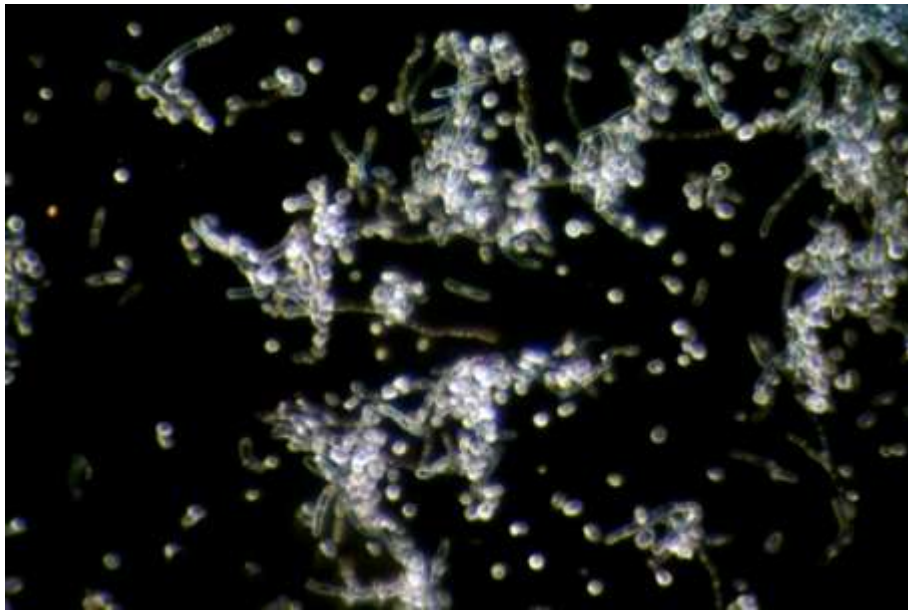


Figura 2. Dimorfismo de *Candida albicans*.
Se observan cúmulos de blastoconidios, pseudo hifas e hifas verdaderas. Examen directo en campo oscuro (40x).

- ❖ **Pueden desarrollarse a temperatura corporal (37° C).**
- ❖ **Fácil adaptación a cambios de pH.**
- ❖ **Adhesinas que permiten la adhesión al tejido epitelial.** En *C. albicans* y *C. glabrata* se han identificado manoproteínas y mananas que cumplen con esta función (Ghannoum, *et al*, 1990).
- ❖ **Formación de biopelículas.** Son agregaciones de microorganismos adheridos a una superficie mediante polímeros polisacáridicos. *C. albicans* y *C. parapsilosis* forman *biofilms* en tejido y dispositivos médicos, permitiendo una mayor persistencia en el huésped y una menor susceptibilidad a los antifúngicos (Jabra-Rizk, *et al*, 2004; Kuhn, *et al*, 2002).
- ❖ **Enzimas líticas.** Las principales son proteasas aspárticas secretorias, peptidasas, queratinasas, fosfolipasas, hialuronidasas y hemolisinas.

- ❖ **Switching fenotípico.** *C. albicans* tiene la capacidad de cambiar su fenotipo de manera espontánea y reversible. Este cambio se puede distinguir en la expresión de antígenos de membrana, la morfología y la proporción de blastoconidios, pseudo hifas e hifas en las colonias en medio de cultivo (Vargas, *et al*, 2000). La frecuencia con la que se observa este fenómeno *in vitro* es de 10^{-4} a 10^{-5} , sin embargo, algunos aislamientos de lesiones activas tienen una mayor frecuencia de *switching* (Soll, 1992).

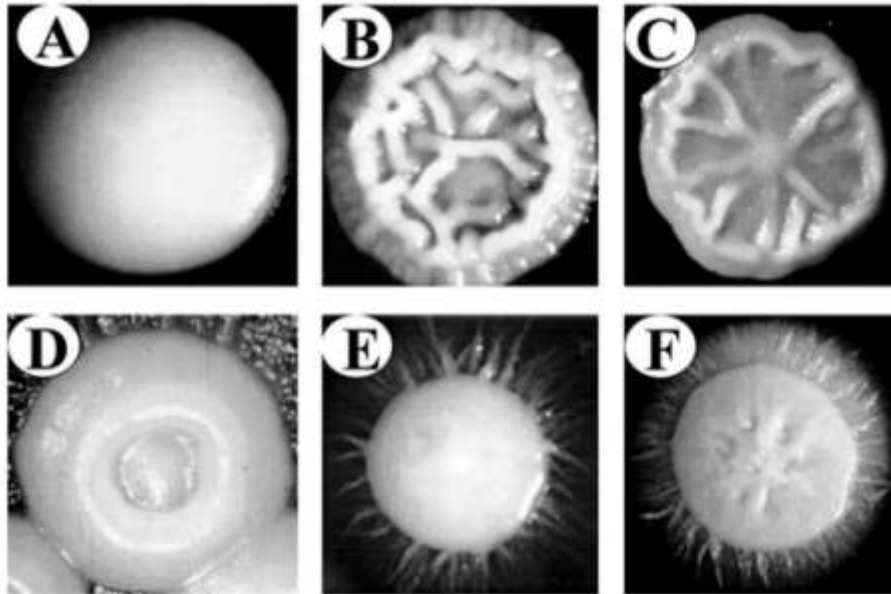


Figura 3. Morfologías coloniales de *C. albicans* que se observan en el *switching*. A) Lisa y convexa, B) irregular, C) con forma de estrella, D) con forma de dona, E) y F) con halo micelial. Tomada de Vargas, *et al*, 2000.

Candidosis

La candidosis es causada por levaduras oportunistas del género *Candida*. Presenta una gran variedad de cuadros clínicos, desde infecciones superficiales que afectan las mucosas, faringe, piel, uñas y tracto gastrointestinal hasta infecciones profundas o sistémicas como candidemia, endocarditis, meningitis e invasión de órganos (principalmente riñón y pulmón). Es de evolución aguda, subaguda, crónica o recurrente. Es una infección cosmopolita y se presenta en individuos de cualquier edad, sexo y raza (Arenas, 2008).

Ya que *Candida* no es un patógeno primario, solo los individuos que cumplan con alguna de estas condiciones tienen un factor de riesgo para desarrollar candidosis (Bonifaz, 2011):

- **Inmunodeficiencias:** Principalmente VIH-SIDA, leucemias, linfomas y neutropenia.
- **Individuos con enfermedades o procesos debilitantes:** Diabetes mellitus, cáncer, tuberculosis, disfunción hepática o renal, embarazo, quemaduras profundas, desnutrición, trastornos endócrinos, recién nacidos prematuros o con bajo peso.
- **Tratamiento prolongado con antibióticos de amplio espectro.** La reducción de la microbiota bacteriana favorece la implantación y/o proliferación fúngica.
- **Trasplantes y terapia con esteroides inmunosupresores.**
- **Cateterismo, nutrición parenteral total, drogadicción y traumatismos.** Al romperse las barreras físicas se forma una vía de continuidad que facilita la entrada de cualquier microorganismo.
- **Fisicoquímicos:** En la cavidad oral, concentraciones elevadas de carbohidratos y falta de aseo bucal favorecen la proliferación. La presencia de un ambiente húmedo en uñas y piel, así como un pH ácido ($\text{pH} < 6$) facilitan la proliferación de cualquier hongo. En cavidad vaginal la transformación del glucógeno en ácido láctico por el bacilo de Döderlein (*Lactobacillus* sp.), disminuye el pH y favorece la candidosis genital recurrente.

La infección se origina de manera endógena en la mayoría de los casos, mediante un aumento en la población de *Candida* en los tejidos que colonizan. En ocasiones excepcionales es de origen exógeno, es decir, que grandes cantidades de levaduras son inoculadas mediante una vía de continuidad. El tiempo en el que se presentan los primeros síntomas de infección es imposible de determinar ya que es una enfermedad multifactorial (Arenas, 2008).

Durante mucho tiempo se consideró a *C. albicans* como el agente etiológico más frecuente de la candidosis, pero las infecciones por especies no-*albicans* se han incrementado.

De acuerdo a un estudio realizado por Horn en 2,019 pacientes norteamericanos se observó un predominio de infecciones por especies no-*albicans* (54.4%), aunque *C. albicans* fue la más frecuente (45.6%), es seguida por *C. glabrata* (26.0%) y *C. parapsilosis*(15.7%) (Horn, *et al*, 2009). En Europa, se reporta que *C. albicans* es causante de más de la mitad de los casos, mientras que *C. parapsilosis* es la segunda especie más frecuente (Tortorano, *et al*, 2006). En América latina, las principales especies son *C. albicans*(37.6%), *C. parapsilosis*(26.5%) y *C. tropicalis*(17.6%), con una gran variabilidad en las distribución de especies entre los diferentes países que participaron en el estudio (Sardi, 2013).

C. glabrata se ha convertido en una especie importante debido al aumento en los últimos años de infecciones en pacientes inmunocomprometidos y receptores de órgano sólido. Algunos aislamientos presentan baja susceptibilidad al fluconazol. Es el segundo agente causante de candidemia (Hachem, *et al*, 2008).

C. parapsilosis es el tercer agente más común de candidemia, especialmente en recién nacidos y pacientes con catéteres venosos, prótesis, dispositivos médicos y el uso de drogas por vía intravenosa (Dotis, *et al*, 2012). Después de *C. albicans* es la más frecuente en infecciones cutáneas (Levy, *et al*, 1998).

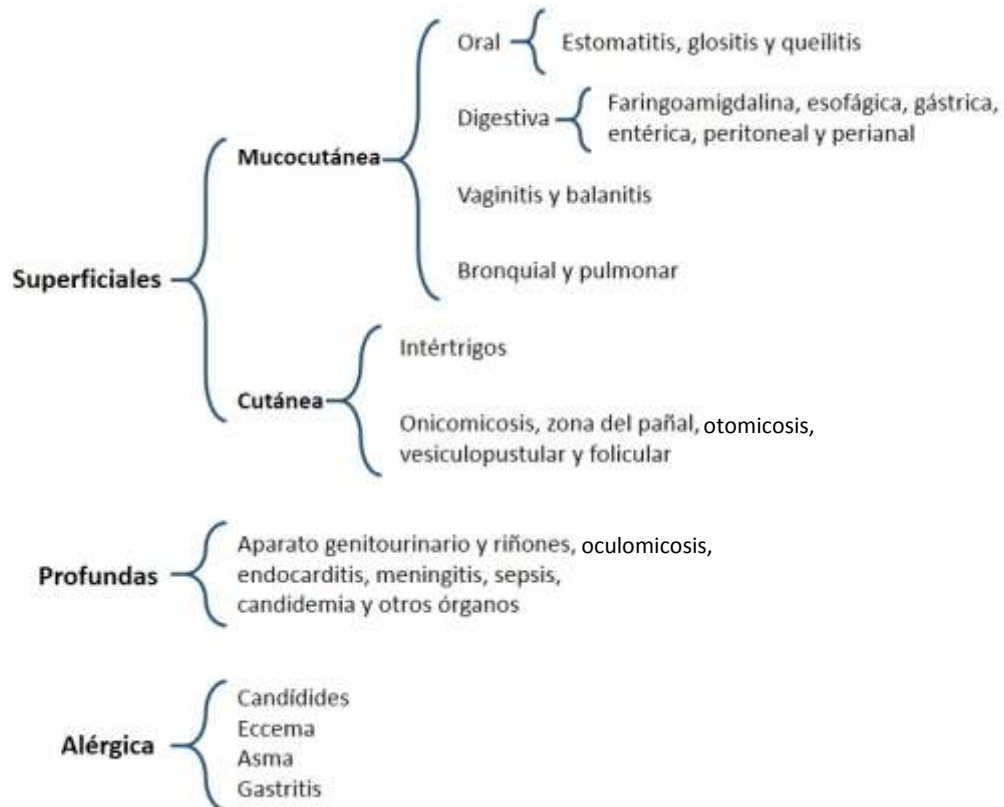
Las infecciones por *C. tropicalis* y *C. krusei* son frecuentes pacientes con leucemia y neutropenia. Es importante resaltar que *C. krusei* presenta resistencia intrínseca al fluconazol, por tanto, la mortalidad de las candidosis sistémicas ocasionadas por esta especie es mayor respecto a *C. albicans* (Sardi, *et al*,2013).

Especies como *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. ciferii*, *C. nivariensis*, *C. norvergensis*, *C. utilis* y *C. rugosa* son especies de baja frecuencia (menor a 5%, Eggiman, *et al*, 2003).

Aspectos clínicos

Las variedades clínicas de la candidosis se listan en el **Cuadro 1**. A continuación se describen las más frecuentes.

Cuadro 1. Variedades clínicas de la candidosis. Modificada de Arenas, 2008.



Candidosis superficiales

Candidosis mucocutánea. Afecta principalmente la cavidad oral, faringe, el surco balanoprepuclal, la vagina y la conjuntiva donde se desarrollan placas eritematosas, pseudo membranosas, con un exudado blanco o beige, pueden aparecer petequias o erosiones hemorrágicas que suelen ulcerarse. En la región genital hay leucorrea y prurito, además se puede presentar dispareunia (dolor genital persistente o recurrente que se produce justo antes, durante o después del coito) (Burns, *et al*, 2010).

Candidosis oral. Se presenta con inflamación de la lengua y puede afectar paladar, encía e invadir toda la boca (estomatitis). Se observan placas pseudo membranosas de

color blanco con aspecto de leche cortada o crema. La sintomatología más común es ardor, dolor y disfagia. Puede presentarse queilitis angular (Coronado-Castellote, *et al*, 2013).

Candidosis digestiva. Afecta todo el tracto gastrointestinal y puede presentarse como gastritis (entidad rara), peritonitis (como infección secundaria a un traumatismo o cirugía) y entérica. Su diagnóstico es complicado siendo necesario comprobar histopatológicamente la forma patógena en muestras seriadas.

Candidosis cutánea. En la piel se generan lesiones eritematosas, papulosas o vesiculosas, exudativas y con placas blanquecinas, que en ocasiones forman pústulas periféricas, con prurito moderado, presencia de fisuras y dolor. Aparecen principalmente en intertrigos, pliegues submamaros e inguinales (Noble, 1980).

Onicomicosis por *Candida*. Es más frecuente en las uñas de las manos. Hay eritema alrededor de la uña, dolor, paroniquia, engrosamiento de la uña, formación de surcos, pigmentación que va del amarillo al negro pardo y con desprendimiento de la parte distal de la uña (onicolisis) (Fich, *et al*, 2014, Min, *et al*, 2013).



Figura 4. Variedades clínicas de la candidosis superficial.
a) Cutánea inguinal, b) onicomicosis, c) balanitis y d) candidosis oral o algodoncillo

Candidosis profundas

Candidosis sistémica. De sintomatología inespecífica que suele confundirse con infecciones bacterianas. Los síntomas son fiebre, astenia, adinamia y mal estado en general. Se acompaña de dolor del órgano o sistema afectado (Sabel, *et al*, 2011).

Candidosis pulmonar. Frecuente en cuadros neumónicos en los que hay aspiración de contenido o ventilación mecánica, donde se caracteriza por tos, dolor torácico, disnea y esputo blanquecino. Su diagnóstico es difícil de establecer ya que se usualmente se hace por histopatología *post mortem*.

Candidosis urinaria. Puede presentarse en riñón, vesical y uretral. Se presenta dolor vesical, poliaquiuria y manifestaciones de uretritis (Behzadi, *et al*, 2006, Helbig, *et al*, 2013). Un signo importante es la candiduria (Yismaw, *et al*, 2013).

Candidemia. Presencia de levaduras de *Candida* en la sangre. Usualmente hay diseminación a otros órganos. Los síntomas son inespecíficos y se confunde con sepsis bacteriana (Falagas, *et al*, 2006).

Candidosis alérgica. Reacciones de hipersensibilidad de tipo I caracterizadas por la presencia de anticuerpos IgE específicos a los antígenos de *Candida*, las cuales se pueden presentar como eccema (lesiones eritematosas, vesiculosas o papulosas y exudativas), asma alérgico (estertores, sibilancias, tos y obstrucción bronquial) y gastritis alérgica.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la candidosis (con excepción de la candidemia) se realiza mediante el examen directo con KOH al 10 o 20% al microscopio. Las muestras biológicas para establecer el diagnóstico dependerán de la zona afectada, las más comunes son: exudados faríngeos, raspados de cavidad oral o piel, escamas de piel y uñas, sangre, heces, esputo, lavado bronco alveolar, biopsias, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR). Los criterios de diagnóstico dependerán de la muestra a analizar.



Figura5. Candidosis gastrointestinal.
La presencia de pseudo hifas e hifas verdaderas son un signo patognomónico de infección por *Candida*. Examen directo de heces (40x).

El aislamiento del agente etiológico se hace mediante la siembra de la muestra biológica en medios de cultivo como ADS, ADS adicionado con cicloheximida y cloranfenicol (Micosel®) y agar de Nickerson (BiGGY). Una herramienta útil son los medios cromogénicos que permiten el aislamiento e identificación rápida de las principales especies por la formación de colonias colorida. Un ejemplo de estos medios es el CHROMagar *Candida* (CHROMa). En el caso de muestras estériles (sangre y LCR), un examen directo negativo con cultivo positivo para *Candida* puede ser diagnóstico de una candidosis, sin embargo se tiene corroborar con dos muestras más y que ambas sean positivas para el cultivo (Yapar, 2014).

Identificación de especies mediante pruebas fenotípicas

En el laboratorio clínico, la identificación de especie se realiza mediante pruebas fenotípicas (Larone, 1993):

Pruebas biológicas

- ❖ Desarrollo de tubo germinal en suero humano a 37° C por 2 horas
- ❖ Morfología microscópica en agar harina de maíz + Tween80 al 1%

Pruebas cromogénicas

- ❖ Color de las colonias en medios cromogénicos

Pruebas bioquímicas

- ❖ Auxonogramas
- ❖ Zimogramas

Es común el uso de pruebas comerciales para la identificación de levaduras a partir de cultivos puros. Entre estas destacan API20C AUX[®], API32[®], VYTEK II[®] y Auxacolor2[®]. Estas se basan en perfiles de asimilación de carbohidratos que se comparan con una base de datos que asigna dicho perfil a una especie (Argawal, et al, 2011).

En general, la identificación fenotípica a nivel género-especie lleva entre 3 a 5 días y depende de las condiciones a las que se realicen las pruebas, del microorganismo per se, de la habilidad y experiencia del observador. Es importante recordar que las pruebas fenotípicas dependen de la expresión del material genético y por tanto no son 100% absolutas.

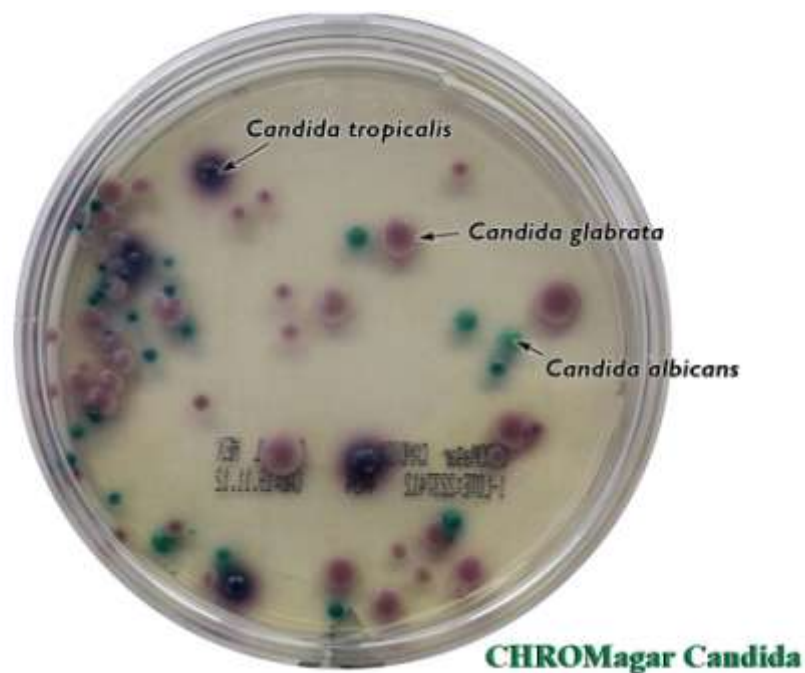


Figura 6. CHROMagar Candida, medio cromogénico para la diferenciación de especies de *Candida*.

La reciente descripción de nuevas especies de *Candida* en infecciones oportunistas, ha traído consigo la problemática de la identificación correcta de estas, ya que la mayoría no pueden ser identificadas mediante métodos fenotípicos (Cendejas-Bueno, et al, 2010).

Un ejemplo es la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Campanha, et al, 2005). Estas especies están relacionadas filogenéticamente en un 99.8%. Se han propuesto pruebas fenotípicas para hacer la identificación de *C. dubliniensis* (Khan, et al., 2012), algunas de estas se presentan en la **Tabla 2** (Khlif, et al, 2011).

Tabla 2. Pruebas fenotípicas para la identificación presuntiva de *C. dubliniensis*.

Características fenotípicas	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Crecimiento		
42° a 45° C	+	-
caldo Sabouraud + 6.5% NaCl	+	-
D-xilosa	+	R
Glicerol	-	R
metil-D-glucopiranosido	+	R
D-trehalosa	+	R
Producción de clamidoconidios		
agar harina de maíz + Tween80 al 1%	+	+++
agar Staib	-	+++
agar Tabaco	-	+++
Color las colonias		
CHROMagar <i>Candida</i>	Verde claro	Verde oscuro

R. son raros los aislamientos que lo asimilan

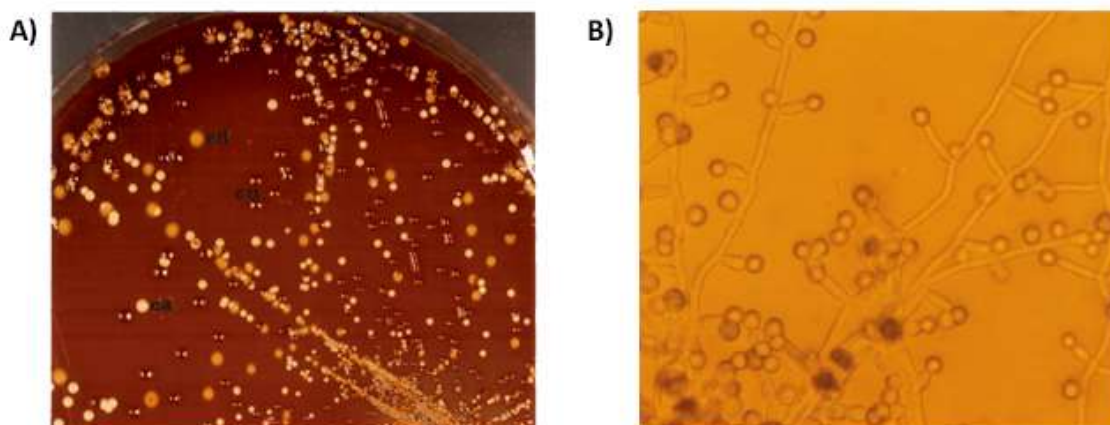


Figura 7. Agar tabaco para la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En este medio, solo *C. dubliniensis* forma colonias con un halo micelial (A) y abundantes clamidoconidios (B). Modificada de Khan, et al., 2004.

La frecuencia de *C. dubliniensis* en muestras clínicas podría estar siendo estimada de manera incorrecta ya que varios autores solo basan su identificación en los métodos fenotípicos, que son insuficientes y fallan en la identificación de esta levadura (Gutiérrez, *et al*, 2002, Mosaid, *et al*, 2001). Se recomienda la utilización de más de dos las pruebas fenotípicas antes mencionadas para identificar presuntivamente un aislamiento como *C. dubliniensis*. Solo mediante pruebas moleculares se puede realizar la identificación confiable y precisa de *C. dubliniensis* (Sullivan, *et al*, 2005).

El estudio del genoma de estos organismos ha permitido el desarrollo de métodos moleculares rápidos, sensibles y de alto poder para la identificación y diferenciación de especies de baja frecuencia. Para entender la base de la identificación molecular de especies de *Candida* es necesario describir algunos conceptos previos.

Estructura del genoma

En el genoma existen diferentes tipos de secuencias de DNA: genes funcionales de copia única, genes ribosomales, espaciadores, secuencias repetidas, trasposones, genes multicopia, pseudogenes, entre otras. Los genes funcionales son necesarios en los procesos fisiológicos y bioquímicos; cualquier alteración en la secuencias de estos genes puede comprometer la viabilidad de la célula, por tanto sus secuencias están conservadas y su polimorfismo es muy bajo (Stratchan, *et al*, 2011).

En cambio, las secuencias no codificantes (como los espaciadores ribosomales y las secuencias repetidas) no están bajo presión de selección y albergan un mayor número de mutaciones. Estas secuencias son polimórficas (poseen variaciones naturales que ocurren al azar y no afectan la viabilidad del organismo), tal que permiten la diferenciación de especies del mismo género e incluso entre individuos de la misma especie (genotipificación).

Genes ribosomales. El rDNA está formado por secuencias repetidas en tándem que codifican las subunidades ribosomales. El rDNA está compuesto por un promotor, los genes 18S, 5.8S y 28S separados por las secuencias espaciadoras transcritas ETS1, ITS1 e ITS2 y un terminador. La transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa III y antes de salir del núcleo, es procesado por la RNAasa MRP y la RNAasaP que dejan libres

las secuencias 18S, 28S y 5.8S que forman al ribosoma, mientras que los espaciadores son degradados. Los espaciadores internos ITS1 e ITS2 son secuencias no codificantes y su tamaño y secuencia varía entre especies, por lo que su análisis permite la identificación de organismos eucariontes (White, 1990).

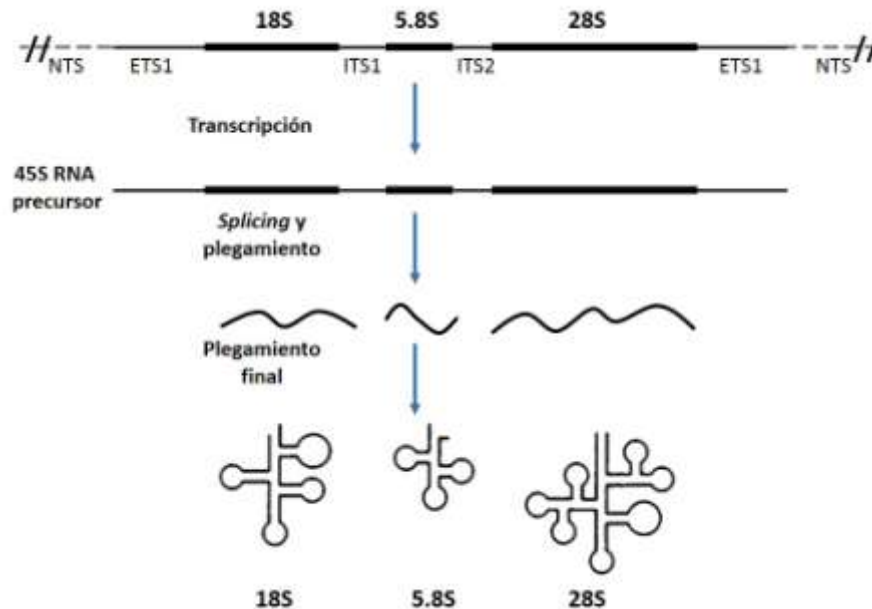


Figura 8. Estructura del rDNA, transcripción y plegamiento de las subunidades 18S, 5.8S y 28S. Los espaciadores ETS, ITS1 e ITS2 son degradados durante el *splicing*.

Microsatélites. Son secuencias cortas de DNA constituidas por motivos de 1 a 6 nucleótidos que se repiten consecutivamente varias veces. Estas secuencias son altamente polimórficas, muy abundantes, están distribuidas por todo el genoma (la mayoría se encuentran en regiones no codificantes) y son de herencia codominante. Las diferencias en el número de secuencias repetidas se generan por delección (pérdida de un fragmento de la secuencia) o por inserción (adición de uno o más nucleótidos en una secuencia de DNA) (McDonald, *et al*, 1997).

Durante la replicación del DNA, los cambios en la temperatura pueden disociar el complejo de replicación. Usualmente el complejo de replicación se vuelve a alinear sin ningún problema, sin embargo a veces las cadenas de DNA forma estructuras secundarias en forma de asa y al alinearse con la otra cadena, la replicación continúa desfasada, provocando la inserción o delección de la unidad de repetición. La mayoría

de estos errores son reparados, sin embargo una pequeña proporción de estas mutaciones no son reparadas o corregidas, esto permite el cambio en número de repeticiones del microsatélite.

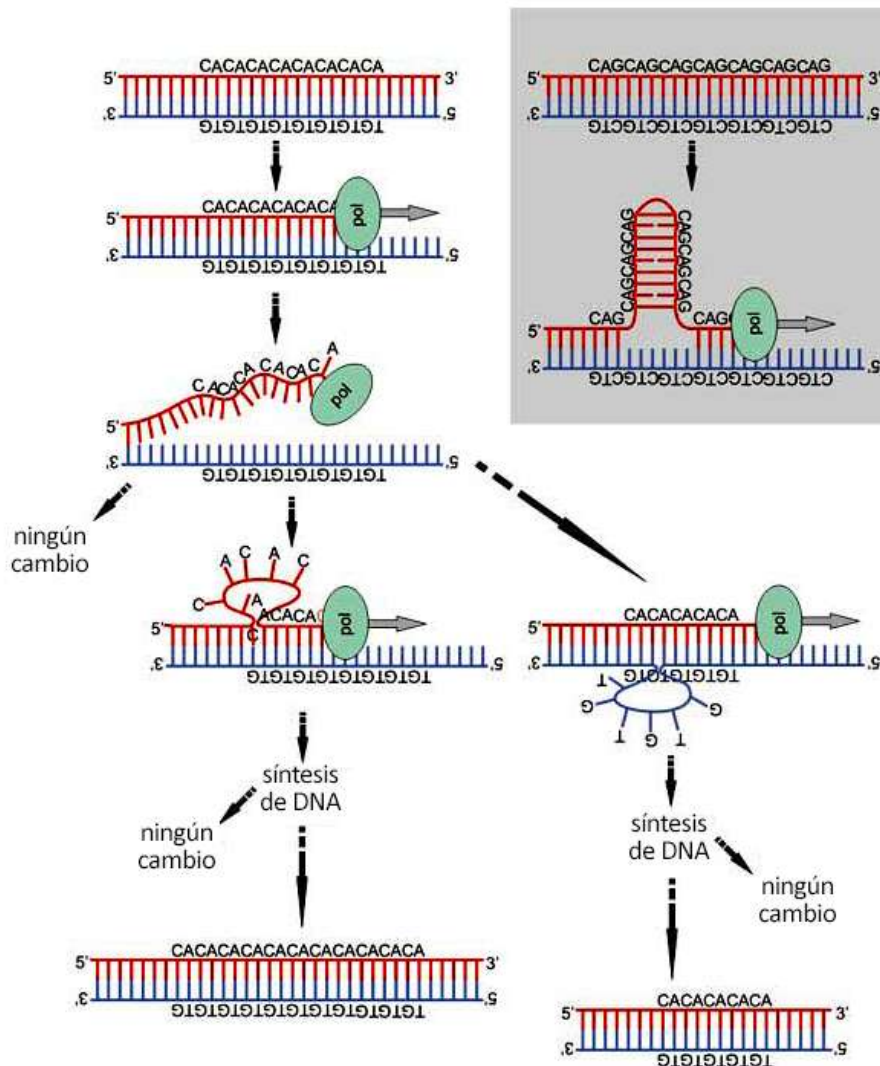


Figura 9. Mecanismo de aumento de número de repeticiones de un microsatélite.

Los microsatélites son uno de los marcadores genéticos más utilizados para diferenciación de individuos de una misma especie debido a la facilidad con la que pueden ser analizados y por su potencial uso en sistemas automatizados. Las aplicaciones más comunes de los microsatélites son como marcadores de paternidad,

en los que se comparan el número de secuencias repetidas de varios *loci*, ya que los individuos consanguíneos presentan por lo menos un alelo idéntico.

Características del genoma de *Candida*

Por el momento solo se ha secuenciado el genoma de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis*, pero se conocen algunas características del genoma de otras especies del género (**Tabla 3**). Se sabe que poseen diferente tamaño y número de cromosomas, y al alinear las secuencias de algunos genes altamente conservados como *EF2*, *ACT1*, *RPB1*, *RPB2*, 18S rDNA y 25S rDNA se observa que las especies de *Candida* no comparten un ancestro filogenético en común, el género es polifilético.

Tabla 3. Características de los genomas de algunas especies del género *Candida*.

Especie	Ploidía	Cromosomas	Tamaño del genoma (Mb)	% GC
<i>C. albicans</i>	Diploide	8	16	33.4
<i>C. dubliniensis</i>	Diploide	8	16	33.2
<i>C. tropicalis</i>	Diploide	5 o 6	15	ND
<i>C. glabrata</i>	Haploide	13	12	38.6
<i>C. parapsilosis</i>	Diploide	14	26	38.7
<i>C. lusitaniae</i>	Haploide	ND	16	ND
<i>C. krusei</i>	Diploide	ND	10.4	ND
<i>C. guilliermondii</i>	Haploide	ND	12	ND

ND. No determinado

Métodos de identificación molecular de especies de *Candida*

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Esta técnica desarrollada por Mullis permite la amplificación de una secuencia específica a partir de una muestra de DNA genómico utilizando la enzima DNA *Taq* polimerasa termoestable.

Brevemente: (1) El DNA genómico se lleva a una temperatura de 95° C en la que se desnaturaliza la doble cadena, (2) a una temperatura de 56° a 65° C se alinean dos

cebadores o *primers*. Estos *primers* son oligonucleótidos que se complementan a la cadena de DNA que funciona como templado. (3) Posteriormente se eleva la temperatura a 72° C para que la DNA polimerasa inicie la síntesis de la cadena complementaria utilizando los desoxinucleótidostrifosfato (dNTP'S) agregados a la reacción amplifique la región delimitada por los *primers*. (4) Los pasos 1 al 3 se repiten por 30 a 45 ciclos, en los cuales la secuencia se amplifica exponencialmente 2^n (donde n es el número de ciclos). La secuencia amplificada puede ser visualizada por electroforesis en geles de agarosa suplementados con bromuro de etidio.

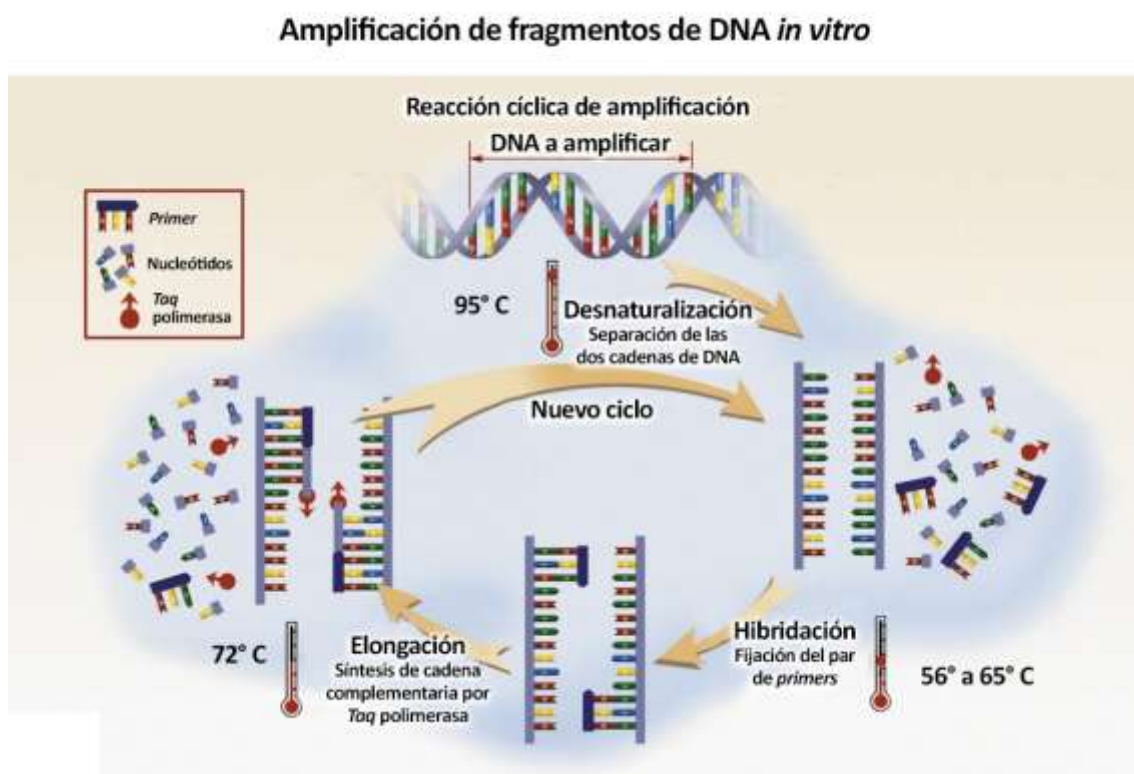


Figura 10. Reacción en Cadena de Polimerasa

Se han reportado varios *primers* especie-específicos para el género *Candida*, un ejemplo de ellos son los *primers* DUB. Estos fueron diseñados a partir del análisis de la secuencia del intrón del gen *ACT1* de *C. dubliniensis* y amplifican un fragmento de 288 pb que solo está presente en esta especie. La amplificación de esta secuencia permite la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

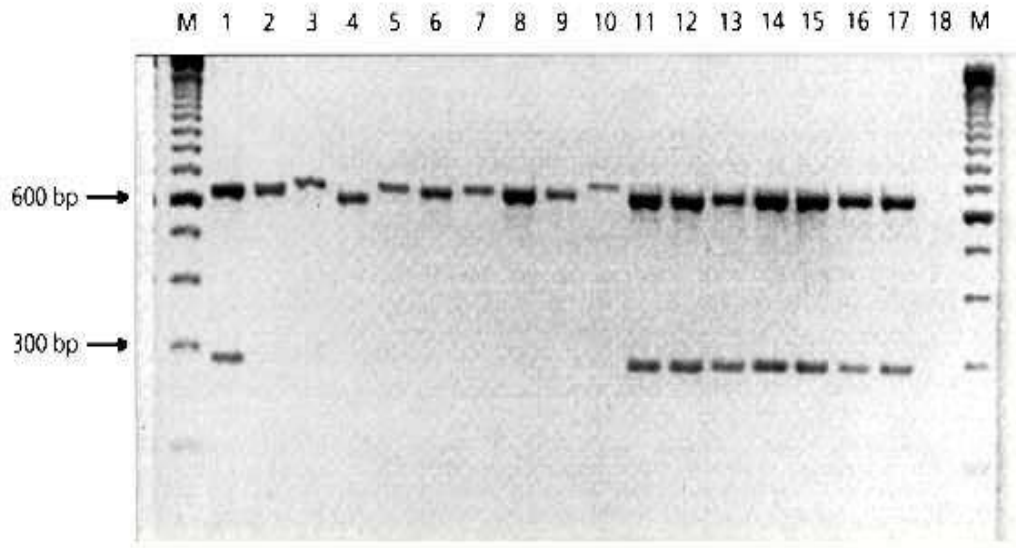


Figura 11. Diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante PCR con *primers* DUB. Los *primers* DUB amplifican un fragmento de 288 pb. Se utilizó como control positivo el amplificado de 610 pb de los *primers* RNAF y RNAR. Aislamientos de *C. albicans* (2 a 10) y *C. dubliniensis* (1, 11 a 17), M. Marcador de peso molecular. Modificada de Sullivan, 1999.

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Permite evaluar las diferencias que tiene una secuencia de DNA entre varios organismos mediante el corte con enzimas que reconocen secuencias específicas, a estas enzimas se les llama enzimas de restricción.

La identificación de especies de *Candida* y otros hongos de interés médico se puede llevar a cabo mediante la amplificación de la región ITS y su posterior corte con *MspI*. Utilizando los *primers* universales ITS1 e ITS4, las diferentes especies de *Candida* amplifican fragmentos de 300 a 800 pb (Mirhendi, *et al.*, 2006, Xafranski, *et al.*, 2013). La enzima *MspI* corta el fragmento de DNA si este contiene la secuencia 5'-CCGG-3' en dos fragmentos, si hay dos secuencias 5'-CCGG-3', en tres fragmentos y así sucesivamente. Estos fragmentos pueden ser visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa como patrones de bandas.

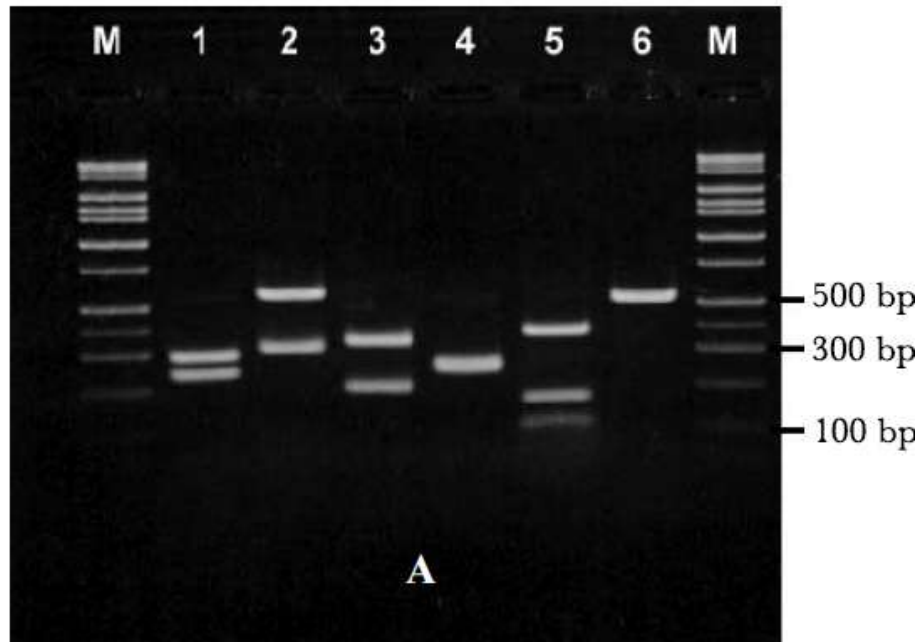


Figura 12. Identificación de especies de *Candida* por PCR-RFLP utilizando *MspI*. A) Amplificado de los *primers* ITS1 e ITS4 y B) productos de digestión con la enzima *MspI*. M. Marcador de peso molecular. 1. *C. albicans*, 2. *C. glabrata*, 3. *C. tropicalis*, 4. *C. krusei*, 5. *C. guilliermondii* y 6. *C. parapsilosis*. Tomado de Mirhendi, 2006.

La identificación por métodos fenotípicos de especies de baja frecuencia de aislamiento, es insuficiente y en estos casos es necesario utilizar técnicas moleculares para corroborar su identificación (Shokohi, *et al*, 2010). Tal es el caso de las especies pertenecientes al complejo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*), la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y especies de baja incidencia como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. nivariensis*, *C. famata*, entre otras. La correcta identificación es necesaria para la elección de la terapia más adecuada y específica, además nos da información epidemiológica respecto a la distribución de las especies en las distintas poblaciones así como la aparición de especies emergentes.

Genotipificación de *C. albicans* mediante microsatélites

Dado que *C. albicans* es la especie más frecuente, ha sido ampliamente estudiada genética y molecularmente (su genoma se ha secuenciado y está disponible en www.candidagenome.org). A partir de análisis moleculares tipo *Southernblot* se

identificaron varios tipos de microsatélites, los cuales han permitido analizar diferencias entre aislamientos patógenos y de la microbiota. Entre los microsatélites identificados en *C. albicans* están CEF3, HIS3, EFG1, CDC3 y EF3 (Fundyga, *et al*, 2002).

Sampaio y colaboradores describieron una serie de microsatélites específicos (CAI, CAIII y CAVI), localizados en regiones no codificantes que permiten la genotipificación de aislamientos mediante la amplificación a través de PCR, secuenciación y comparación del número de secuencias repetidas (Sampaio, *et al.*, 2003, 2005, Chávez-Galarza, *et al*, 2010, (Amouri, *et al*, 2012).

Tabla 4. Características de microsatélites específicos de *C. albicans*. Modificado de Sampaio, 2005.

Microsatélite	Motivo de repetición	PD	Ubicación en Cromosoma
CAI	(CAA) ₂ CTG(CAA) _n	0.967	4
CAIII	(GAA) _n	0.853	5
CAVI	(TAAA) _n	0.933	2

PD. Poder de discriminación

El poder de discriminación (la probabilidad de que un sistema de tipificación asigne un grupo o tipo diferente a dos individuos de una población tomados al azar) calculado por Sampaio para estos microsatélites es de 0.99, el más alto reportado en la literatura. Estos microsatélites permiten la identificación de eventos de microevolución en respuesta al estrés del medio, la sustitución de un genotipo por otro durante una candidosis o la presencia del mismo o diferentes genotipos de *C. albicans* en uno o en diferentes individuos.

Objetivos

Objetivo general

- Identificar las especies de *Candida* aisladas de muestras clínicas de pacientes con diagnóstico de candidosis de pacientes infectados del HJM, SSA., OPD.

Objetivos específicos

- Identificar por métodos fenotípicos los aislamientos de *Candida*
- Identificar por métodos moleculares (PCR y RFLP) los aislamientos de *Candida*
- Determinar la frecuencia de las distintas especies causantes de candidosis de pacientes del HJM, SSA., OPD.
- Genotipificar los aislamientos de *Candida albicans* utilizando los microsatélites CAI, CAIII y CAVI

Metodología

Aislamientos clínicos y cepas

Se obtuvieron aislamientos a partir de muestras biológicas de pacientes internados y de consulta externa del HJM de Enero de 2011 a Mayo de 2013. Los pacientes fueron previamente valorados por el médico especialista de cada servicio y en base a sus signos y sintomatología, fueron enviados al laboratorio de Micología Médica para confirmar una probable micosis. Solo se utilizaron los aislamientos en los que se demostró una candidosis activa.

Se utilizaron las siguientes cepas tipo como controles de las pruebas fenotípicas y genotípicas: *C. albicans* ATCC 90028, *C. dubliniensis* CD 36, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. guilliermondii* ATCC 6260.

Diagnóstico de Candidosis por examen directo

Las muestras biológicas de los pacientes se procesaron de la siguiente manera para el examen directo al microscopio:

- ❖ **Muestras líquidas** (orina, esputo, LCR, lavado de cavidad oral, lavado bronco alveolar): Se centrifugaron 5 mL de la muestra a 3000 rpm durante 15 min. Se decantó parte del sobrenadante (aprox. 90%), el sedimento se resuspendió y se colocaron aprox. 20 µL entre un portaobjetos y un cubreobjetos más 2 gotas de KOH al 10%.
- ❖ **Sangre.** Se tomaron 3 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer[®] con EDTA como anticoagulante. Se depositó una gota en un portaobjetos y se colocó con un cubreobjetos.
- ❖ **Raspados de mucosa genital, piel y uñas.** Con ayuda de portaobjetos se raspó el área lesionada y se colectaron escamas. Estas se colocaron en un portaobjetos, se les adicionó KOH al 20%, se colocó un cubreobjetos y se calentó ligeramente a la flama.

- ❖ **Secreciones purulentas.** Se colectó la mayor cantidad posible con ayuda de una jeringa y se agregó una gota en un portaobjetos, se le adicionó KOH al 20%, se colocó un cubreobjetos y se calentó ligeramente a la flama.

El diagnóstico de candidosis activa mediante el examen directo al microscopio se basó en los siguientes criterios:

- ❖ **Para muestras no estériles** (orina, esputo, raspados de cavidad oral, etc.): la presencia de cúmulos de blastoconidios, por lo menos una pseudo hifa y/o presencia de hifas macrosifonadas, septadas e hialinas.
- ❖ **Para muestras estériles** (sangre y LCR): La presencia de al menos un blastoconidio, pseudo hifa y/o hifa verdadera.

Aislamiento a partir de las muestras biológicas

Las muestras biológicas se sembraron en ADS, Micosel, BiGGY y CHROMa. Se incubaron a 37° C por 48 a 72 h. Trascorrido este periodo, se analizó la presencia o ausencia de crecimiento, las características morfológicas de las colonias y el color de las colonias.

Identificación por métodos fenotípicos

A partir de colonias aisladas de 48 horas se realizaron las siguientes pruebas fenotípicas:

- **Formación de tubo germinal.** Se suspendió una colonia en 1 mL de suero humano y se incubó a 37° C por 2 h. Trascorrido este tiempo se colocaron 20 µL entre portaobjetos y cubreobjetos y se buscó al microscopio la presencia de tubos germinales.
- **Morfología en agar harina de maíz + Tween80 al 1% (AHT80).** Se sembró una asada en este medio realizando una línea recta a través del medio. Se incubó a temperatura ambiente durante 7 días. Después se realizó la observación del

medio de cultivo directamente al microscopio. Se observó la morfología de los blastoconidios, pseudohifas e hifas, así como la presencia de clamidoconidios.

- **Asimilación de sustratos como fuentes de carbono.** Se utilizó el *kit* API 20C Yeast. A partir de una colonia pura se realizó una suspensión en 2 mL de solución salina isotónica estéril hasta una concentración equivalente al tubo 2 de la escala de Mc Farland. Se tomaron 100 µL y se diluyeron en la solución API C, se agitó y se colocaron aprox. 120 µL en cada uno de los 20 pocillos de la tira API (cada pocillo contiene una sola fuente de carbono). Esta tira se colocó en una cámara húmeda y se incubó a 30° C por 48 a 72 h. Después se evaluó el desarrollo en cada pocillo mediante la ausencia o presencia de turbidez. La turbidez indica la asimilación del sustrato como fuente de carbono.

Tabla 5. Sustratos que contiene la tira API 20C Yeast

API 20 C	
D-glucosa	metil-αD-glucopiranosido
glicerol	N-acetil-glucosamina
2-ceto-gluconato	D-celobiosa
L-arabinosa	D-lactosa
D-xilosa	D-maltosa
adonitol	D-sacarosa
xilitol	D-trehalosa
D-galactosa	D- melezitosa
inositol	D-rafinosa
D- sorbitol	

La identificación fenotípica se basó en los resultados de la **Tabla 6**.

Figura 13. Esquema del montaje de la tira API 20C Yeast

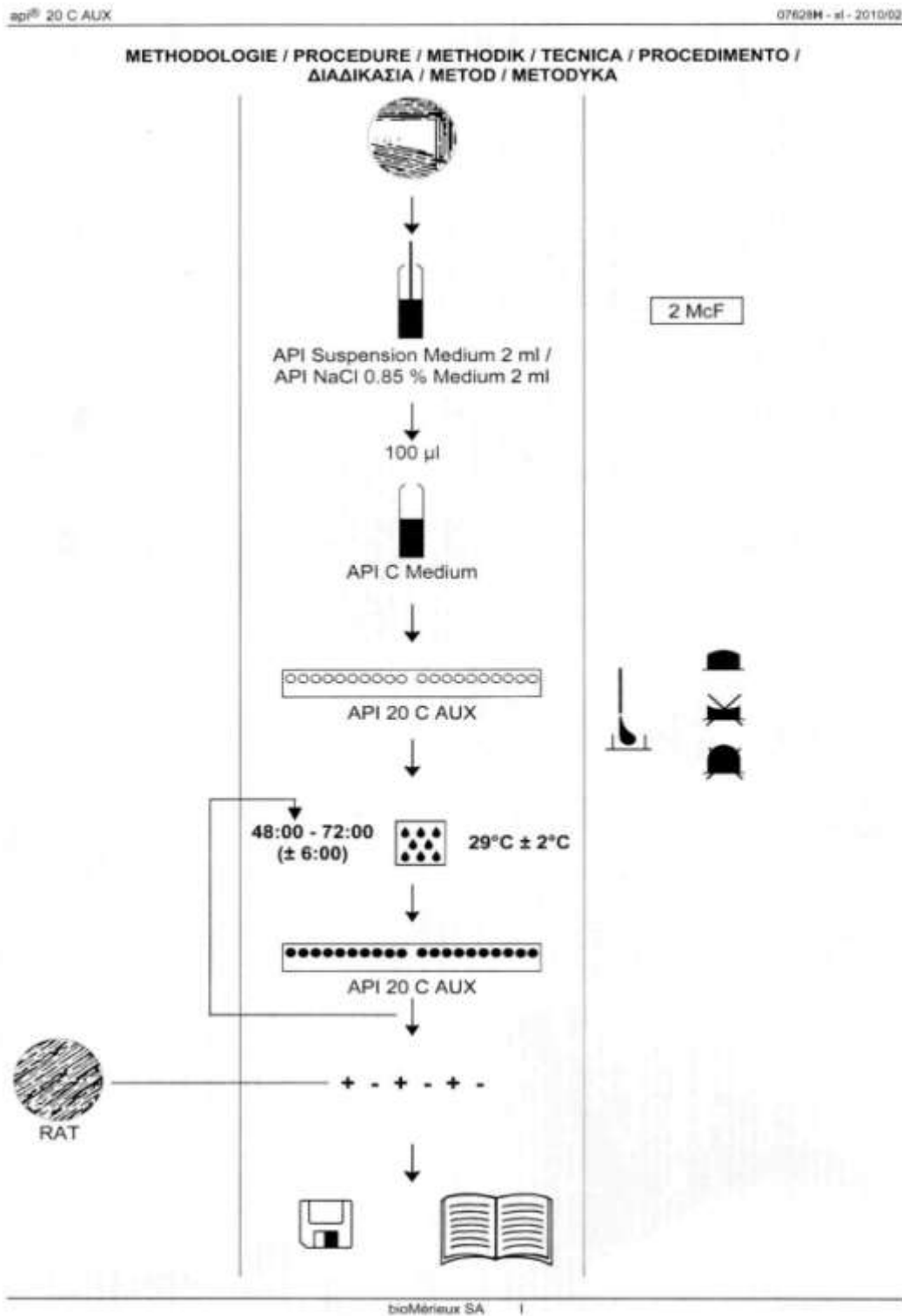


Tabla 6. Identificación fenotípica de *Candida* spp.

Organismo	Características fisiológicas					Asimilación de carbohidratos																		
	Pseudo hifas	Clamidoconidios	Tubo germinal	Micosele	CHROMagar <i>Candida</i> (color de las colonias)	glucosa	glicerol	2-cetoglutarato	arabinosa	xilosa	adonitol	xilitol	galactosa	inositol	sorbosa	metil D-glucopiranosido	n-acetilglucosamina	celobiosa	lactosa	maltosa	sacarosa	trehalosa	melezitosa	rafinosa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	Verde claro	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	Verde oscuro	+	R	+	-	R	+	+	+	-	+	R	+	-	-	+	+	R	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	Rosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	R	Azul	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>C., parapsilosis</i>	+	-	-	-	Rosa pálido	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	Rosa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	-	+	Blanco	+	R	-	-	-	-	-	+	-	R	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+	Blanco	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	-	Blanco	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	+	-	-	-	Rosa pálido	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Identificación molecular de los aislamientos clínicos

Extracción de DNA

A partir de una colonia pura de cada aislado se realizó una resiembra en agar YEPD y se incubó a 30° C por 48 horas. Se tomaron 4 colonias aisladas y se colocaron en un tubo eppendorf con 400 µL de buffer de lisis, 400 µL de cloroformo y 300 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Las células fueron lisadas mediante agitación vigorosa en *vortex* a máxima *velocidad* durante 5 min. Después, se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 rpm y la fase acuosa se lavó con 400 µL de cloroformo, se agitó 30 segundos en el *vortex* y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 10,000 rpm.

La fase acuosa se pasó a otro tubo eppendorf, se le adicionó 400 µL de isopropanol frío y se dejó precipitar a -20° C durante 1 h (el pp. es DNA). Se centrifugó durante 5 min a 10,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados del precipitado con 400 µL de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 min a 10, 000 rpm.

Finalmente, se descartó el sobrenadante, se evaporó el remanente de alcohol durante 40 min a 55° C, se adicionaron 40 µL de agua bidestilada estéril y se incubó a 55° C por 1 hora la disolución del DNA. La extracción e integridad del DNA se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1% suplementado con bromuro de etidio. La concentración de DNA fue medida con Nanodrop ND 2000 (ThermoScientific) a 260nm.

Amplificación de la región ITS por PCR

Se utilizaron los *primers* universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). La PCR se realizó en un volumen final de 20 µL conteniendo 1 µL de DNA muestra, 1 µM de cada *primer*, 100 µM de dNTP's, 2 µL de 10X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl₂ y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente:

Ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1x	Desnaturalización inicial	95° C	5 min
30x	Desnaturalización	95° C	30 s
	Alineamiento	56° C	45 s
	Elongación	72° C	1 min
1x	Elongación final	72° C	7 min

El producto de amplificación se revisó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% suplementado con bromuro de etidio.

Digestión del fragmento ITS con *MspI* (PCR-RFLP)

La reacción de digestión se llevó a cabo en tubos eppendorf de 200 µL. Se adicionaron 8 µL del producto de amplificación de los *primers* ITS, 2.5 µL de Buffer Tango (Fermentas), 1 U de *MspI* (Fermentas). Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua bidestilada estéril. Estos tubos se incubaron a 37° C durante 2 h, tras lo cual se comprobaron los productos de digestión por electroforesis en gel de agarosa al 2% suplementado con bromuro de etidio.

Diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

Solo los aislamientos identificados como *C. albicans* por métodos fenotípicos y por patrones de bandeo mediante PCR-RFLP con *MspI* fueron probados con los *primers* DUB y PCR-RFLP con *AvrII*.

Amplificación con *primers* DUB del intrón del gen *ACT1* de *C. dubliniensis*

Se utilizaron los *primers* específicos para *C. dubliniensis* DUBF (5'-GTA TTT GTC GTT CCC CTT T-3') y DUBR (5'-GTG TTG TGT GCA CTA ACG TC-3'). La PCR se realizó en un volumen final de 20 µL conteniendo 1 µL de DNA muestra, 1 µM de cada *primer*, 100

μM de dNTP's, 2 μL de 10X PCR buffer, 2.5 mM de MgCl_2 y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente:

Ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1x	Desnaturalización inicial	95° C	5 min
30x	Desnaturalización	95° C	30 s
	Alineamiento	58° C	30 s
	Elongación	72° C	30 s
1x	Elongación final	72° C	10 min

El producto de amplificación se revisó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% suplementado con bromuro de etidio.

Digestión del fragmento ITS con *AvrII* (PCR-RFLP)

La reacción de digestión se llevó a cabo en tubos eppendorf de 200 μL . Se adicionaron 8 μL del producto de amplificación de los *primers* ITS, 2.5 μL de Buffer Tango (Fermentas), 1 U de *AvrII* (New England Biolabs). Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μL con agua bidestilada estéril. Estos tubos se incubaron a 37° C durante 2 h, tras lo cual se comprobaron los productos de digestión por electroforesis en un gel de agarosa al 2% suplementado con bromuro de etidio.

Amplificación de microsatélites de *C. albicans*

Se realizó la amplificación de los *loci* microsatélites CAI, CAIII y CAVI de 95 aislamientos de *C. albicans* utilizando los siguientes *primers*. Los *primers forward* se marcaron con fluorocromos.

Primer	Secuencia	Fluorocromo
CAIF	5'-ATG CCA TTG AGT GGA ATT GG-3'	FAM
CAIR	5'-AGT GGC TTG TGT TGG GTT TT-3'	-
CAIIF	5'-TTG GAA TCA CTT CAC CAG GA-3'	FAM
CAIIR	5'-TTT CCG TGG CAT CAG TAT CA-3'	-
CAVIF	5'-ACA ATT AAA GAA ATG GAT TTT AGT CAG-3'	HEX
CAVIR	5'-TGC TGG TGC TGC TGG TAT TA-3'	-

FAM.6-carboxifluoresceína

HEX. Hexaclorofluoresceína

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR a un volumen final de 25 μ L, conteniendo 25 ng de DNA de aislamientos de *C. albicans*, 2.5 μ L de Buffer 10x, 0.2 mM, 0.25 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTP's, 2 μ L de 10X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente:

Ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1x	Desnaturalización inicial	95° C	2 min
30x	Desnaturalización	95° C	30 s
	Alineamiento	56° C	30 s
	Elongación	72° C	1 min
1x	Elongación final	72° C	7 min

Los productos de amplificación se revisaron por electroforesis en un gel de agarosa al 3% suplementado con bromuro de etidio.

El tamaño de los productos de amplificación se determinó en un secuenciador ABI Prism 3730. El número de unidades de repetición fue obtenido con el programa Gene Scan 3.7 analysis Software y con PeakScanner 2.0 de AppliedBiosystems. Los alelos se designaron por el número de unidades de repetición.

Análisis estadístico

Se calculó el poder de discriminación de la genotipificación con CAI, CAIII y CAVI, CAI-CAVI y de los tres microsatélites de acuerdo al índice de diversidad de Simpson:

$$DP = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

Donde:

N es el número de aislamientos genotipificados, s es el número de genotipos obtenidos, y n_j es el número de aislamientos con el genotipo j .

Se utilizó el programa Populations 1.2.32 para calcular las distancias genéticas entre los genotipos utilizando el coeficiente D_c de Cavalli-Sforza y Edward's (Takezaki, *et al*, 1996); el programa MEGA 5.2 para construir árboles por el método Neighbor-Joining utilizando los valores de D_c calculados. Se utilizó el programa Structure 2.3.4 para inferir el número de grupos posibles (K) en los que se agrupan los aislamientos de *C. albicans* de acuerdo a su genotipificación.

Resultados

Datos de pacientes y aislamientos

Estudio retrospectivo, transversal, descriptivo y observacional en el que se analizaron un total de 1,164 muestras biológicas provenientes de 823 pacientes durante Enero 2011 a Mayo de 2013. Solo en 169 pacientes se realizó el diagnóstico de candidosis y a partir de estos se obtuvieron 220 aislamientos. El 56.2% (95) de los pacientes fueron hombres y 43.8% (74) mujeres, con un rango de edad entre 3 días a 84 años (**Figura 14**). El 53.3% (90) de los pacientes con candidosis tenían una edad entre 30 y 59 años de edad. Durante los últimos 5 años, 42.5% (71) residieron en el Distrito Federal, 27.5% (46) en el Estado de México, 3.6% (6) en otros estados de la República (2 de Hidalgo, 1 de Guerrero, 1 de Chiapas, 1 Michoacán, 1 Puebla y 1 de Veracruz) y una paciente proveniente de Honduras. No se pudo conocer la residencia de 42 de los pacientes.

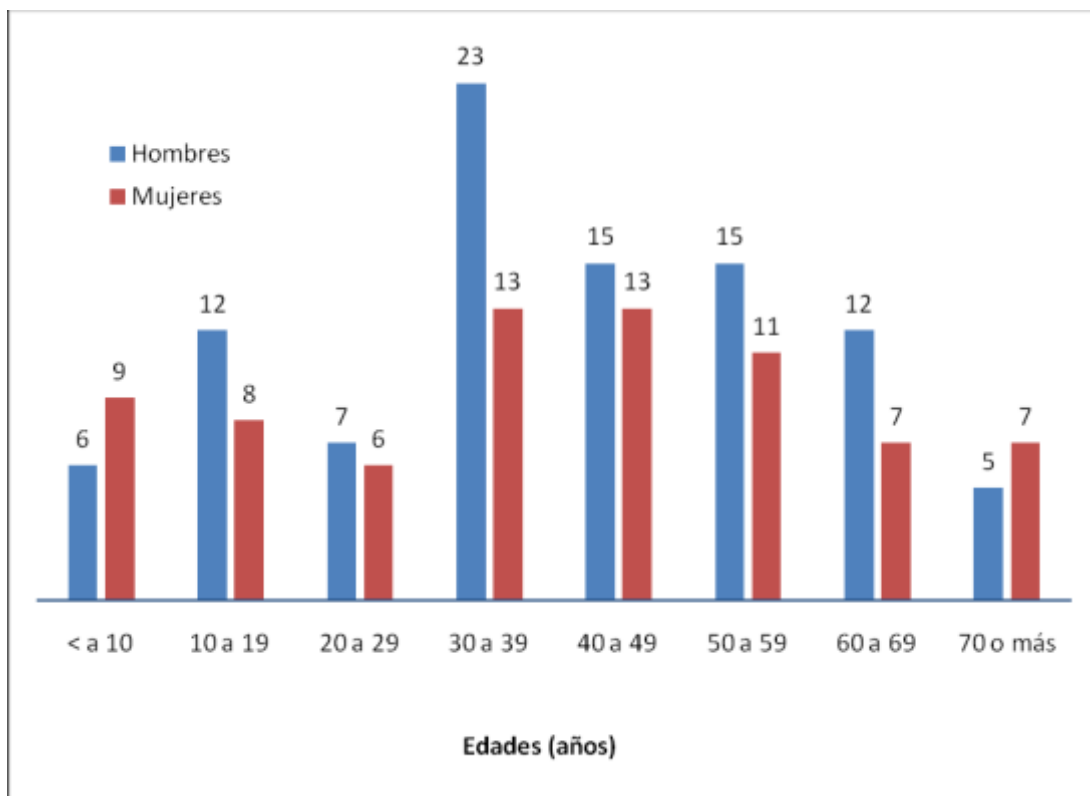


Figura 14. Distribución de edades y sexo de pacientes con candidosis durante el periodo de estudio.

Las muestras provinieron de diferentes servicios: 24.3% (41) de UCI, 23.7% (40) de Medicina Interna, 10.7% (18) de Hematología, 10.7% (15) de Infectología, 6.5% (11) de Neumología, 7.7% (13) de UCI Pediatría y 18.3% (31) de diferentes (Consulta externa, Dermatología, Endocrinología, Oncopediatría, Reumatología, Trasplantes, Urgencias, Cardiología, Neurología, Ginecología, Otorrinolaringología, Cirugía Pediátrica, Geriatria, Nefrología y Quimioterapia ambulatoria).

Dado que la candidosis es una micosis oportunistas y solo se presenta en individuos con alguna condición comórbida, se estudió la historia clínica de los pacientes, y se encontró que 27.8% (47) de los pacientes padecían de infecciones de tracto respiratorio inferior (bronquitis, bronco alveolitis, neumonía adquirida en la comunidad, neumonía atípica, neumonía asociada a ventilador y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda), 13.0% (22) enfermedades oncohematológicas (leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda, granulomatosis, leucemia linfocítica aguda y mieloma), 4.7% (8) tuberculosis, 5.9% (10) diabetes mellitus tipo II, 5.9% (10) VIH/SIDA, 42.4% (4) infecciones de vías urinarias y 54.1% (119) diversos tipos de padecimientos no relacionados (ascitis, encefalopatías, otomicosis crónica, meningitis, nefrectomía, entre otras).

Diagnóstico de candidosis en el laboratorio de rutina

El diagnóstico de candidosis y el aislamiento de los agentes etiológicos se realizó a partir de varios tipos de muestras biológicas, las más frecuentes fueron esputo, orina, sangre y raspados y lavados de cavidad oral. El 89.5% (197) de los aislamientos provino de muestras biológicas de zonas corporales donde *Candida* es parte la microbiota (**Tabla 7**).

A continuación se presentan ejemplos de algunas variedades clínicas de candidosis atendidas durante el periodo de estudio:

- Onicomycosis por *Candida*: Se observó afectación de las uñas del dedo medio e índice de un niño de 1 año de edad. Las uñas presentaron paroniquia, con

engrosamiento del borde lateral y distal unguial y onicosis (separación de la uña; **Figura 15**).

Tabla 7. Porcentaje de aislamientos de *Candida* obtenidos por tipo de muestra

Muestra	no. de aislamientos
esputo / expectoración	86
orina	79
cavidad oral	27
sangre	12
raspado de piel	2
exudado genital	5
secreción purulenta	2
secreción ótica	1
lavado bronco alveolar	1
uña	5
Total	220



Figura 15. Onicomicosis por *Candida*.

- Candidosis cutánea: paciente femenino de 80 años con diabetes mellitus que presentó lesión eritematosa con borde activo y ligera descamación en el pliegue submamario y axila. Esta lesión era muy pruriginosa y se observaron placas satélites cercanas a la zona afectada (**Figura 16**). La paciente padece de diabetes mellitus tipo II y declara una falta de aseo en las regiones afectadas.



Figura 16. Candidosis cutánea en intertrigo submamario.

- Candidosis oral: placas pseudo membranosas con fondo eritematoso en lengua de paciente VIH/SIDA (**Figura 17**). El paciente refiere ardor y dificultad para tragar.



Figura 17. Candidosis oral en paciente VIH/SIDA

A través del examen directo con KOH al 20% se pudieron visualizar las morfologías que indican una candidosis activa. En las muestras no estériles, la presencia de cúmulos de blastoconidios y/o pseudo hifas fueron los criterios para el diagnóstico de candidosis activa:

- Al realizar el examen directo a partir del raspado de la uña del paciente de la **Figura15**, se observaron pseudo hifas cortas de *Candida* (**Figura18**).

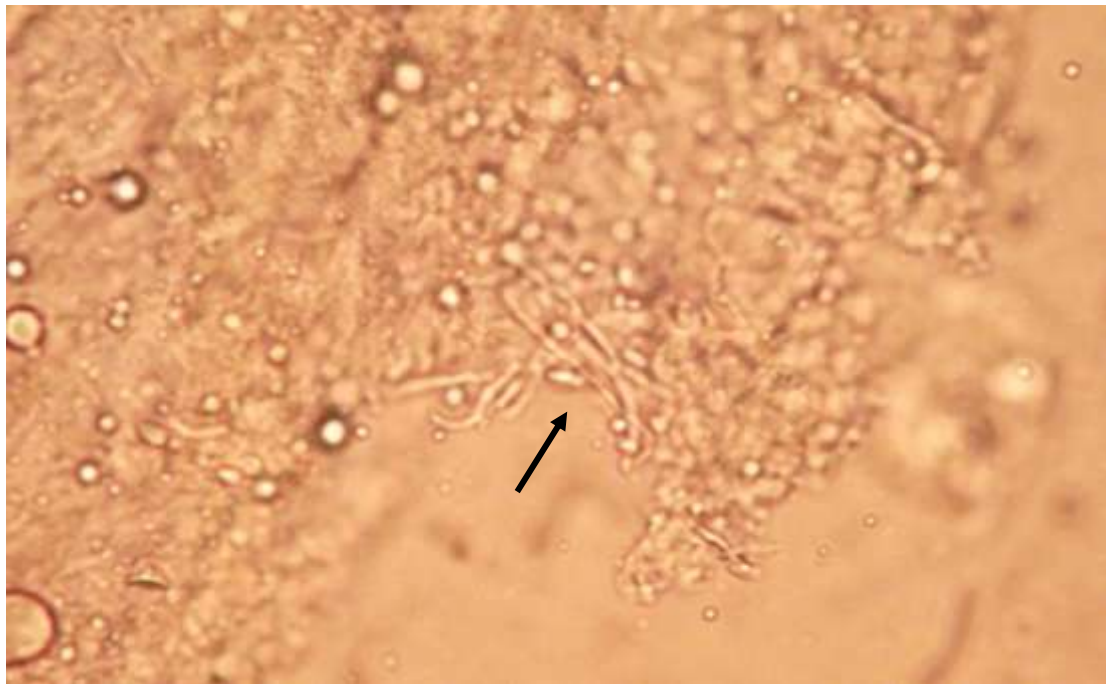


Figura 18. Examen directo con KOH al 20% de raspado de uñas (40x). Se observan pseudo hifas pequeñas (flecha)

- A partir del esputo de un paciente con neumonía adquirida en la comunidad, se observaron al examen directo pseudo hifas (**Figura 19**).
- A partir del sedimento de una muestra de orina de un paciente con infección de vías urinarias se observaron cúmulos de blastoconidios de aprox. 1 a 2 μm (**Figura 20**).

Es importante mencionar que las muestras biológicas fueron tomadas recientemente (menos de una hora) y otras tomadas directamente en el laboratorio e inmediatamente procesadas para evitar contaminación.



Figura 19. Examen directo con KOH al 20% de esputo (40x).

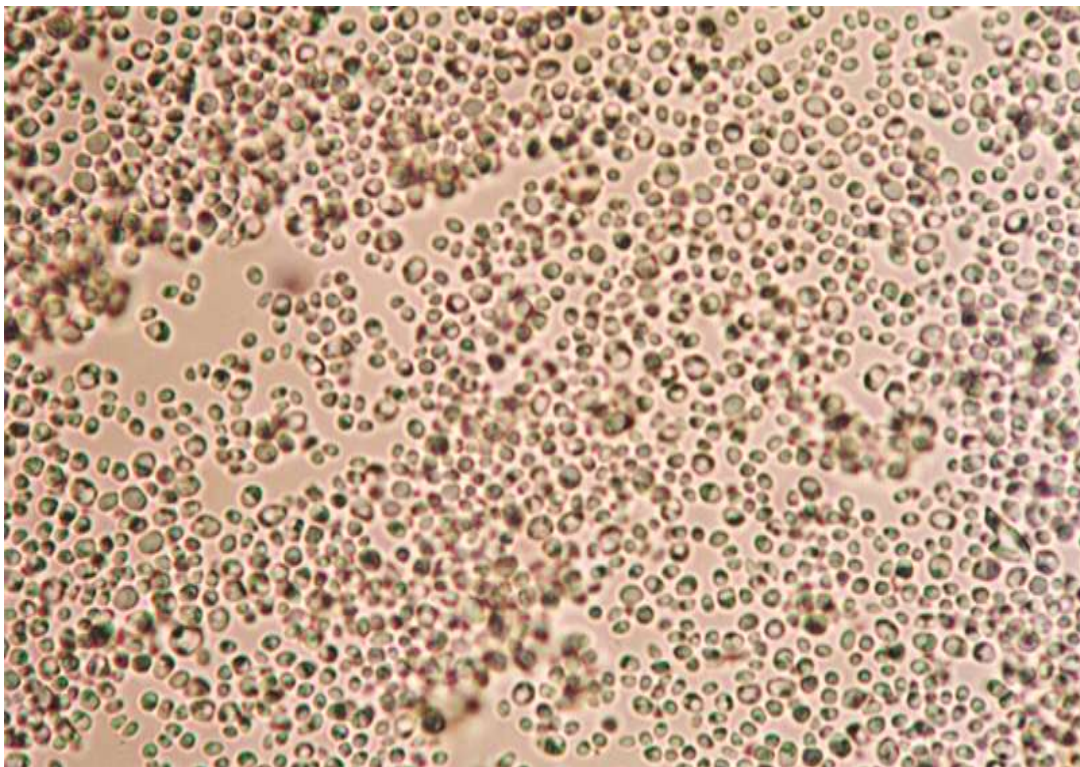


Figura 20. Examen directo de sedimento urinario (40x).
Múltiples blastoconidios pequeños, probablemente *C. glabrata*

Al examen directo de las muestras estériles (sangre) no se pudo observar ninguna estructura celular de *Candida*, por lo que la infección en sangre solo pudo ser diagnóstica mediante el desarrollo de colonias de *Candida* en los medios de cultivo ADS, Micosel y BiGGY (**Figura 21**).



Figura 21. Hemocultivo de *C. albicans* y desarrollo en ADS, Micosel y BiGGY

Identificación por métodos fenotípicos

La identificación fenotípica se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunoalergología y Micología Médica del HJM, SSA., OPD. como parte del servicio de rutina. Las características en las que se basó la identificación de cada especie de *Candida* fueron las siguientes:

- ***C. albicans***. Desarrollo de tubo germinal en *pool* de suero humano después de incubar a 37° C por 2 horas, desarrollo de pseudo hifas e hifas en AHT80, colonias de color verde en CHROMagar y clamidoconidios terminales en ATH80 (**Figura 22**).

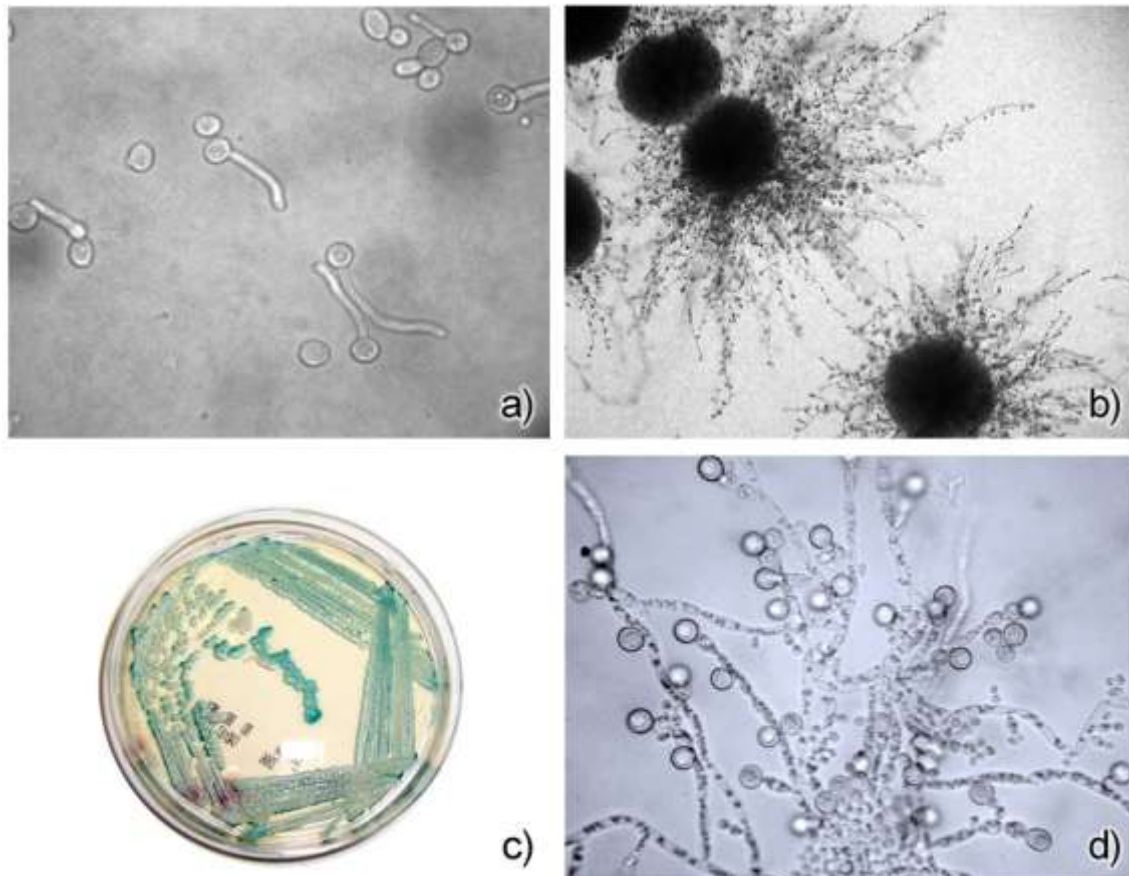


Figura 22. Características fenotípicas de *C. albicans*.

a) Tubo germinal, b) colonias filamentosas en agar harina de maíz + Tween 80 al 1%, c) colonias verdes en CHROMagar *Candida*, d) clamidoconidios.

- ***C. dubliniensis*.** Al igual que *C. albicans* general tubo germinal e hifas en medio ATH80; sin embargo desarrollan colonias de un verde más oscuro den CHROMagar *Candida* y abundantes clamidoconidios terminales e intercalares en ATH80. De los dos aislamientos identificados como *C. dubliniensis*, solo uno generó abundantes clamidoconidios y el otro colonias verde oscuro en CHROMagar *Candida* (**Figura 23**).

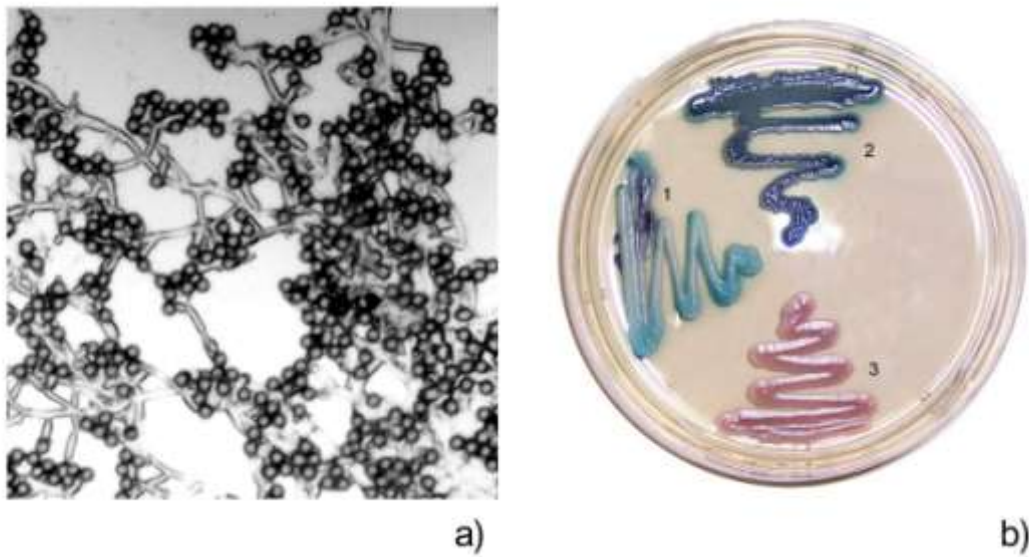


Figura 23. Características fenotípicas de los aislamientos de *C. dubliniensis* a) clamidoconidios múltiples del aislamiento CA-30 y b) CHROMagar *Candida* con colonias verde-oscuro del aislamiento 418-12 (no. 2), colonias verdes de *C. albicans* (no. 1) y colonias rosas de *C. glabrata* (no. 3).

- *C. tropicalis*. Desarrollo de colonias de color azul en CHROMa y desarrollo de pseudo hifas e hifas verdaderas en ATH80.

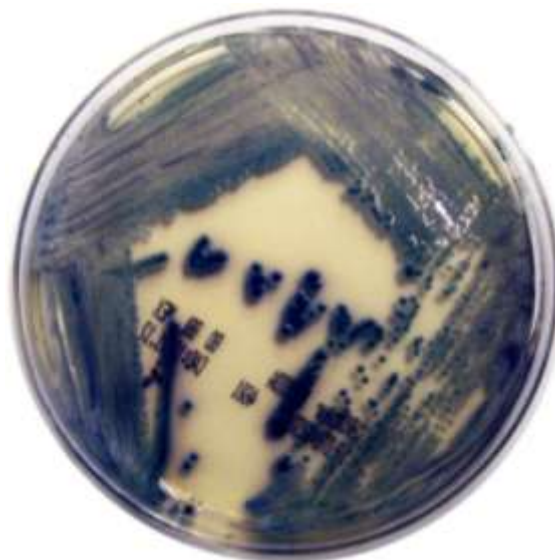


Figura24. Colonias de *C. tropicalis* en CHROMagar *Candida*

- **C. glabrata.** Desarrollo de colonias de color rosadas y lisas en CHROMa. Todos los aislamientos que no desarrollaron ni tubo germinal, pseudo hifas o hifas verdaderas fueron identificados como *C. glabrata*.



Figura 25. Colonias de *C. glabrata* en CHROMagar *Candida*

- **Candida spp.** El resto de las especies fue identificado de acuerdo al perfil de asimilación de carbohidratos observado en la tira API 20 C Aux (Figura 26). La utilización de CHROMa se vio limitada, ya que las colonias de *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* desarrollaron colonias de color parecido a *C. glabrata* (Figura 27), pero si diferenciaron de estas por la formación de pseudo hifas e hifas en ATH80.

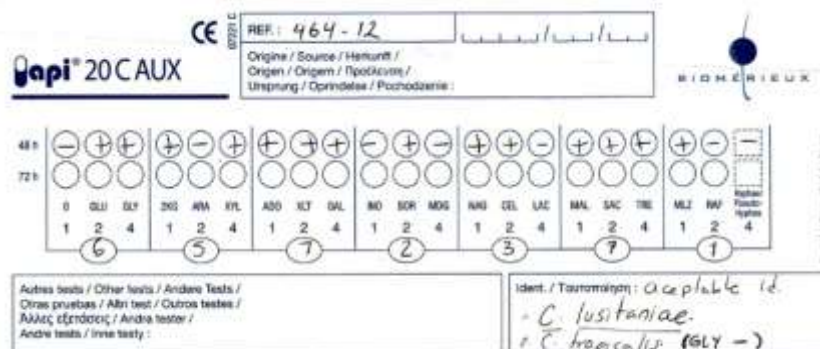


Figura 26. Perfil de asimilación de carbohidratos de *C. lusitaniae*



Figura 27. Colonias de *C. lusitanae* en CHROMagar *Candida*

De acuerdo a sus características fenotípicas fueron identificadas 155 *C. albicans*, 37 *C. tropicalis*, 11 *C. glabrata*, 11 *C. parapsilosis*, 2 *C. guilliermondii*, 2 *C. dubliniensis* y 1 *C. lusitanae*. El aislamiento 413-13 no pudo ser tipificado, solo se pudo identificar a nivel de género mediante la tira API 20C Yeast y por tanto se le reportó como *Candida* sp.

Identificación por métodos moleculares

Aunque la mayoría de los hongos de importancia médica pueden ser identificados mediante estos métodos, la diferenciación de especies con características morfológicas y bioquímicas similares es complicada. Más aún, estas pruebas requieren de la experiencia y juicio del observador lo cual puede comprometer la fiabilidad de la identificación.

Por estas razones y el aparente aislamiento de especies de baja frecuencia (está es la primera vez que se reportaron infecciones por *C. dubliniensis* y *C. lusitanae* en el Hospital Juárez de México) se corroboró la identificación de estos aislamientos mediante PCR-RFLP de la región ITS del rDNA.

Identificación de *Candida* mediante PCR-RFLP con *MspI*

La región ITS del rDNA está presente en todos los eucariontes y ha sido ampliamente utilizada para la identificación de hongos mediante su amplificación con los *primers* ITS1 e ITS4 .

El DNA de los aislamientos fue extraído por ruptura con perlas de vidrio (se obtuvieron entre 200 a 400 ng/μL) y se realizó la PCR con los *primers* ITS1 e ITS4 utilizando como controles positivos las cepas tipo antes mencionadas. Con ITS1 e ITS4 se amplificaron fragmentos de diferentes tamaños para 7 especies: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*. La longitud de estos fragmentos fue de entre 382 y 882 pb (**Figura 28a**).

Tras la digestión de estos fragmentos con la enzima *MspI* y su corrimiento en agarosa al 2% se observaron patrones de bandas específicos para 5 de las especies de *Candida* (todas excepto *C. albicans* y *C. dubliniensis*, ya que estas generaron el mismo patrón de bandas; **Figura 28b**).

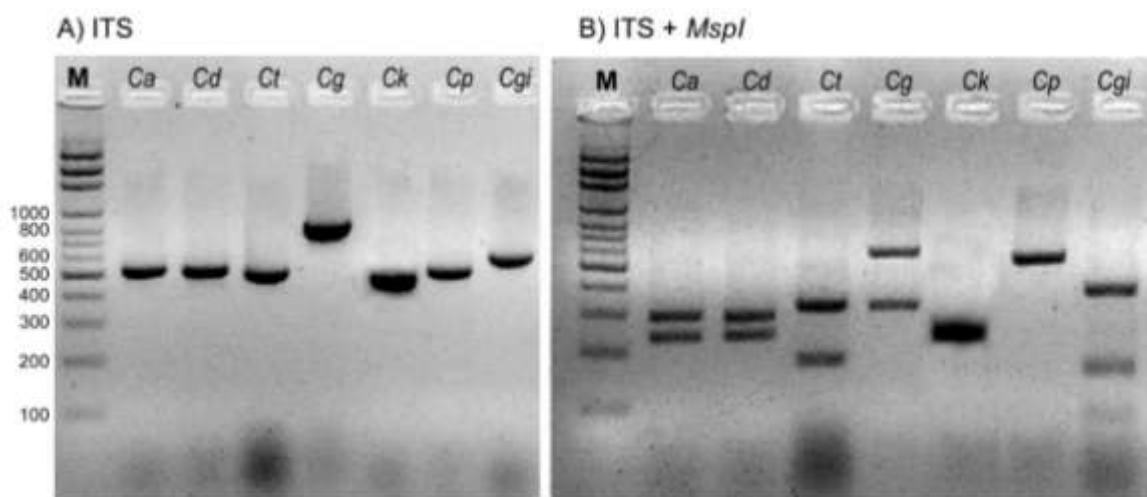


Figura 28. A) Productos de amplificación de los *primers* ITS y B) Digestión de los productos con *MspI*. Ca., *C. albicans* ATCC 90028, Cd., *C. dubliniensis* CD 36, Ct., *C. tropicalis* ATCC 750, Cg., *C. glabrata* ATCC 2001, Ck., *C. krusei* ATCC 6258, Cp., *C. parapsilosis* ATCC 22019 y Cgi. *C. guilliermondii* ATCC 6260. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los aislamientos fueron identificados por comparación con los patrones obtenidos a partir de las cepas tipo (**Figura29**).

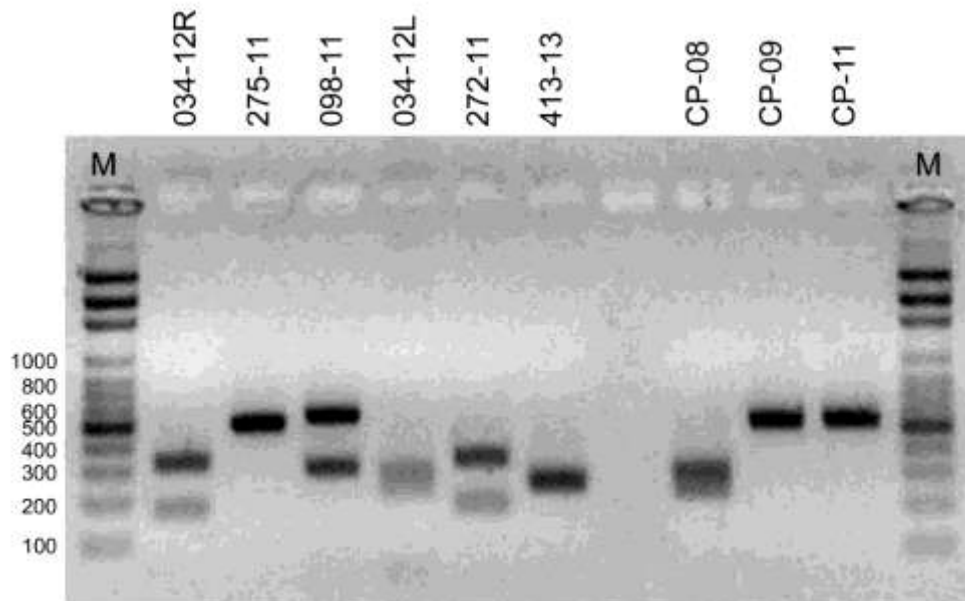


Figura 29. Identificación de aislamientos de *Candida* por PCR-RFLP con *MspI*. Aislamientos 034-12R y 272-11, *C. tropicalis*, 275-11, CP-09, CP-11, *C. parapsilosis*, 098-11, *C. glabrata*, 034-12L, CP-08, *C. albicans*, 413-13, *C. krusei*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

El aislamiento 464-12, previamente identificado como *C. lusitaniae* y otros dos aislamientos (438-12 y 482-12) presentaron un patrón de dos bandas y no pudieron ser identificados por comparación con las bandas de las cepas tipo (**Figura 30**).

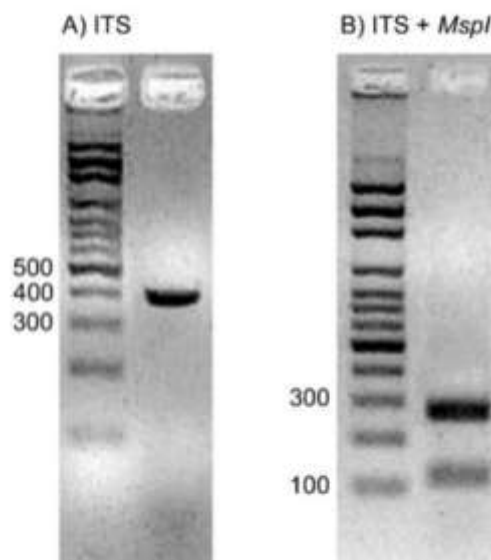


Figura 30. Patrones de ITS y digestión con *MspI* del aislamiento 464-12 (identificado como *C. lusitaniae*).

Para corroborar la identificación de estos aislamientos, se secuenció el fragmento de las secuencias ITS y esta fue analizada con BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y correspondió con un 100% de similitud con la secuencia del mismo *locus* de la cepa tipo *C. lusitaniae* CBS 10625 (no. de acceso EU149777.1). El tamaño de los fragmentos generados después de la digestión con *MspI* para cada especie de *Candida* identificada en este estudio se presenta en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Tamaño de los amplificadores con los *primers* ITS y de los productos de digestión con *MspI*.

Especie	Tamaño del ITS (pb)	Tamaño de los fragmentos de RFLP con <i>MspI</i>
<i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i>	537	239, 298
<i>C. tropicalis</i>	526	186, 340
<i>C. glabrata</i>	881	320, 561
<i>C. parapsilosis</i>	530	530
<i>C. krusei</i>	510	250, 260
<i>C. guilliermondii</i>	607	82, 151, 370
<i>C. lusitaniae</i>	382	118, 264

La utilización del método de PCR-RFLP en los aislamientos tipificados por métodos fenotípicos, permitió registrar varios aislamientos que estaban erróneamente clasificados (**Tabla 9**). Además, el aislamiento 413-13, que no pudo ser tipificado por métodos fenotípicos, se identificó como *C. krusei*.

En la literatura se ha reportado la similitud fenotípica y genotípica de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. El método de PCR-RFLP/ *MspI* no diferencia a estas dos especies, sin embargo existen dos métodos que permiten diferenciarlas:

- PCR-RFLP con la enzima *AvrII*
- Amplificación con *primers* específicos DUB del intrón del gen *ACT1* de *C. dubliniensis*

Tabla9. Aislamientos identificados incorrectamente por métodos fenotípicos y corregidos mediante métodos moleculares.

Aislamiento	Identificación fenotípica	Identificación molecular
CP-08	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
225-12B	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
103-12	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
198-12	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
164-12B	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
CT-19	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
410-12A	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
107-13	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
047-13	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
PAM01	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
413-13	<i>Candidasp.</i>	<i>C. krusei</i>
482-12v	<i>C. albicans</i>	<i>C. lusitaniae</i>
438-12	<i>C. albicans</i>	<i>C. lusitaniae</i>
CA-48	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Cgu-02	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Cgl-06	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
418-12	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>
050-13	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
083-13	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
144-13	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
148-13	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
108-13	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>

Diferenciación molecular de *C. albicans* / *C. dubliniensis* PCR-RFLP con *AvrII*

A partir de los fragmentos amplificados con los *primers* ITS1 e ITS4 se realizó la digestión con la enzima *AvrII*, utilizando como control positivo a *C. dubliniensis*(CD36) y como control negativo *C. albicans* ATCC 90028. Se observó la digestión con *AvrII* únicamente en el control positivo, donde se generaron dos bandas de 340 pb y 200 pb. El fragmento amplificado del aislamiento CA-30 no se digirió con la enzima, mostrando esto que a pesar de tener un fenotipo similar a *C. dubliniensis* genotípicamente es *C. albicans* (**Figura 31**).

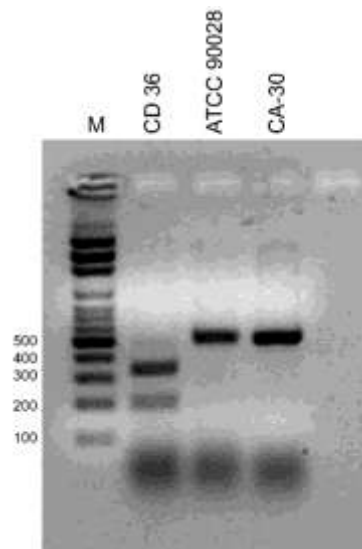


Figura 31. Digestión de los fragmentos amplificados con ITS1 e ITS4 con *AvrII*.

Amplificación con *primers* DUB

Todos los aislamientos previamente identificados como *C. albicans*/*C. dubliniensis* por PCR-RFLP/ *MspI* se sometieron a la amplificación con estos *primers*. Ninguno de los aislamientos analizados amplificó el fragmento característico de 288pb presente en la cepa tipo *C. dubliniensis*CD36 (Figura 32).

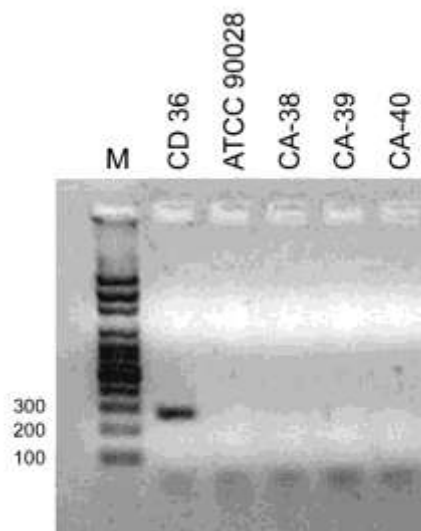


Figura 32. Productos de amplificación de los *primers* DUB.

Comparación entre la identificación fenotípica y la molecular

Comparando la tipificación fenotípica con la molecular, se observó que el 10 % (22 de 220) de los aislamientos se identificó de manera incorrecta, mientras que el aislamiento 413-13 solo pudo ser identificado por métodos moleculares ya que los métodos fenotípicos solo pudieron identificar a nivel de género.

Utilizando la prueba de tubo germinal, color de las colonias en medio de CHROMagar *Candida* y presencia de clamidoconidios en AHT80 se pudieron identificar correctamente el 93.5% (145) de los aislamientos de *C. albicans*. El 6.5% (10) de los aislados de *C. albicans* estuvo basada únicamente en el color, ya que no todos los aislamientos generaron tubos germinales o clamidoconidios.

La identificación de los aislamientos de *C. tropicalis* estuvo basada en el color de las colonias en CHROMa y la morfología en AHT80, sin embargo también hubo errores en su identificación. El desarrollo de colonias verde oscuro-azul en CHROMa identificó incorrectamente a algunos aislados de *C. tropicalis* como *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Para los aislamientos de *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, el color de la colonia en CHROMa es muy similar, así que la diferenciación se realizó mediante API 20C Yeast, la cual no fue acertada en todos los casos. La distribución de especies de *Candida* aisladas en pacientes del HJM se presenta a continuación en la **Tabla 10**.

Tabla10. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes del Hospital Juárez de México.

Especies de levaduras	# de Aislamientos	Porcentaje
<i>C. albicans</i>	154	70.0%
<i>C. tropicalis</i>	36	16.4%
<i>C. glabrata</i>	12	5.5%
<i>C. parapsilosis</i>	13	5.9%
<i>C. krusei</i>	1	0.5%
<i>C. guilliermondii</i>	1	0.5%
<i>C. lusitaniae</i>	3	1.4%
Total	220	

Estudiando la distribución de especies de *Candida* en cada año durante el periodo de estudio, se observó un aumento en las infecciones causadas por *C. albicans* del 57.5% en el 2011, al 73.6 % en 2012 y 86.8 % en 2013. En este mismo periodo se observó la disminución de *C. tropicalis* y *C. glabrata* (**Figura33**).

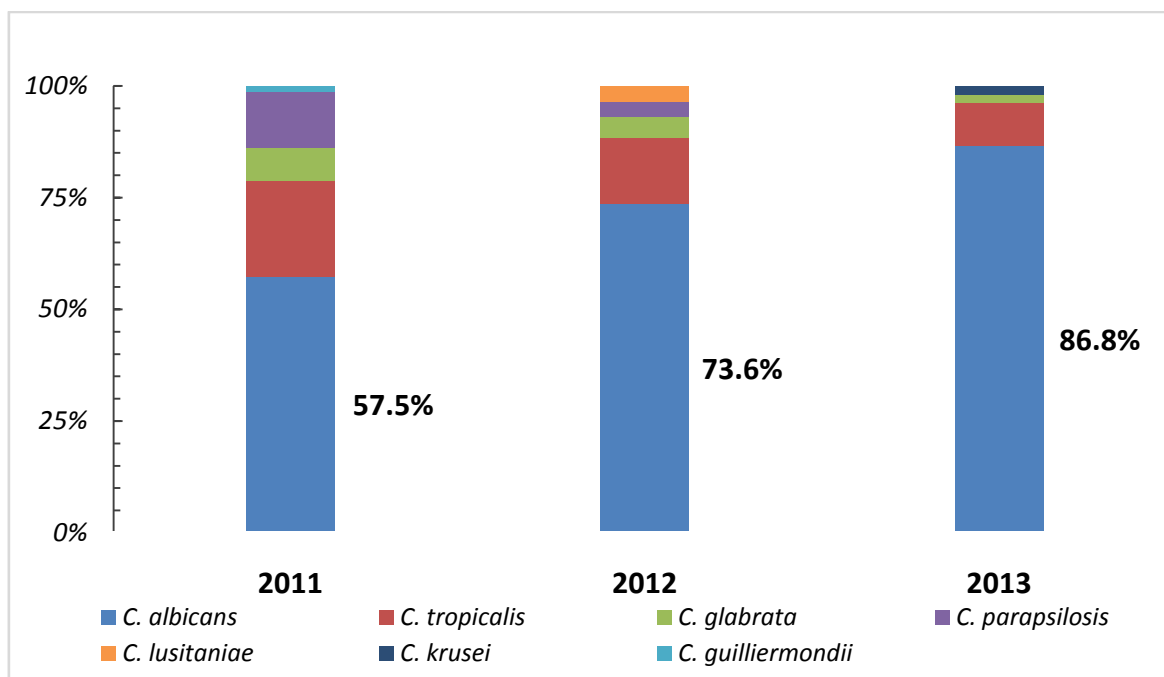


Figura 33. Frecuencia de candidosis causadas por *C. albicans* y especies no *albicans*

Además se observó que *C. albicans* fue la principal especie causante de las diferentes candidosis diagnosticadas (**Tabla 11**).

Tabla 11. Distribución de especies de *Candida* como agente causal en diferentes tipos de candidosis. IVU. Infección de vías urinarias, ITR. Infección de tracto respiratorio.

Especies	Onicomycosis	Candidosis genital	IVU	Candidemia	ITR	Cavidad oral
<i>C. albicans</i>	50 % (2)	60% (3)	64.6 % (51)	66.7% (8)	80.5% (70)	63.0 % (17)
<i>C. tropicalis</i>	-	-	20.3% (16)	16.7% (2)	11.5% (10)	26.0 % (7)
<i>C. glabrata</i>	-	20% (1)	7.6% (6)	8.3 % (1)	2.3% (2)	7.4% (2)
<i>C. parapsilosis</i>	50 % (2)	20% (1)	3.8% (3)	8.3 % (1)	4.6% (4)	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	1.3 % (1)	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	1.3% (1)	-	1.1% (1)	3.7% (1)
<i>C. krusei</i>	-	-	1.3% (1)	-	-	-

De las diferentes especies aisladas, es importante recalcar lo siguiente:

- ❖ Los 3 aislamientos de *C. lusitaniae* provienen de los pacientes 37 (438-12) y 122 (464-12 y 482-12), quiénes estuvieron internados durante Septiembre de 2012.

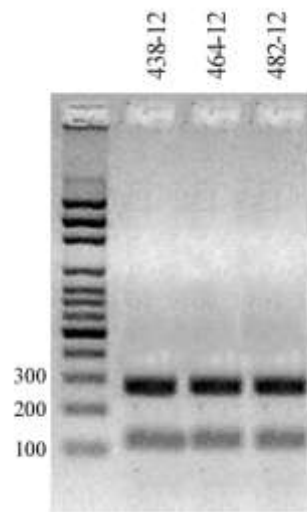


Figura 34. Bandas específicas de *C. lusitaniae* obtenidas por PCR-RFLP con *MspI* en tres aislamientos

- ❖ Se obtuvieron 11 hemocultivos positivos para *Candida* (**Fig. 21**), de los cuales se aislaron 7 *C. albicans* (CA-18, CA-79, 402-12h, 034-13L, 177-13, 364-12, 410-12A y 107-13; carriles), 2 *C. tropicalis* (034-12R y 108-13), 1 *C. glabrata* (186-13) y 1 *C. parapsilosis* (CP-03)

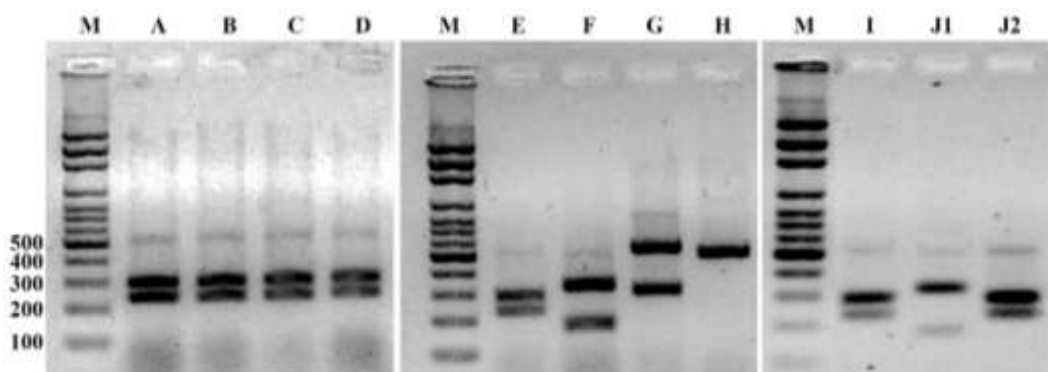


Figura 35. Aislamientos de *Candida* identificados por PCR-RFLP con *MspI*. M. marcador de peso molecular. A, B, C, D, E, I y J2, *C. albicans*, F y J1, *C. tropicalis*, G, *C. glabrata* y H. *C. parapsilosis*.

Genotipificación de *C. albicans* con microsatélites

Ha habido intentos de identificar aislamientos individuales en infecciones causadas por *C. albicans*, principalmente para detectar posibles infecciones nosocomiales. Los métodos fenotípicos no tienen la sensibilidad para este fin por lo que diferentes secuencias de DNA se han estudiado para lograr esta diferenciación. Sampaio y colaboradores identificaron tres secuencias de microsatélites específicas de *C. albicans* que permiten la diferenciación de cepas individuales. Debido a esto, en este trabajo analizamos con estos microsatélites la genotipificación de 95 aislamientos de *C. albicans*.

Tras la amplificación por PCR, se obtuvieron amplificadores de entre 100 a 500 pb para los diferentes *loci* de microsatélites. Dado que *C. albicans* es un organismo diploide, algunos aislamientos presentaron uno o dos alelos amplificados para cada *locus*; la presencia de una banda en el gel de agarosa al 3% nos indica que el aislamiento es homocigoto para ese *locus*, mientras que la presencia de dos bandas nos indica que es heterocigoto. De acuerdo a la **Figura 36**, el aislamiento 501-09 es heterocigoto para CAI, homocigoto para CAIII y homocigoto para CAVI, mientras que el 423-12 es heterocigoto para CAI, homocigoto para CAIII y heterocigoto para CAVI. Como se puede observar, si únicamente se hubieran analizado dos microsatélites (CAI y CAIII) se hubiera asumido que es el mismo aislamiento y se podría sugerir una transmisión dentro del hospital. Sin embargo el hecho de que CAVII varía en los dos aislamientos sugiere que son dos aislamientos diferentes.

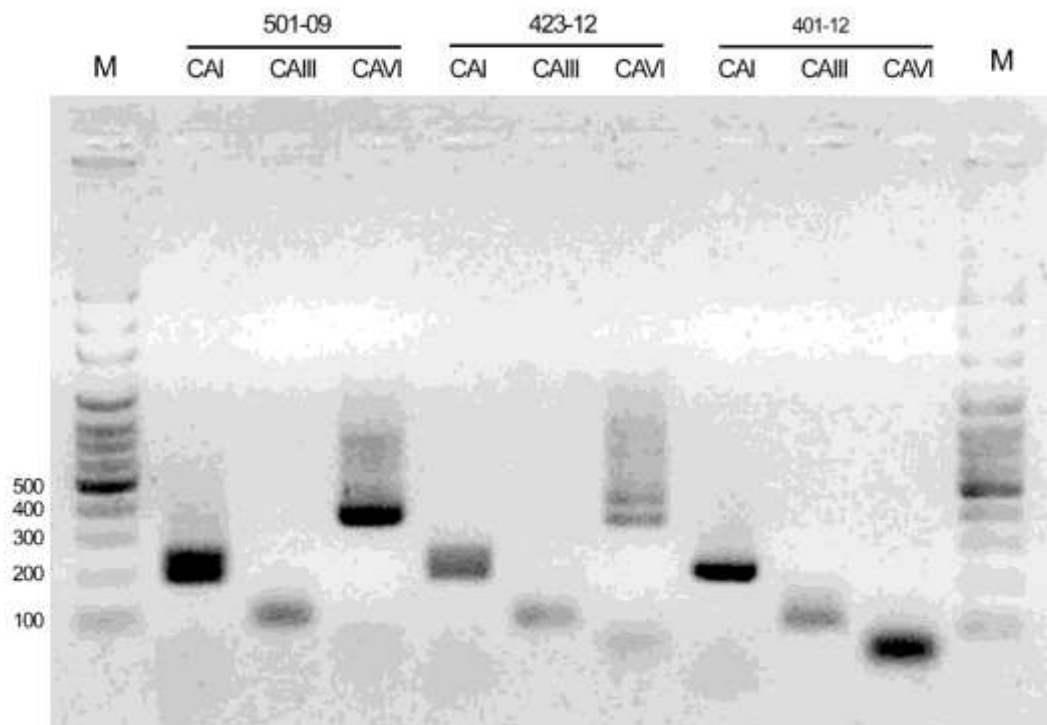


Figura 36. Productos de los *primers* CAI, CAIII y CAVI de los aislamientos 501-09, 423-12 y 401-12. Los aislamientos amplifican productos de similar tamaño en CAI (aprox. 250 pb), sin embargo en CAIII y CAVI los productos son de diferente tamaño.

Para determinar la longitud exacta y el número de repeticiones de los *loci* microsatélites, se realizó la PCR con los *primers forward* de CAI, CAIII y CAVI marcados con fluorocromos. Durante la PCR, el fluorocromo del *primer* se incorpora al amplificado y queda marcado. Los fragmentos marcados se introdujeron en el analizador de DNA Abi PRISM 3730 (Laragene, C.A. USA), en el que fueron separados en función de su longitud mediante una columna capilar y fueron detectados por la intensidad de la fluorescencia. El tamaño del fragmento es calculado mediante la adición de un estándar interno de tamaño conocido (ROX500).

Los resultados proporcionados por el equipo se observaron como perfiles de intensidad de señal de fluorescencia contra longitud en pares de bases y a partir de esos se calculó la longitud de cada fragmento (**Figura37**). Estos perfiles corresponden a las bandas observadas en los geles de agarosa.

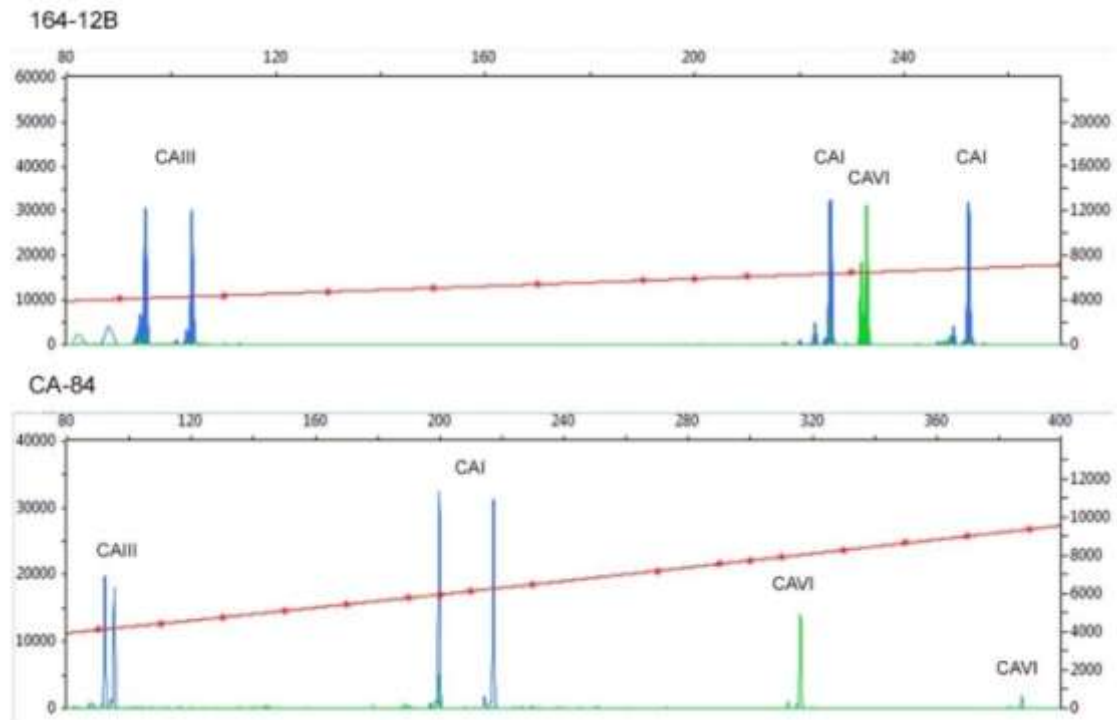


Figura 37. Perfiles obtenidos con PeakScanner de los fragmentos amplificados con los *primers* CAI, CAIII y CAVI de los aislamientos 164-12B y CA-84. Las bandas azules corresponden a los productos de CAI y CAIII marcados con FAM y las bandas verdes a los productos de CAVI marcados con HEX. La línea roja es el estándar ROX 500 utilizado para la determinación de pb.

A partir de la secuencia y la longitud de cada fragmento se obtuvieron el número de unidades de repetición para los alelos de los *loci* microsatélites. El genotipo de los aislados se designó de acuerdo al número de repeticiones en los alelos de cada microsatélites, por ejemplo, el aislamiento 103-12G tiene 35 repeticiones en el alelo 1 del *locus* CAI, y 45 repeticiones en el alelo2, 4 repeticiones en el alelo 1 del *locus* CAIII y 5 en el alelo 2 y para el *locus* CAVI ambos alelos poseen 5 repeticiones, por tanto su genotipo es 3545 0405 0505.

Tabla 12. Genotipos de los aislados de *C. albicans* de acuerdo al número de repeticiones de los loci CAI, CAIII y CAVI. A1. alelo 1, A2. alelo 2.

#	Aislamiento	CAI		CAIII		CAVI		#	Aislamiento	CAI		CAIII		CAVI	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2			A1	A2	A1	A2		
1	103-12G	35	45	04	05	05	05	51	469-12	40	45	05	08	05	05
2	108-13	33	38	07	08	06	09	52	47-13	39	39	10	10	08	08
3	150-13	52	52	05	10	08	08	53	474-12	23	33	04	05	05	05
4	161-13	35	35	04	05	02	29	54	478-12	39	56	05	10	08	08
5	164-12B	37	45	05	08	05	05	55	482-09	28	28	04	05	41	46
6	164-12G	37	45	05	08	05	05	56	482-12	33	40	04	05	13	15
7	174-13	28	35	04	05	02	25	57	483-09	40	42	10	10	18	18
8	175-13	33	33	07	08	06	06	58	485-12	29	33	04	04	05	15
9	198-12G	33	33	05	05	08	14	59	492-09	38	45	08	08	05	05
10	203-13	35	35	04	05	02	35	60	493-12	38	45	05	08	05	05
11	216-13	38	45	04	05	05	05	61	498-09	33	38	08	08	06	06
12	219-13	38	45	04	05	05	05	62	498-12	35	35	04	05	26	26
13	220-13	35	35	05	05	02	05	63	501-09	28	35	04	05	36	36
14	223-12	41	56	05	10	08	19	64	503-12	28	35	04	05	02	33
15	225-12B	38	38	04	05	04	05	65	527-12	28	35	04	05	02	02
16	225-12G	38	38	04	05	05	05	66	83-13	23	23	04	05	05	05
17	318-12	28	35	04	05	32	32	67	92-13	28	35	04	05	47	58
18	334-12	37	46	04	05	05	05	68	94-13	42	50	05	10	07	07
19	355-12	28	34	04	05	36	38	69	CA-10	28	34	04	05	26	26
20	358-11	45	45	10	10	08	08	70	CA-100	33	38	07	08	06	06
21	360-12	33	38	07	08	06	09	71	CA-102	37	45	05	08	05	05
22	364-12	34	59	05	10	08	08	72	CA-106	38	45	04	05	05	05
23	366-12	33	38	07	08	06	06	73	CA-107	36	43	05	10	19	19
24	375-12	28	35	04	05	02	34	74	CA-18	40	44	04	04	08	08
25	387-12	23	33	04	05	05	05	75	CA-30	39	43	05	10	08	11
26	390-12	31	35	05	10	06	06	76	CA-37	23	32	04	05	05	05
27	391-11VF	40	51	05	10	08	08	77	CA-38	37	45	05	08	05	05
28	394-12	38	45	05	08	05	05	78	CA-39	37	46	04	05	05	05
29	396-12	37	45	05	08	05	05	79	CA-40	38	45	04	04	05	05
30	398-12	39	45	05	08	05	05	80	CA-46	37	45	05	08	05	05
31	401-12	32	32	05	10	08	08	81	CA-51	38	44	04	05	08	08
32	402-12H	23	31	04	05	05	05	82	CA-57	29	33	04	04	05	05
33	402-12U	23	31	04	05	05	05	83	CA-68	39	39	05	10	08	08
34	403-09	28	35	04	05	02	23	84	CA-69	28	35	04	05	02	37
35	403-12	23	32	04	05	05	05	85	CA-79	40	51	05	10	08	08
36	410-12	23	31	04	05	05	05	86	CA-83	28	34	04	05	26	44
37	410-12	39	56	05	10	08	08	87	CA-84	28	34	04	05	26	44
38	415-09	28	35	04	05	21	21	88	CA-85	38	45	04	05	05	05
39	423-12	28	35	04	05	02	36	89	CA-87	37	46	04	05	05	05
40	430-12	40	45	05	08	05	05	90	CA-93	28	35	04	05	02	02
41	43-11	39	39	05	10	08	08	91	CA-94	37	45	05	10	05	05
42	439-12	37	46	04	05	05	05	92	CA-96	38	45	04	05	04	05

Tabla 12. Continuación.

#	Aislamiento	CAI		CAIII		CAVI		#	Aislamiento	CAI		CAIII		CAVI	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2			A1	A2	A1	A2	A1	A2
43	443-12	28	35	04	05	02	35	93	CA-99	37	45	05	08	05	05
44	451-09	28	35	05	05	02	16	94	CP-08	42	56	05	10	08	19
45	451-12	23	32	04	05	05	05	95	CT-19	40	51	10	10	08	08
46	45-13	40	47	10	10	08	13								
47	457-12	38	45	04	05	05	05								
48	462-12	40	40	05	10	06	16								
49	463-12A	23	31	04	05	05	05								
50	463-12S	23	31	04	05	05	05								

Utilizando los *primers* CAI se obtuvieron los 25 alelos: 23, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 51, 52, 56 y 59; con CAIII se obtuvieron 8 alelos: 4, 5, 7, 8 y 10; con CAVI se obtuvieron 31: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 44, 46, 47 y 58 (**Tabla13**).

Tabla13. Características de los *loci* microsatélites trabajados en este estudio

Microsatélite	No. De alelos	Tamaño (pb)	No de genotipos	DP
CAI	25	184 a 293	37	0.9513
CAIII	5	92 a 110	8	0.7059
CAVI	31	220 a 442	34	0.8183
CAI+CAIII+CAVI	-	-	66	0.9883

Utilizando el número de alelos y genotipos obtenidos se calculó el DP de cada microsatélites como sistema de genotipificación y de los tres en conjunto. El microsatélite CAI fue el de mayor DP (0.9513) sin embargo, muchos aislamientos compartieron el mismo genotipo, esto haría suponer la persistencia de cepas individuales de *C. albicans* ocasionando infecciones dentro del hospital (por ejemplo, 175-13 y 198-12G tienen el genotipo 3333 para CAI). Utilizando los tres microsatélites se obtuvo un DP de 0.9883 y se logró separar aquellos aislamientos que compartían el genotipo del *locus* CAI (175-13 tiene el genotipo 3333 0708 0606; mientras que 198-12G tiene el genotipo 3333 0505 0814, lo que los identifica como cepas diferentes.)

A partir de los alelos de los 3 *loci* microsatélites se calculó el coeficiente Dc de acuerdo al modelo de Cavalli-Sforza&Edward's para determinar las relaciones genéticas entre los aislamientos. El modelo de Cavalli-Sforza&Edward's está basado en el modelo de mutación paso a paso (*Stepwise Mutation Model*) en el que la adición o deleción de unidades de repetición en un microsatélite ocurre una a una, por ejemplo , un alelo de 10 repeticiones pudo haberse formado por deleción de un alelo con 11 repeticiones o por adición en un alelo con 9 repeticiones. A partir de los Dc calculados se realizó el siguiente dendrograma.

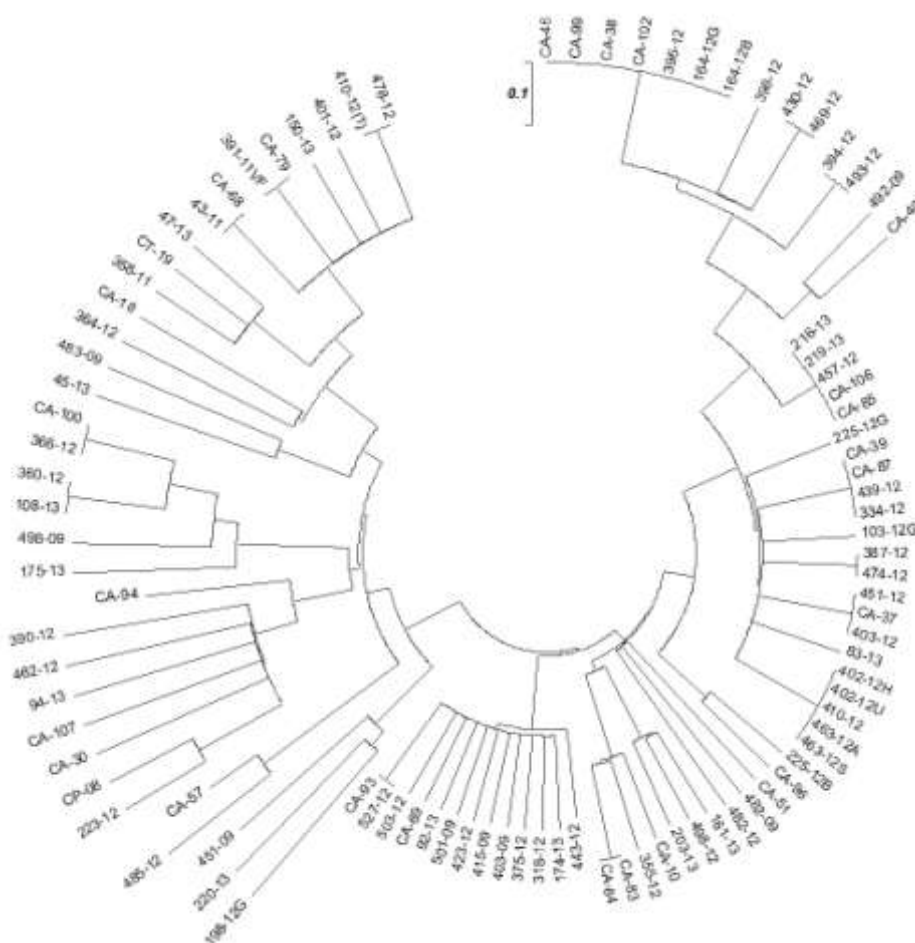


Figura 38. Dendrograma circular que muestra la relación entre los aislamientos clínicos de *Candida albicans* de acuerdo a la distancia genética calculada por la genotipificación de los microsatélites CAI, CAIII y CAVI.

En este dendrograma, los aislamientos con un mismo genotipo se agrupan en una misma rama, por ejemplo los aislamientos CA-83 y CA-84 que comparten el mismo genotipo (2834 0405 2644). Los aislamientos que tiene genotipos similares (que varían

en 1 o 2 alelos) agrupan en diferentes ramas, pero unidas por un mismo nodo, como los aislamientos CA-57 (2933 0404 0505) y 485-12 (2933 0404 0515). A partir de este árbol es fácil observar que algunos aislamientos comparten genotipos y puede tratarse de la cepa individual presente en diferentes individuos (**Figura 38**).

Analizando los datos de los aislamientos que presentan genotipos iguales o que varían en un alelo se observó lo siguiente:

1. Los aislamientos provenientes de un mismo paciente tienen genotipos iguales o varían en un solo alelo de un microsatélite.

Tabla 14. Características clínicas de aislamientos del mismo paciente con el mismo genotipo.

Aislamiento	Paciente	Diagnóstico	Muestra	#muestra	Fecha	Genotipo
164-12B	60	Ascitis / Insuficiencia hepática/ Candidosis en vías urinarias	Orina	1	19/04/2012	3745 0508 0505
164-12G			Orina	2	26/04/2012	374505080505
394-12	5	Lupus Eritematoso Sistémica / Candidosis en vías respiratorias	Espuito	1	20/08/2012	3845 0508 0505
493-12			Espuito	2	26/09/2012	3845 0508 0505
216-13	19	Sepsis / Candidosis en vías urinarias	Orina	1	09/05/2013	3845 0405 0505
219-13			Orina	2	10/05/2013	3845 0405 0505
402-12h	70	Candidemia / Prematurez	Sangre	1	27/08/2012	2831 0405 0505
402-12u			Orina	1	27/08/2012	2831 0405 0505
410-12			Sangre	2	29/08/2012	2831 0405 0505
463-12A	112	Candidosis cutánea	Piel axila		19/09/2012	2831 0405 0505
463-12S			Piel pliegue submamario		19/09/2012	2831 0405 0505
CA-10	78	Leucemia Linfocítica Aguda / Candidosis oral	Cavidad oral	1	01/09/2011	2834 0405 2626
CA-83			Cavidad oral	2	02/09/2011	2834 0405 2644
CA-84			Cavidad oral	3	03/09/2011	2834 0405 2644

Estos aislamientos nos permiten observar que la misma cepa de *C. albicans* es la que permanece durante la infección y que solo en el caso del aislamiento CA-10, se observó una microevolución, reflejada en el cambio en un alelo de CAVI de los aislados CA-83 y CA84.

2. Ocho aislamientos provenientes de diferentes pacientes tuvieron genotipos iguales (**Tabla 8**). En el caso de los aislamientos 360-12 y 366-12 presentaron el mismo genotipo a excepción de un alelo en CAVI, pero dado que provienen de pacientes que estuvieron internados en el mismo piso

durante Agosto 2012 se consideró que los aislamientos podrían estar relacionados.

Tabla 15. Características clínicas de aislamientos de diferentes pacientes con genotipos iguales o similares.

Aislamiento	Muestra	#muestra	Servicio	Fecha	Paciente	Sexo	Genotipo
430-12	Raspado de uña	1	Dermatología	Sep2012	88	F	4045 0508 0505
469-12	Orina	1	UCI	Sep2012	63	M	4045 0508 0505
403-12	Espuito	1	UCI	Ago 2012	126	F	2332 0405 0505
451-12	Espuito	1	UCI	Sep 2012	76	M	2332 0405 0505
527-12	Espuito	1	Neurología	Oct 2012	89	M	2835 0405 0202
CA-93	Espuito	1	UCI	Mar 2012	2	M	2835 0405 0202
360-12	Espuito	1	Reumatología	Ago 2012	59	F	3338 0708 0609
366-12	Orina	1	Medicina Interna	Ago 2012	152	M	3338 07080606
391-11	Espuito	1	Neumología	Nov 2011	83	F	3939 0510 0808
CA-79	Sangre	1	Infectología	Nov 2011	144	M	3939 0510 0808

Aunque estos aislamientos tuvieron genotipos idénticos, solo se pudo establecer relación entre 4 de ellos:

- Los aislamientos 403-12 y 451-12 provienen de diferentes pacientes que compartieron su estancia en Agosto y Septiembre de 2012 en UCI
- Los aislamientos 391-11 y CA-79 que provienen de diferentes pacientes que compartieron el 2° piso del HJM en diferentes servicios durante Noviembre de 2011

Finalmente, se trazó otro dendrograma con la información de las distancias genéticas de los 95 aislados de *C. albicans* pero en forma radial (**Figura 39**).

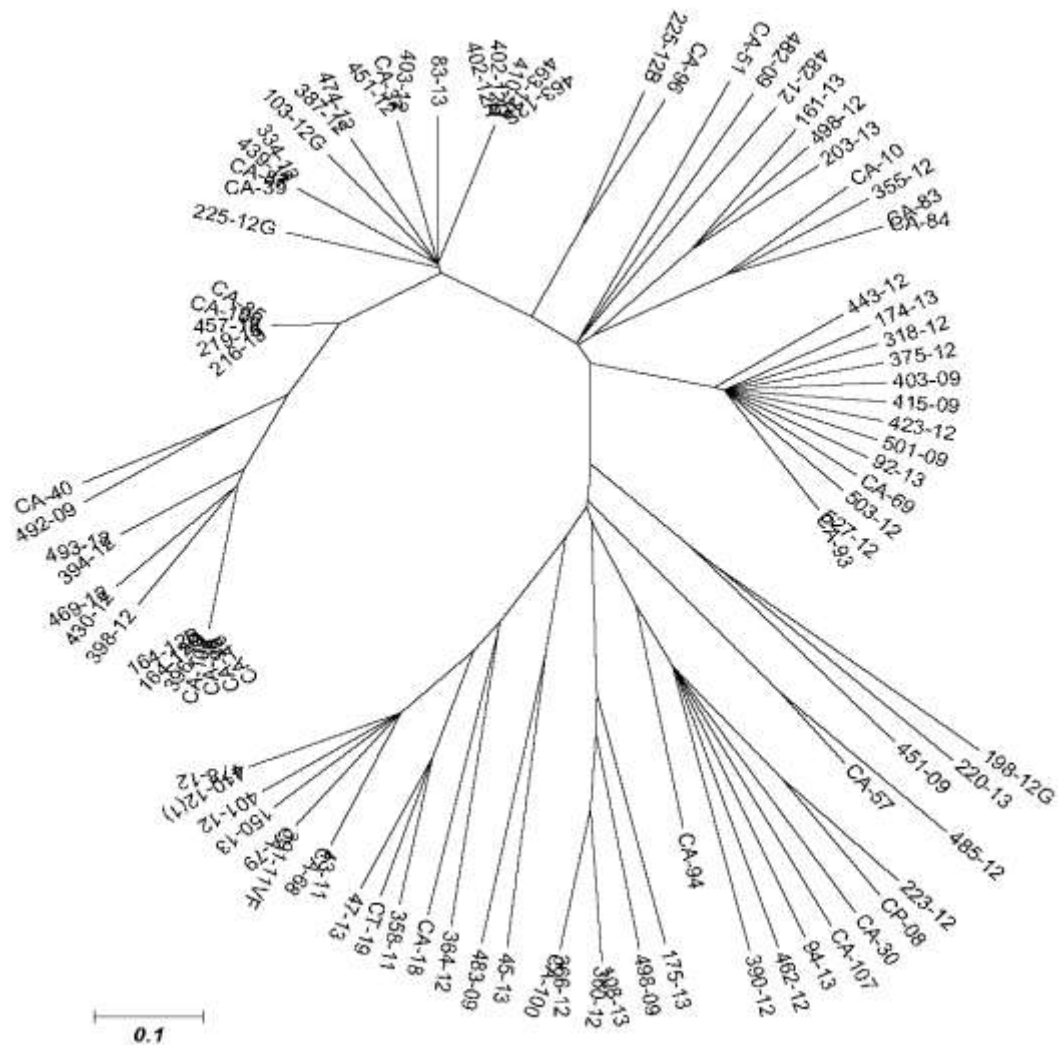


Figura 39. Dendrograma radial que muestra la relación entre los aislamientos clínicos de *Candida albicans* de acuerdo a la distancia genética calculada por la genotipificación de los microsatélites CAI, CAIII y CAVI.

Se pueden observar algunos grupos de aislamientos.

En esta representación del dendrograma, podemos observar la formación de diferentes grupos de aislamientos con genotipos similares en la población estudiada. Para determinar el número más probable de grupos que se formarían a partir de la información de los 3 microsatélites y su homogeneidad, se utilizó el programa Structure, el cual determinó la presencia de 6 grupos (**Figura 40**).

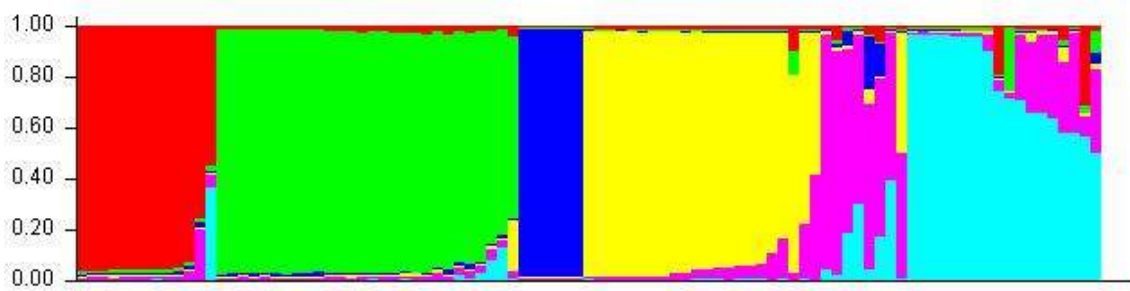


Figura 40. Estructura de la población de aislamientos de *C. albicans* estimada con Structure. Cada individuo está representado por una línea vertical, que está dividida en K segmentos de colores que representan la pertenencia estimada del aislamiento al grupo K. En nuestra población K=6.

A los grupos formados en Structure se les asignó los siguiente números: rojo: grupo I, verde: grupo II, azul, grupo III, amarillo: grupo IV, rosa: grupo V y cian: grupo VI. El dendrograma se completó de la siguiente manera (**Figura 41**).

A partir de la gráfica obtenida con Structure se observó que los grupos I, II, III y IV tienen similitud en sus características genotípicas. Los aislamientos del grupo I comparten los alelos 23, 29, 28, 31, 32, y 33 del *locus* CAI, algo lógico debido al modelo utilizado para calcular las distancias genéticas entre los aislamientos. Algo similar ocurre con el grupo II, donde comparten los alelos 35, 37, 38,39, 40, 45 y 46. Los grupos I y II aparecen cercanos en el dendrograma porque algunos de sus miembros comparten los alelos 4 y 5 del *locus* CAIII y el 5 del *locus* CAVI.

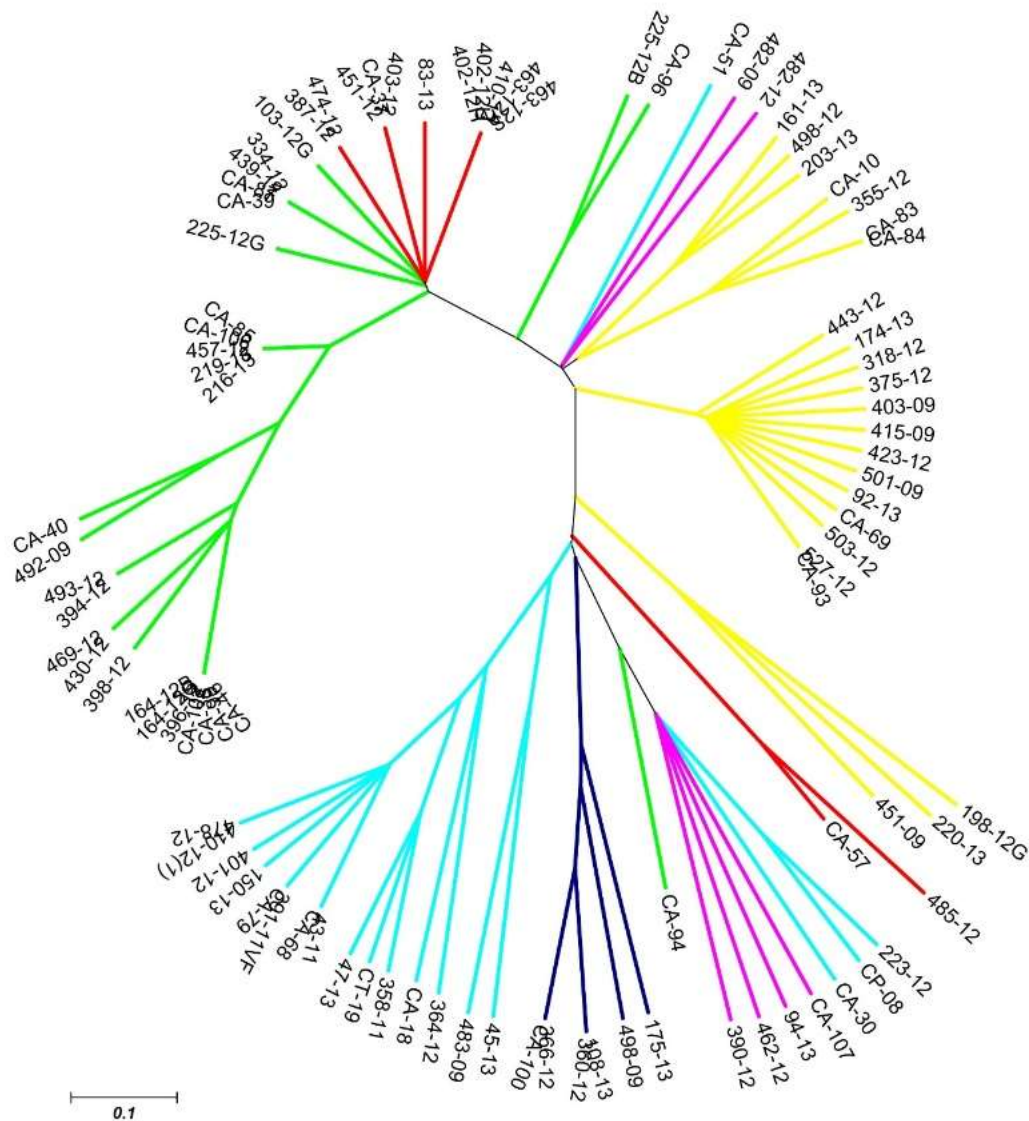


Figura 41. Dendrograma radial que muestra los grupos formados por genotipificación con los microsatélites CAI, CAIII y CAVI.

El color de las ramas de cada aislamiento representa al grupo que pertenece: Rojo: grupo I, verde: grupo II, azul, grupo III, amarillo: grupo IV, rosa: grupo V y cian: grupo VI.

El grupo III está formado por los aislados que comparten los alelos 33 y 38 del *locus* CAI y 7 y 8 del *locus* CAIII. El grupo IV comparten los alelos 28, 33, 34 y 35 del *locus* CAI. Respecto a los grupos V y VI, sus genotipos son diversos y comparten características con algunos grupos, por tal razón en el dendrograma se ubican entre los otros grupos.

Tabla 16. Aislamientos de *C. albicans* pertenecientes al grupo I

Aislamiento	A1	A2	A1	A2	A1	A2
402-12H	23	31	4	5	5	5
402-12U	23	31	4	5	5	5
403-12	23	32	4	5	5	5
410-12	23	31	4	5	5	5
451-09	28	35	5	5	2	16
451-12	23	32	4	5	5	5
463-12 ^a	23	31	4	5	5	5
463-12S	23	31	4	5	5	5
474-12	23	33	4	5	5	5
485-12	29	33	4	4	5	15
83-13	23	23	4	5	5	5
CA-37	23	32	4	5	5	5
CA-57	29	33	4	4	5	5

Tabla 17. Aislamientos de *C. albicans* pertenecientes al grupo II

Aislamiento	A1	A2	A1	A2	A1	A2
103-12G	35	45	4	5	5	5
164-12B	37	45	5	8	5	5
164-12G	37	45	5	8	5	5
216-13	38	45	4	5	5	5
219-13	38	45	4	5	5	5
225-12B	38	38	4	5	4	5
225-12G	38	38	4	5	5	5
334-12	37	46	4	5	5	5
394-12	38	45	5	8	5	5
398-12	39	45	5	8	5	5
430-12	40	45	5	8	5	5
439-12	37	46	4	5	5	5
469-12	40	45	5	8	5	5
492-09	38	45	8	8	5	5
493-12	38	45	5	8	5	5
CA-102	37	45	5	8	5	5
CA-106	38	45	4	5	5	5
CA-38	37	45	5	8	5	5
CA-39	37	46	4	5	5	5
CA-40	38	45	4	4	5	5
CA-46	37	45	5	8	5	5
CA-85	38	45	4	5	5	5
CA-87	37	46	4	5	5	5
CA-94	37	45	5	10	5	5
CA-96	38	45	4	5	4	5
CA-99	37	45	5	8	5	5

Relacionando las características clínicas de los aislamientos con los 6 grupos en los que se agruparon, no se observaron características atribuibles a un cierto grupo (sexo, edad, procedencia del paciente, servicio o fecha de estancia hospitalaria).

Tabla 18. Aislamientos de *C. albicans* pertenecientes al grupo III

Aislamiento	A1	A2	A1	A2	A1	A2
108-13	33	38	7	8	6	9
175-13	33	33	7	8	6	6
360-12	33	38	7	8	6	9
366-12	33	38	7	8	6	6
498-09	33	38	8	8	6	6
CA-100	33	38	7	8	6	6

Tabla 19. Aislamientos de *C. albicans* pertenecientes al grupo IV

Aislamiento	A1	A2	A1	A2	A1	A2
161-13	35	35	4	5	2	29
174-13	28	35	4	5	2	25
198-12G	33	33	5	5	8	14
203-13	35	35	4	5	2	35
220-13	35	35	5	5	2	5
318-12	28	35	4	5	32	32
355-12	28	34	4	5	36	38
375-12	28	35	4	5	2	34
403-09	28	35	4	5	2	23
415-09	28	35	4	5	21	21
423-12	28	35	4	5	2	36
443-12	28	35	4	5	2	35
451-09	28	35	5	5	2	16
498-12	35	35	4	5	26	26
501-09	28	35	4	5	36	36
503-12	28	35	4	5	2	33
527-12	28	35	4	5	2	2
92-13	28	35	4	5	47	58
CA-10	28	34	4	5	26	26
CA-69	28	35	4	5	2	37
CA-83	28	34	4	5	26	44
CA-84	28	34	4	5	26	44
CA-93	28	35	4	5	2	2

Tabla 20. Aislamientos de *C. albicans* pertenecientes al grupo V

Aislamiento	A1	A2	A1	A2	A1	A2
390-12	31	35	5	10	6	6
462-12	40	40	5	10	6	16
482-09	28	28	4	5	41	46
482-12	33	40	4	5	13	15
94-13	42	50	5	10	7	7
CA-107	36	43	5	10	19	19

Tabla21. Aislamientos de *C. albicans* pertenecientes al grupo VI

Aislamiento	A1	A2	A1	A2	A1	A2
150-13	52	52	5	10	8	8
223-12	41	56	5	10	8	19
358-11	45	45	10	10	8	8
364-12	34	59	5	10	8	8
391-11VF	40	51	5	10	8	8
401-12	32	32	5	10	8	8
410-12	23	31	4	5	5	5
410-12	39	56	5	10	8	8
43-11	39	39	5	10	8	8
45-13	40	47	10	10	8	13
47-13	39	39	10	10	8	8
478-12	39	56	5	10	8	8
CA-18	40	44	4	4	8	8
CA-30	39	43	5	10	8	11
CA-51	38	44	4	5	8	8
CA-68	39	39	5	10	8	8
CA-79	40	51	5	10	8	8
CP-08	42	56	5	10	8	19
CT-19	40	51	10	10	8	8

Discusión

Identificación de especies de *Candida*

Las infecciones por levaduras del género *Candida* son las micosis más comunes y aunque frecuentemente se presentan superficialmente, en pacientes hospitalizados (principalmente inmunocomprometidos) pueden causar infecciones profundas que comprometen la vida. El diagnóstico temprano y la identificación de los agentes causales son piezas fundamentales para el inicio de la terapia y obtener la mejoría del paciente.

Tradicionalmente se ha utilizado la morfología, pruebas bioquímicas y fisiológicas para la caracterización de los hongos patógenos más frecuentes (Mohandas, *et al*, 2011), pero estos métodos requieren del conocimiento de su morfología macroscópica y microscópica, contar con los sustratos necesarios para las pruebas, y/o tiempos prolongados de incubación (algunos métodos necesitan de hasta 72 horas) para obtener resultados satisfactorios. Métodos como la formación de tubo germinal y producción de clamidoconidios son muy útiles para la identificación de *C. albicans* (McCullough, *et al*, 1996), sin embargo existen pocos métodos específicos para la diferenciación de otras especies.

En este trabajo se muestra que los métodos fenotípicos utilizados en el laboratorio clínico permitieron la identificación correcta del 90% (202) de los aislamientos de *Candida*, sin embargo al 10% (22) se le asignó una especie equivocada. Este error puede deberse a que muchas veces las condiciones de las pruebas no se pudieron controlar de manera adecuada: edad y composición del medio de cultivo, temperatura de incubación y características propias del microorganismo (Hasenclever, 1971). Además un factor muy importante es la experiencia del observador.

Dentro de los parámetros del laboratorio clínico, la identificación de las especies más frecuentes (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*) es sencilla; la sensibilidad de pruebas como el tubo germinal, el uso de CHROMa y la tira API20 C

Yeast es entre 90.5% - 98.5% y su especificidad es cercana al 95%. Sin embargo, estos métodos fenotípicos son poco sensibles en la diferenciación de algunas especies muy cercanas filogenéticamente como es el caso de *C. albicans* y *C. dubliniensis*; o en especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* que presentan colonias de colores similares en medio CHROMa.

Las condiciones de los métodos fenotípicos y el problema de distinguir de forma acertada a las levaduras a nivel de especie dificultan la selección del tratamiento especie-específico y favorecen la posible diseminación del patógeno. Debido a esto, en la últimas dos décadas se hizo el esfuerzo por desarrollar métodos más sensibles y rápidos que permitieran la identificación correcta de los aislamientos (Latouche, *et al*, 1997).

La técnica de PCR-RFLP con *MspI* de la región ITS del rDNA es un método molecular rápido, exacto y reproducible para la identificación de hongos de interés médico que ha sido ampliamente utilizada y ha permitido obtener información certera sobre la epidemiología de especies de baja frecuencia.

Esta técnica nos permitió verificar la identidad de los aislamientos de *Candida* y confirmar la presencia de infecciones debidas a *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*; pero tiene la limitación de no poder identificar especies muy cercanas filogenéticamente como *C. albicans* y *C. dubliniensis*, o las especies del complejo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*). Para diferenciar estas especies se puede realizarla secuenciación y comparación de la región ITS del rDNA con las secuencias ya reportadas para aislamientos de estas especies que están presentes en las bases de datos en internet como *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o *Candida genome* (www.Candidagenome.org) (Asadzadeh, *et al*, 2009).

Utilizando los criterios fenotípicos que se han establecido como específicos para identificar a *C. dubliniensis* (formación de múltiples clamidoconidios en medios como el AHT80, el color de la colonia en CHROMa y el perfil de asimilación de carbohidratos de la tira API 20 C YEAST), se identificó como *C. dubliniensis* al aislamiento CA-30

proveniente de esputo. La verificación molecular de este se hizo mediante PCR-RFLP con *AvrII* y por PCR con los *primers* específicos DUB. Los resultados mostraron que este aislamiento no es *C. dubliniensis*, sino *C. albicans*. Podemos concluir que las características fenotípicas propuestas para *C. dubliniensis* no son suficientes para su diferenciación de *C. albicans* y es necesario hacer la identificación molecular.

Frecuencia de las especies de *Candida*

La epidemiología de la candidosis ha cambiado en los últimos años debido a diversos factores (aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, el uso de fármacos quimioterapéuticos, antibióticos de amplio espectro y el uso generalizado de dispositivos médicos) y aunque *C. albicans* es considerado aún el principal agente etiológico, la frecuencia de infecciones causadas por especies no-*albicans* están incrementándose (Aydin, *et al*, 2011, Bedini, *et al*, 2006).

Existen varios grupos en el mundo que periódicamente publican resultados sobre la vigilancia epidemiológica de la candidosis y en los últimos 20 años se ha observado el incremento de las especies no-*albicans* en diferentes regiones geográficas.

En Estados Unidos, Pfaller y Horn han reportado que el 54.4% de los casos de candidemia son causados por especies no-*albicans*, principalmente *C. glabrata* (26.0%) (Horn, *et al*, 2009, Pfaller, *et al*, 2011). En Alemania y Dinamarca también se ha observado una alta frecuencia de infecciones por *C. glabrata* (21.1% y 31.3%, respectivamente) (Rodloff, *et al*, 2011). En España, el 50.9% de los casos de candidemia entre 2008 y 2009 fueron debido a especies no-*albicans*, siendo la especie más frecuente *C. parapsilosis* (20.7%). En India, Chander y colaboradores reportaron una predominancia de *C. tropicalis* sobre *C. albicans* como principal agente de la candidemia (40.8%) (Chander, *et al*, 2013), una situación similar se observó en China, donde *C. tropicalis* es el segundo agente causal de infecciones sistémicas en sangre y fluidos estériles (18.06% y 25.72% respectivamente).

En varios países de América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Honduras y Venezuela), *C. albicans* es responsable del 37.6% mientras que *C. parapsilosis* (26.5%) y *C. tropicalis* (17.6%) son las principales especie no-*albicans*

causantes de candidemia (Nucci, *et al*, 2013). En Monterrey, González y colaboradores reportaron una mayor prevalencia de *C. parapsilosis* (37.9%) sobre *C. albicans* (31.9%)(González, *et al*, 2008). Salvo el estudio de González, no existen otros reportes sobre la epidemiología de la candidosis y la distribución de especies de *Candida* en México.

Los reportes publicados sobre la distribución de especies de *Candida* de las diferentes áreas geográficas tienen en común que los aislamientos provienen de cultivos de sangre. Las muestras analizadas en este estudio son heterogéneas debido a que el servicio recibe diferentes tipos de muestras y es escaso el número de aislamientos obtenidos a partir de sangre. La distribución de especies de *Candida* usando candidemia en el Hospital Juárez de México (Enero 2011 a Mayo 2013) difiere con lo reportado anteriormente en Monterrey o América Latina.

En este estudio los episodios de candidemia por *C. albicans* siguen siendo los más frecuentes (63.6%) seguida por *C. tropicalis* (18.2%), *C. parapsilosis* (9.1%) y *C. glabrata*(9.1%). Estos resultados no pueden compararse con los reportados en la literatura, debido a que se manejaron diferentes tipos de muestras. Sin embargo haciendo el análisis particular por el tipo de muestra, se observó que a partir de sangre, orina, raspados de cavidad oral, esputo y lavado broncoalveolar la principal especie fue *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*.

Genotipificación de *C. albicans*

Dado que las micosis causadas por *C. albicans* son las más frecuentes, la identificación correcta de cepas individuales es necesaria para ayudar en la prevención de infecciones nosocomiales y estudiar la biodiversidad de la población de este hongo. A través de los años han sido descritos diferentes métodos para la tipificación de cepas de *C. albicans*. Se propusieron métodos basados en la morfología, susceptibilidad antifúngica y tipificación enzimática; sin embargo carecen del suficiente DP (capacidad del método para diferenciar entre cepas individuales al azar) y varían dependiendo de

las condiciones utilizadas en cada laboratorio, lo que hizo su estandarización y reproducibilidad poco viable (Otero, *et al*, 1995).

Los métodos moleculares son utilizados para monitorear cepas involucradas en infecciones nosocomiales. Varios métodos permiten la tipificación de cepas de *C. albicans*, como el PCR-RFLP, PCR-RAPD y la cariotipificación por electroforesis. En este estudio utilizamos la genotipificación por microsatélites (*loci* CAI, CAIII y CAVI) ya que es un método que ha sido reconocido como uno de los tres métodos más poderosos para la tipificación de cepas individuales de *C. albicans* (con un DP=0.987); los otros dos métodos son *Southernblot* utilizando la sonda Ca3 (DP=0.993; Anderson, *et al*, 2008) y el análisis *multilocus* (DP=0.993).

El análisis con microsatélites es sencillo e incluso se puede verificar el genotipo de una cepa mediante el corrimiento electroforético y la comparación del tamaño de los fragmentos amplificados por PCR. En 2003, Sampaio, utilizó estos microsatélites para estudiar la prevalencia de diferentes genotipos en diferentes tipos de candidosis y observó la presencia en diferentes regiones corporales del mismo genotipo de *C. albicans* en el mismo paciente (Sampaio, *et al*, 2003). Al tipificar molecularmente 94 de nuestros aislamientos con estos microsatélites, se observó que 10 aislamientos de diferentes pacientes compartieron el mismo genotipo; en base a esto se sugiere la transmisión nosocomial. Aunque la historia clínica de los pacientes no nos permite hacer una relación directa que indique la vía de transmisión o un nicho de contagio, el uso de estos tres microsatélites indicó un alto poder de resolución (DP=0.9883 en este estudio) que garantiza su utilidad para diferenciar cepas y verificar la transmisión.

Además, este método permitió analizar la población de *C. albicans* aisladas en pacientes del Hospital Juárez de México y determinar sus distancias genéticas. La distancia genética es una medida matemática de la divergencia entre individuos y permite identificar si los individuos están relacionados entre sí y si poseen un ancestro común. Genotipos iguales o similares tienen una distancia pequeña, mientras que genotipos completamente diferentes tienen distancias grandes. Las distancias calculadas fueron procesadas con MEGA 5.2 y, en función de estas, el programa permitió representar los aislamientos en un dendrograma en el que observamos la

formación de diferentes grupos que comparten genotipos. Utilizando Structure (programa de inferencia Bayesiana) se determinó la formación de 6 grupos de aislamientos de *C. albicans*, sin embargo, analizando las características de los aislamientos no se encontraron características que compartieran los miembros de cada grupo.

Soll y otros autores han realizado estudios similares a partir de la genotipificación de *C. albicans* y han agrupado diversos aislamientos en grupos o clados utilizando la información de las sondas Ca3, el análisis *multilocus* y los microsatélites CAI y CEF3. A partir de estos, se ha observado que ciertos grupos de *C. albicans* guardan características específicas y están geográficamente relacionadas con el lugar de su aislamiento (McMannus, *et al*, 2014). Un ejemplo es la formación de 5 grupos utilizando la sonda Ca3 (I, II, III, SA y E). Se observó que los grupos I, II y III están ampliamente distribuidas en el mundo, el grupo I presenta resistencia intrínseca a la 5-fluorocitocina, el grupo SA está presente en la población de Sudáfrica y el grupo E es un grupo heterogéneo de cepas de *C. albicans* presente en Europa. A partir de estos datos se han formado bases de datos que ha permitido que esta información esté disponible para comparar la epidemiología de los diferentes grupos de *C. albicans* en diferentes países.

Chávez-Galarza comparó cepas de los grupos identificados con Ca3 utilizando los microsatélites CAI y CEF3 y observó resultados similares (Chávez-Galarza, *et al*, 2010). Nuestros aislados no pudieron ser incluidos en estas bases de datos ni correlacionarse con los grupos ya establecidos ya que no se realizó el análisis con el microsatélite CEF3 y no se pudo comparar la información con la obtenida por Chávez-Galarza, además de que aún no existe aún una base de datos de genotipos microsatélites como CAI, CEF3, CAIII y CAVI. Futuros estudios se pueden realizar para genotipificar aislamientos mexicanos de *C. albicans* y observar si las características de los aislados mexicanos se agrupan en un grupo ya descrito o si forman uno nuevo de características definidas.

Conclusiones

- Los métodos de identificación fenotípica identificaron 90% (202) de los aislamientos de *Candida* de manera correcta mientras que el 10% (22) solo pudo ser identificado por PCR-RFLP con *MspI*.
- La PCR-RFLP con *AvrII* y la amplificación con el primer DUB se diferenciaron 155 aislamientos identificados como *C. albicans*/*C. dubliniensis* comprobándose la ausencia de *C. dubliniensis* en los aislamientos analizados.
- El principal agente de la candidosis en pacientes del Hospital Juárez de México fue *C. albicans* causando el 70.0% de esta micosis, mientras que las especies no-*albicans* representaron el 30.0%.
- Las especies no-*albicans* fueron *C. tropicalis* (16.4%), *C. glabrata* (5.5%), *C. parapsilosis*(5.9%), *C. lusitaniae*(1.4%) y *C. krusei*(0.5%), *C. guilliermondii*(0.5%).
- Las candidosis por *C. albicans* aumentaron de 2011 (57.5%) a 2013 (86.6%).
- La genotipificación con los microsatélites CAI, CAIII y CAVI permitió identificar transmisión nosocomial en 10 aislamientos.
- A través de la genotipificación con los microsatélites se identificaron 6 grupos diferentes de *C. albicans*.

Referencias

1. Agarwal, S., Machanda, V., Verma, N., Bhalla, P. ***Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance.*** Indian Journal of Medical Microbiology 2011; 29 (2): 172 -177
2. Alangaden, G. J. ***Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention.*** Infectious Disease Clinics of North America 2011; 25: 201-225
3. Amouri, I., Sellami, H., Abbes, S., Hadrich, I., Mahfoudh, N., Makni, H., Ayadi, A. ***Microsatellite analysis of Candida isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis.*** Journal of Medical Microbiology 2012; 61: 1091-1096.
4. Anderson, J., Srikantha, T., Morrow, B., Miyasaki, S., White, T. C., Agabian, W. N., Schmid, J., Soll, D. R. ***Characterization and Partial Nucleotide Sequence of the DNA Fingerprinting Probe Ca3 of Candida albicans.*** Journal of Clinical Microbiology 1993; 31 (6): 1472-1480
5. Arenas, R. ***Micología Médica Ilustrada.*** Mc Graw Hill Interamericana 2008. 3ª Edición. México, D. F. pp: 219
6. Asadzadeh, M., Ahmad, S., Al-Swein, N., Khan, Z. U. ***Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among Candida parapsilosis and Candida orthopsilosis strains isolated from clinical specimens in Kuwait.*** Journal of Medical Microbiology 2009; 58 (6): 745-752
7. Aydin, F., Bayramoglu G., Cebeci, N., Kaklikkaya, N., Tosun, I. ***Bloodstream yeast infections in a university hospital in Northeast Turkey: a 4-year survey.*** Medical Mycology 2011; 49: 316-319
8. Bedini, A., Venturelli, C., Mussina, C., Guaraldi, G., Codeluppi, M., et al. ***Epidemiology of Candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital.*** Clinical Microbiology and Infection 2006; 12 (1): 75-80
9. Behzadi, P., Behzadi, E., Yazdanbod, H., Aghapour, R., Akbari-Cheshmeh, M., Salehian-Omran, D. ***Urinary Tract Infections Associated with Candida albicans.*** Maedica, A Journal of Clinical Medicine 2010; 5 (4): 277-279
10. Bonifaz, A. ***Micología Médica*** Básica. 3ª Edición. Mc Graw Hill, México 2011.
11. Bognoux, M. E., Diogo, D., François, N., Veirmeire, S., Colombel, J. F., Bouchier, C., et al. ***Multilocus Sequence Typing Reveals Intrafamilial Transmission and Microevolution of Candida albicans Isolates from human Digestive Tract.*** Journal of Clinical Microbiology 2006; 44 (5): 1810-1820.

12. Bowman, S. M., Free, S. J. ***The structure and synthesis of the fungal cell wall.*** BioEssays 2006; 28: 799-808
13. Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C. ***Rook's Textbook of Dermatology,*** Volume I. 8a Edición. Blackwell Publishing 2010. Pp. 56-69
14. Campanha, N. H., Neppelenbroek, K. H., Spolidorio, D. M. P., Spolidorio, L. C., Pavarina, A. C. ***Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between C. albicans and C. dubliniensis.*** Oral Diseases 2005; 11: 392-398
15. Cendejas-Bueno, E., Gomez-Lopez, A., Mellado, A., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. ***Identification of Pathogenic Rare Yeast Species in Clinical Samples: Comparison between Phenotypical and Molecular Methods.*** Journal of Clinical Microbiology 2010; 48 (5): 1895-1899
16. Chander, J., Singla, N., Kaur-Sidhu, S., Gombar, S. ***Epidemiology of Candida blood stream infections: experience of a tertiary care centre in North India.*** Journal of Infections in DevCtries. 2013; 7 (9): 670-675
17. Chávez-Galarza, J., Pais, C., Sampaio, P. ***Microsatellite typing identifies the major clades of the human pathogen Candida albicans.*** Infection, Genetics and Evolution 2010; 10: 697-702
18. Coronado-Castellote, L., Jiménez-Soriano, Y. ***Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis.*** Journal of Clinical Exp Dent. 2013; 5 (5): 279-286
19. Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., Pfaller, M. ***The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades.*** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2012; 73: 45-48
20. Diezmann, S., Cox, C. J., Schönian, G., Vilgays, R. J., Mitchell, T. G. ***Phylogeny and Evolution of Medical Species of Candida and Related Taxa: a Multigenic Analysis.*** Journal of Clinical Microbiology 2004; 42 (12):5624-5635
21. Dismukes, W. E., Pappas, P. E., Sobel, J. D. ***Clinical Mycology.*** Oxford University Press 2003. Nueva York, Estados Unidos de Améric pp. 143-175
22. Dotis, J., Prasad, P., Zaoutis, T., Roilides, E. ***Epidemiology, Risk Factors and Outcome of Candida parapsilosis Bloodstream Infection in Children.*** Pediatric Infectious Diseases 2012; 31 (6): 557-560
23. Eggiman, P., Garbino, J., Pittet, D. ***Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients.*** The Lancet Infectious Diseases 2003; 3: 685-702

24. Falagas, M.E., Apostolou, K.E., Pappas, V.D. **Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2006; 25(7): 419–25.
25. Fernández-Martínez, R. F., Hernández-Pérez, F., Fabían-San Miguel, G., Jaimes-Aveldañez, A., Arenas, R. **Oral Candida spp. carriers: its prevalence in patients with type 2 Diabetes Mellitus.** An Bras Dermatology 2013; 88 (2): 222-225
26. Fich, F., Abarzúa-Araya, A., Pérez, M., Nahm, Y., León. **Candida parapsilosis and Candida guilliermondii: Emerging Pathogens in Nail Candidiasis.** Indian Journal of Dermatology 2014; 59 (1): 24-29
27. Fundyga, R. E., Lott, T. J., Arnold, J. **Population structure of Candida albicans, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci.** Infection, Genetics and Evolution 2002; 2: 57-68
28. Ghannoum, M. A., Radwan, S. S. **Candida Adherence to Epithelial Cells.** CRC Press. 1a Edición. Estados Unidos de América, 1990. pp: 130-132
29. González, G. M., Elizondo, M., Ayala, J. **Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of Candida Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study.** Journal of Clinical Microbiology 2008; 46 (9): 2902-2905
30. Gutiérrez, J., Morales, P., González, M. A., Quindós, G. **Candida dubliniensis, a new fungal pathogen.** Journal of Basic Microbiology 2002; 42 (3): 207-227
31. Hachem, R., Hanna, H., Kontoyiannis, D. **The changing epidemiology of invasive candidiasis: Candida glabrata and Candida krusei as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy.** Cancer 2008; 112 (11):2493–2499.
32. Hasenclever, H. F. **The consistent formation of chlamydospores by Candida tropicalis.** Sabouraudia 1971; 9 (2): 164-166
33. Helbig, S., Achkar, J. M., Jain, N., Wang, X., Gialanella, P., Levi, M., Fries, B. C. **Diagnosis and Inflammatory Response of Patients with Candiduria.** Mycoses 2013; 56 (1): 61-69
34. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., et al. **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi.** Mycological Research 2007; III: 509-547
35. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., et al. **NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007.** Infection Control and Hospital Epidemiology 2008; 29(11): 996–1011.

36. Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., *et al.* ***Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry.*** *Clinical Infectious Diseases* 2009; 48: 1695-1703
37. Jabra-Rizk, M A., Falkler, W. A., Meiller, T. F. ***Fungal Biofilms and Drug Resistance.*** *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10 (1): 14-19
38. Kamikawa, Y., Mori, Y., Nagayma T., Fujisaki, J., Hirabayashi, D., Sakamoto, R., Hamada, T., Sugihara, K. ***Frequency of Clinically isolated strains of oral Candida species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2007-2007 and 2013-2013.*** *BMC Oral Health* 2014; 14: 1-9
39. Khan, Z., Ahmad, S., Chandy, R., *et al.* ***A simple xylose-based agar medium for the differentiation of Candida dubliniensis and Candida albicans.*** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2012; 72: 285-287
40. Khan, Z., Ahmand, S., Mokaddas, E., Chandy, R. ***Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating Candida dubliniensis from Candida albicans.*** *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (10): 4796-4798
41. Khlif, M., Sellami, H., Makni, F., Ayadi, A. ***Candida dubliniensis: méthodes d'identification et implications épidémiologiques.*** *Pathologie Biologie* 2011; 59: 166-172
42. Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Ghannoum, M. A. ***Comparison of Biofilms Formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on Bioprosthetic Surfaces.*** *Infection and Immunity* 2002; 70 (2): 878-888
43. Larone, D. H. ***Medically Important Fungi. A Guide to Identification.*** 2a Edición. American Society for Microbiology. Nueva York 1993: pp. 67
44. Latouche, G. N., Daniel, H. M., Lee, O. C., Mitchell, T. G., Sorrel, T. C., Meyer, W. ***Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus Candida and related teleomorph yeast species.*** *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35 (12): 3171-3180
45. Levy, I., Rubin, L. G., Vasishtha, S. ***Emergence of Candida parapsilosis as the predominant species causing candidemia in children.*** *Clin Infect Dis* 1998; 26(5):1086–1088
46. Li, F., Wu, L., Cao, B., Zhang, Y., Li, X., Liu, Y. ***Surveillance of the prevalence, antibiotic susceptibility, and genotypic characterization of invasive candidiasis in a teaching hospital in China between 2006 to 2011.*** *BMC Infectious Disease* 2013; 13: 353

47. McCullough, M. J., Ross, B. C., Reade, P. C. ***Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence, attributes, and methods of strain differentiation***. International Journal of Oral Maxillofacial Surgery 1996; 25: 136-144
48. McManus, B. A., Coleman, D. C. ***Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Candida albicans***. Infection, genetics and Evolution 2014; 21:166-178
49. Merenstein, D., Hu, H., Wang, C., Hamilton, P., Blackmon, M., Chen, H., Calderone, R., Li, D. ***Colonization by Candida Species of the Oral and Vaginal Mucosa in HIV-infected and Noninfected Women***. AIDS Research and Human Retroviruses. 2013; 25 (1): 30-34
50. Min, D., Kyu, M., Yim, G. ***Onychomycosis in Children: An Experience of 59 Cases***. Annals of Dermatology 2013; 25 (3): 327-334
51. Mirhendi, H., Makimura, K., Mohamadreza, K., et al. ***A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important Candida Species***. Japanese Journal of Medical Mycology 2006; 47: 225-229
52. Mohandas, V., Ballal, M. ***Distribution of Candida Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India***. J Glob Infect Dis. 2011; 3(1): 4–8.
53. Mosaid, A., Sullivan, D., Salkin, I., Shanley, D., Coleman, D. C. ***Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar***. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39 (1): 323-327
54. Noble, W.C. ***Microbiology of Human Skin***. 2a Edición. Lloyd-Luke, Londres 1980: pp. 263–290.
55. Nucci, M., Quieroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, N., Cortes, J., Zurita, J., et al. ***Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey***. PLoS One 2013; 8 (3): 1-7
56. Otero, L., Vázquez, F., Palacio, V., Vázquez, S., Carreño, F., Méndez, F. J. ***Comparison of seven phenotyping methods for Candida albicans***. European Journal of Epidemiology 1995; 11: 221-224
57. Pasligh, J., Radecke, C., Fleischhacker, M., Ruhnke, M. ***Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of Candida dubliniensis***. Journal of Microbiology, Immunology and Infection; 43 (2): 147-154
58. Pfaller, M. A., Diekema, D.J. ***Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem***. Clinical Microbiology Reviews 2007; 20(1): 133–63
59. Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., Castanheira, M. ***Candida Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal***

- Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008 -2009.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011; 55 (2): 561-566
- 60.Rodloff, A. C., Koch, D., Schaumann, R. **Epidemiology and Antifungal Resistance in Invasive Candidiasis.** European Journal of Medical Research 2011; 16:187-195
- 61.Sabel, J. D., Fisher, J. F., Kauffman, C. A., Newman, C. A. **Candida Urinary Tract Infections-Epidemiology.** Clinical Infectious Diseases 2011; 52: 433-436
- 62.Sampaio, P., Gusmão, L., Alves., C., et al. **Highly Polymorphic Microsatellite for Identification of Candida albicans strains.** Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(2): 552-557
- 63.Sampaio, P., Gusmão, L., Correia., A., et al. **New Microsatellite Multiplex PCR for Candida albicans Strain Typing Reveals Microevolutionary Changes.** Journal of Clinical Microbiology 2005; 43(8): 3869-3876
- 64.Sardi, J., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A., Mendez-Giannini, J.S. **Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.** Journal of Medical Microbiology 2013; 62_10-24
- 65.Shokohi, T., Hashemi-Soteh, M., Saltanat-Pouri, Z., Hedayati M., Mayahi, S. **Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran.** Indian Journal of Medical Microbiology 2010; 28 (2): 147-151
- 66.Silva-Rocha, W. P., Brito, V. L., Estivalet, T. I., Pipolo, E., Maranhão, G. **Candida species distribution, genotyping and virulence factors of Candida albicans isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil.** BMC Oral Health 2014; 14: 20
- 67.Skinner, C., E., Fletcher, D. W. **A Review of The Genus Candida.** Bacteriology Reviews 1960; 24(4): 397-416
- 68.Soll, D. R. **High-Frequency Switching in Candida albicans.** Clinical Microbiology Reviews 1992; 5 (2): 183-203
- 69.Sullivan, D. J., Moran, G. P., Coleman, D. C. **Candida dubliniensis: Ten years on.** FEMS Microbiology Letters 2005; 253: 9-17
- 70.Takezaki, N., Nei, M. **Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees from Microsatellite DNA.** Genetics 1996; 144: 389-399
- 71.Tortorano, M. A., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Grillot, R. **Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance.** International Journal of Antimicrobial Agents 2006; 27: 359-366

72. Vargas, K., Messer, S. A., Pfaller, M., Lockhart, S. R., Stapleton, J. T., Hellstein, J., Soll, D. R. ***Elevated Phenotypic Switching and Drug Resistance of Candida albicans from Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals prior to First Thrush Episode.*** Journal of Clinical Microbiology 2000; 38 (10): 3595-3607
73. Webster, J., Webster, R. ***Introduction to Fungi.*** 3a Edición. Cambridge University Press 2007. Cambridge, Reino Unido. pp. 5-7, 276-281
74. Wilson, L.S., Reyes, C.M., Stolpman, M, *et al.* ***The direct cost and incidence of systemic fungal infections.*** Value Health 2002; 5(1): 26–34
75. Xafranski, H., Melo, A., Machado, A., Briones, M., Colombo, A. ***A quick and low-cost PCR-based assay for Candida spp. Identification in positive blood culture bottles.*** BMC Infectious Diseases 2013; 13: 467.
76. Xu, J., Mitchell, T. ***Geographical Differences in Human Oral Yeast Flora.*** Clinical Infectious Diseases 2003; 36: 221-224
77. Yapar, N. ***Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis.*** Therapeutics and Clinical Risk Management 2014; 10: 95-105
78. Yismaw, G., Asrat, D., Woldenamanuel, Y., Unakal, C. ***Prevalence of Candiduria in Diabetic Patients Attending Gondar University Hospital, Gondar, Ethiopia.*** Iranian Journal of Kidney Disease 2013; 7 (2): 102-107
79. Strachan, T., Read, A. P. ***Human Molecular Genetics.*** 4a Edición. Garland Science/Taylor & Francis Group. Estados Unidos, 2011.
80. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. ***Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.*** Pp. 315-322. En: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis. Estados Unidos 1990.
81. McDonald, D.B., W.K. Potts. ***Microsatellite DNA as a genetic marker at several scales. Avian Molecular Evolution and Systematics.*** Academic Press. Estados Unidos de América 1997. pp: 29-49.

Anexo I. Medios de cultivo y soluciones utilizadas

Medios de cultivo

Agar Dextrosa de Saboraud (Becton Dickinson)

Fórmula por litro:

Dextrosa	40 g
Peptona de caseína	5.0 g
Peptona animal	5.0 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.b.p.
pH = 5.6 ± 0.2	

Se disuelven todos los ingredientes en agua y se calienta a ebullición durante un minuto para la completa disolución del agar. Se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 115° C a 15 psi. Se deja enfriar a 50° C y se vacía en caja de Petri.

Agar Mycosel™ (Becton Dickinson)

Fórmula por litro:

Dextrosa	10 g
Harina de soja digerida por	
Enzimas papáicas	10 g
Cicloheximida	0.4 g
Cloramfenicol	0.05 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.b.p.
pH = 6.8 ± 0.2	

Se disuelven todos los ingredientes en agua y se calienta a ebullición durante un minuto para la completa disolución del agar. Se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 115° C a 15 psi. Se deja enfriar a 50° C y se vacía en caja de Petri.

Agar BiGGY-Nickerson (Becton Dickinson)

Fórmula por litro:

Dextrosa	10 g
Extracto de levadura	1.0 g
Glicina	10 g
Citrato de bismuto amoniacal	5.0 g
Sulfito de sodio	3.0 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agar	20 g
Agua destilada	c.b.p.

Se disuelven todos los ingredientes en agua y se calienta a ebullición durante un minuto para la completa disolución del agar. Se deja enfriar a 50° C y se vacía en caja de Petri.

Agar Corn Meal (Becton Dickinson) + Tween 80

Fórmula por litro:

Harína de Maíz	
infusión (sólidos)	2.0 g
Agar	15 g
Tween 80 (Polisorbato 80)	10 mL
Agua destilada	c.b.p.

Se disuelven todos los ingredientes en agua y se calienta a ebullición durante un minuto para la completa disolución del agar. Se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 115° C a 15 psi. Se deja enfriar a 50° C y se vacían 20 mL en caja de Petri.

Agar YEPD

Fórmula por litro:

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.b.p.

Se disuelven todos los ingredientes en agua y se calienta a ebullición durante un minuto para la completa disolución del agar. Se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 115° C a 15 psi. Se deja enfriar a 50° C y se vacían 20 mL en caja de Petri.

Soluciones para PCR

Buffer de reacción (Fermentas, Life Technologies):

Tris-HCl 100 mM
KCl 500 mM
Nonident P40 0.1 % (v/v)
pH=8.8 a 25° C.

Solución de trabajo de MgCl₂ 30 mM (Fermentas, Life Technologies)

Solución de trabajo de dNTP's (Fermentas, Life Technologies):

ATP 2 mM
TTP 2 mM
CTP 2 mM
GTP 2 mM

Taq polimerasa (Fermentas, Life Technologies). 100 U en 100 µL de disolvente (Tris-HCl 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 100 mM, Nonident P40 0.5 % (v/v), Tween 20 0.5 % (v/v) y glicerol 50 % (v/v).

Soluciones para Electroforesis

Buffer TAE 10x

Fórmula por litro:

Tris base	48.4 g
EDTA disódico	3.7 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
Agua bidestilada	c.b.p.
pH = 8.0	

Disolver en 250 mL de agua bidestilada el Tris base y el EDTA disódico. Agregar el ácido acético glacial y completar con agua destilada a un volumen de 1.0 L.

Buffer TAE 1x

Diluir un volumen de buffer TAE 10x en 9 volúmenes de agua bidestilada.

Gel de agarosa al n%

Agarosa para biología molecular	n g
Solución de bromuro de etidio 10 µg/mL	5.0 µL
Agua bidestilada	c.b.p. 100 mL

Agregar la agarosa a 50 mL de agua bidestilada, añadir los 5.0 µL de la solución de bromuro de etidio y llevar a un volumen final de 100 mL. Calentar hasta que la agarosa se disuelva por completo. Vaciar sobre la cámara de electroforesis un volumen aproximado de 20 mL y permitir que solidifique.