



BIBLIOTECAS UNACH
FAC. MEDICINA HUMANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
CAMPUS II
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO-MOLECULAR DE LA
PREVALENCIA DE *CANDIDA SPP.*, EN MUJERES DE LA
CIUDAD DE TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.**

Tesis que presenta:

Sarain Monjaraz Rodríguez.

Para obtener el Grado de
**Maestría en Ciencias en Salud Ambiental y
Enfermedades Transmisibles.**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

2009



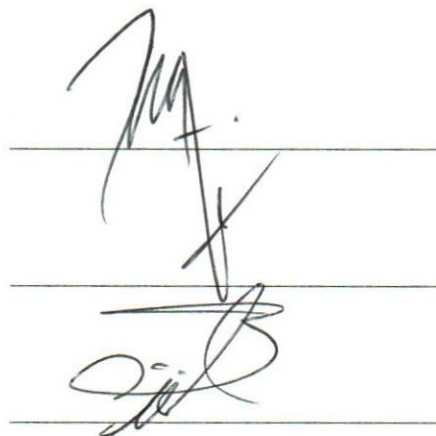
El comité revisor del Estudio epidemiológico-molecular de la prevalencia de *Candida spp.*, en mujeres de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, aprobó la presente tesis en el mes de Febrero del año 2009.

Comité revisor

Dra. Peggy Elizabeth Alvarez Gutiérrez Directora

Dr. Víctor Manuel Vega Villa Asesor

Dr. Sergio Saldaña Trinidad Asesor

Three handwritten signatures are positioned to the right of the committee members' names. The first signature, corresponding to the Director, is a stylized 'P' with a long vertical stroke. The second signature, for the first advisor, is a more complex, cursive script. The third signature, for the second advisor, is a cursive signature that appears to start with 'S'.

“Para mi esposa, con quien comparto cada éxito en la vida y a mis dos angelitos, Diego y Damián, que han iluminado mi vida.”

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Salud "Tuxtla" de esta ciudad, bajo la dirección de la Dra. Peggy E. Alvarez Gutiérrez y la asesoría de los Dres. Víctor M. Vega Villa y Sergio Saldaña Trinidad. Las pruebas bioquímicas y ensayos microbiológicos fueron realizados en el laboratorio de la institución antes citada. En la Universidad Politécnica de Chiapas se prepararon los materiales utilizados y se realizaron pruebas taxonómicas. En el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., Unidad Zacatenco, se estableció la prueba piloto de las técnicas moleculares, bajo la asesoría de la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, para ponerlas en práctica en el laboratorio de Recursos Fitogenéticos de la Facultad de Agronomía, Campus IV de la Universidad Autónoma de Chiapas.

AGRADECIMIENTOS.

La presente tesis de Maestría, si bien ha requerido de gran esfuerzo y dedicación por parte del autor y su directora de tesis, no hubiese sido posible su culminación sin la cooperación y apoyo de las instituciones y de cada una de las personas que a continuación citaré.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma de Chiapas por darme la oportunidad de formar parte del posgrado y por siempre estar presente en mi formación académica.

A la Universidad Politécnica de Chiapas, por apoyarme en todo lo requerido para culminar el proyecto.

A las instituciones de salud (Instituto de Salud del Estado, Jurisdicción Sanitaria Número 1 y al Centro de Salud "Tuxtla") por su colaboración en la investigación.

Al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Zacatenco, por su destacado apoyo durante mi estancia.

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a las personas que han sido un soporte y compañía durante el periodo de estudio.

A la Dr. Peggy Elizabeth Alvarez Gutiérrez, mi directora de tesis, quien además de su acertada y valiosa dirección, me otorgó su apoyo desmedido, paciencia en su estrategia didáctica y por su trato amistoso que facilitó el trabajo en equipo.

A los Drs. Victor Vega Villa y Sergio Saldaña Trinidad, integrantes del comité de asesores, expreso mi reconocimiento por sus valiosas aportaciones que hicieron mejorar la presente investigación.

A todos los docentes de la maestría que participaron en el proceso de mi aprendizaje y por compartir sus valiosas herramientas científicas.

A mi querida y tierna esposa, Petris, por entender mis inquietudes de progreso profesional, amainar mis periodos de estrés con sus tiernas palabras y por impulsarme a seguir en el camino tortuoso del conocimiento.

A mis padres Rodrigo y Elba, por sus sabios consejos y palmadas de aliento en momentos de flaqueza.

A mis hermanos y hermanas por mantenerse siempre plausibles en mis decisiones académicas.

A la Enfra.Toñita, Conchita y a los QFB. Darío, Betty y Lupita del Centro de Salud Tuxtla y demás personal, que desde el primer momento me brindaron todo su apoyo y colaboración sin ningún interés.

A la Dra. María del Pilar, Mtra. Angelita e Ing. Mariano, por su valioso apoyo y contribución en este estudio.

A todos mis amigos les doy un agradecimiento especial, por su apoyo, ánimo, cariño, y por su comprensión al tiempo que no les dedico por esta importante causa.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis de maestría, y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado su ayuda, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

CONTENIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
I. RESUMEN.....	4
III. ANTECEDENTES.....	8
1. La candidiasis en la historia.....	8
2. Generalidades.....	9
3. Descripción morfológica.....	10
4. Ecología.....	12
5. Factores predisponentes.....	13
6. Generalidades de especies de <i>Candida</i> de importancia clínica.....	14
6.1 <i>Candida glabrata</i>	14
6.2 <i>Candida albicans</i>	15
6.3 <i>Candida tropicalis</i>	16
6.4 <i>Candida krusei</i>	17
6.5 <i>Candida parapsilosis</i>	17
6.6 <i>Candida dubliniensis</i>	17
7. Anatomía de la vagina.....	19
8. Microbiota normal de la vagina.....	21
9. Factores locales de defensa antimicrobiana.....	22
10. Respuesta inmune contra la infección por <i>Candida spp</i>	23
11. Epidemiología de la infección por <i>Candida spp</i>	24
12. Candidiasis vaginal.....	25
12.1 Manifestaciones clínicas.....	26
12.2 Fisiopatogénesis de la infección vaginal por <i>Candida albicans</i>	27
12.3 Tratamiento de la candidiasis vaginal.....	27
13. Otros tipos de candidiasis.....	31
14. Métodos de estudio de <i>Candida spp</i>	32
14.1 Observación microscópica en directo.....	32
14.2 Observación microscópica usando tinciones.....	34
14.3 Prueba del tubo germinal o filamentación precoz.....	34
14.4 Medios de cultivo convencionales.....	35
14.5 Medios de cultivo cromogénicos.....	36

14.6 Medios de cultivo fluorogénicos.....	38
14.7 Identificación mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas.....	38
14.8 Pruebas inmunológicas.....	39
14.9 Métodos moleculares.....	40
15. Descripción demográfica de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez.....	41
IV. OBJETIVOS.....	44
Objetivo general.....	44
Objetivos particulares.....	44
V. HIPÓTESIS.....	45
VI. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	46
VI. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	49
1. Material biológico.....	49
2. Toma de la muestra.....	49
3. Transporte de las muestras.....	50
4. Métodos convencionales.....	50
4.1 pH vaginal.....	50
4.2 Prueba de aminas (Prueba de Whiff).....	50
4.3 Prueba selectiva rápida de la ureasa.....	50
4.4 Prueba de producción de tubo germinal.....	50
4.5 Examen por microscopía directa.....	52
4.6 Tinción de Gram.....	52
4.7 Aislamiento primario de <i>Candida spp</i> en medio YPD.....	52
4.8 Identificación morfológica en medios cromogénicos.....	52
5. Métodos moleculares.....	52
5.1 Extracción de ADN en especies de <i>Candida</i>	52
5.2 Diseño de oligonucleótidos.....	53
5.3 Ensayo de PCR.....	54
5.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	54
6. Análisis estadístico.....	55
7. Aspectos éticos.....	55
VII. RESULTADOS.....	56
1. Población y muestra.....	56
1.1 Características demográficas.....	56
1.2 Características socioeconómicas.....	57

1.3 Características clínicas.	58
1.4 Caracterización bioquímica.	60
1.5 Caracterización microbiológica.	61
1.6 Aislamiento e identificación de <i>Candida spp.</i>	61
2. Taxonomía de las especies de <i>Candida</i>	65
3. Caracterización de candidiasis vaginal.....	68
4. Caracterización molecular.	71
5. Manejo estadístico de datos.	74
5.1 Pruebas de independencia.	74
5.2 Análisis de pruebas de diagnóstico.....	75
VIII. DISCUSIÓN.	77
IX. CONCLUSIONES.	84
X. REFERENCIAS.	85
XI. ANEXOS.	93
1. Glosario de términos.	93
2. Formato de encuesta.....	96
3. Formato de consentimiento informado.	98
4. Difusión del estudio.	99
5. Cuaderno de protocolos.	118

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Título	Página
Figura 1	Estructuras fúngicas del género <i>Candida</i> .	11
Figura 2	Micrografía a 400X de <i>C. albicans</i> .	32
Figura 3	Chiapas: grado de marginación por municipio.	41
Figura 4	Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder Plus.	54
Figura 5	Distribución porcentual de mujeres en grupos de edad.	56
Figura 6	Prueba de la ureasa.	60
Figura 7	Tinción de Gram.	61
Figura 8	Morfología colonial de cepas aisladas de <i>Candida spp.</i>	62
Figura 9	Morfología celular de <i>Candida spp.</i>	62
Figura 10	Morfología colonial de especies de <i>Candida</i> en CandiSelect.	65
Figura 11	Morfología colonial de las especies de <i>Candida</i> en CHROMagar <i>Candida</i> .	66
Figura 12	Morfología colonial de las especies de <i>Candida</i> en CHROMagar <i>Candida</i> .	66
Figura 13	Distribución de mujeres con candidiasis vaginal por rangos de edad.	67
Figura 14	Electroferograma de producto de amplificación de ADN genómico de aislados de <i>Candida spp.</i> , teñidos con bromuro de etidio.	72

ÍNDICE DE TABLAS.

Figura	Titulo	Pagina
Tabla I	Características bioquímicas de especies de <i>Candida</i> de importancia médica.	18
Tabla II	Subgrupos que integran al complejo denominado <i>L. acidophilus</i> .	20
Tabla III	Clasificación química de los Antifúngicos.	27
Tabla IV	Esquemas de tratamiento de la candidiasis vaginal aguda.	28
Tabla V	Características de las colonias de <i>Candida spp</i> , en CHROMagar <i>Candida</i> .	36
Tabla VI	Características de las colonias de <i>Candida spp</i> , en CandiSelect.	37
Tabla VII	Características de las cepas utilizadas en este estudio.	50
Tabla VIII	Factores socioeconómicos y demográficos en mujeres estudiadas.	57
Tabla IX	Características de los hábitos sexuales.	58
Tabla X	Caracterización clínica de la población estudiada.	59
Tabla XI	Morfología colonial de cepas de <i>Candida spp</i> .	61
Tabla XII	Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados de <i>Candida spp</i> .	63
Tabla XIII	Especies aisladas del género <i>Candida</i> .	64
Tabla XIV	Características demográficas, socioeconómicas y clínicas de las mujeres con candidiasis.	69
Tabla XV	Resultados comparativos de las pruebas bioquímicas empleadas.	70
Tabla XVI	Resultados del procedimiento de PCR.	73
Tabla XVII	Evaluación de variables con tablas de contingencia y razón de probabilidad (Odds ratio).	74
Tabla XVIII	Resultados del test de pruebas de diagnóstico.	75

I. RESUMEN.

Las vulvovaginitis forman parte de los primeros motivos de consulta ginecológica mundialmente y la candidiasis vaginal está considerada como la primera causa de vulvovaginitis en todo México y Centroamérica. Si bien es cierto que *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada en la mayoría de las infecciones candidiasicas, otras especies no *albicans*, tales como *glabrata*, *tropicalis*, *krusei*, *parapsilosis*, entre otras, pueden originar patologías e incluso también ser muy patógenas. Es por ello que el estudio de la prevalencia de estas enfermedades es muy importante ya que nos permite conocer la magnitud del problema y el panorama epidemiológico en la entidad.

En el presente trabajo se estudiaron 167 mujeres entre 15 y 45 años de edad, en un Centro de Salud de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez que cumplieron con los criterios de inclusión. A cada paciente se le realizó una encuesta de factores relacionados y de datos clínicos.

El presente estudio se llevó a cabo en tres etapas. En la primera etapa se obtuvieron las muestras de exudados vaginales y los datos demográficos, socioeconómicos y clínicos de la población estudiada. En la segunda etapa se emplearon dos tipos de métodos de identificación de *Candida spp.* Los métodos bioquímicos permitieron el aislamiento de especies de *Candida*. *C. albicans* fue diferenciada de otras especies mediante la prueba del tubo germinal, prueba de la ureasa y uso de medios cromogénicos. Una vez obtenida las cepas, se emplearon métodos moleculares con el uso de un par de oligonucleótidos (INT1 e INT2) procedentes del intrón CAYST1 de *C. albicans*. Un estudio reciente demostró la utilidad de estos oligonucleótidos en la identificación oportuna y confiable de *C. albicans*, que podrían aplicarse en situaciones que requieran de un diagnóstico rápido y seguro, toda vez que los métodos convencionales no siempre ofrecen resultados confiables y requieren de mayor tiempo para la correcta identificación del hongo. En la tercera etapa se asociaron los factores demográficos, socioeconómicos y clínicos con la prevalencia de las especies de *Candida* aisladas.

Se obtuvieron 35 aislados clínicos de levaduras confirmadas por medio de identificación macroscópica por morfología colonial y técnicas bioquímicas. Mediante medios cromogénicos se identificaron 4 especies de *Candida*, distinguiendo a *C. glabrata* como agente principal y a *C. albicans* en segundo lugar. La prevalencia de la enfermedad fue del 21.0%, este dato fue similar que los obtenidos por otros autores, sin embargo fue significativamente mayor comparado con las prevalencia reportada al nivel nacional. No existió relevancia estadística entre las características demográficas, socioeconómicas y clínicas de la población y su relación con la candidiasis vaginal. Los resultados obtenidos demuestran que especies tales como *C. glabrata*, han cobrado importancia en las infecciones vaginales, toda vez que se han relacionado al uso indiscriminado de antifúngicos que condicionan la prevalencia de levaduras con resistencia antifúngica adquirida y con ello el riesgo de vaginitis candidiasica recurrente. El empleo de los oligonucleótidos INT1 e INT2 demostraron su utilidad en la identificación del género *Candida* como lo describió un trabajo previo, toda vez que se obtuvieron fragmentos entre 100 y 350 pb en las especies utilizadas en este estudio.

II. INTRODUCCIÓN.

Las especies del género *Candida* son hongos oportunistas que se han aislado en pacientes con infecciones micóticas [19]. Estos hongos se encuentran comúnmente en la flora normal del intestino delgado, vagina, boca y tegumentos del ser humano. Sin embargo, cuando los mecanismos de defensa en el organismo se alteran y disminuyen, pueden desencadenar infecciones desde leves hasta severas y mortales. *C. albicans* frecuentemente se aísla de la orina, secreciones vaginales, el esputo, y de suelo contaminado [35].

La candidiasis vaginal es una de las patologías ginecológicas con que se enfrentan los profesionales de la salud diariamente y se considera que cada mujer lo ha presentado en algún momento de su vida. *C. albicans* se ha visto involucrada en el 90% de las infecciones micóticas vaginales, sin embargo otras especies de *Candida* tales como *glabrata*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *krusei*, aunque ocupaban el 10% restante en prevalencia [30], en la actualidad cada vez se presentan con mayor frecuencia [8].

El diagnóstico de candidiasis superficiales no resulta difícil en la práctica clínica con el uso de métodos bioquímicos y de identificación morfológica. En cambio, el diagnóstico de candidiasis diseminada en el área hospitalaria es complicado, debido a que la morfología de pseudohifa sobre frotis húmedo, lo cual se asocia con cultivos positivos, identifica generalmente la candidiasis superficial [64]. Los cultivos sanguíneos tienen muy alta especificidad pero tienen una sensibilidad baja (50%) y el tiempo para la formación de colonias e identificación es mayor de 48 hrs. La prueba serológica de fijación del complemento y detección de anticuerpos es útil en el diagnóstico de la candidiasis, pero no es específica para *C. albicans*. Las pruebas de inmunoprecipitación y de aglutinación con látex no son ni sensibles ni específicas, por lo tanto no son consideradas una herramienta fiable para el diagnóstico de la infección. Las pruebas de determinación bioquímica de enolasa del suero tienen resultados similares. La prueba de ELISA (del inglés Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), ha resultado sensible para el diagnóstico temprano de candidiasis sistémica (88.9%), pero su especificidad no es muy

satisfactoria (82.6%) [1, 59]. El diagnóstico de enfermedades infecciosas con técnicas de biología molecular ha cobrado auge en la actualidad. Baquero *et al* (2002) demostraron en un estudio reciente, la utilidad de dos cebadores diseñados para amplificar un fragmento del intrón del gen CAYST1 de *Candida albicans*, con el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Sus resultados demuestran que mediante la amplificación del amplicón es posible identificar a *C. albicans* de otras especies. Además, que el método que presentan es rápido, económico y confiable [58].

En el presente trabajo se utilizaron pruebas bioquímicas, microbiológicas y la metodología molecular de Baquero para la identificación de especies de *Candida* en exudados vaginales de mujeres de 15 a 45 años de edad, para conocer la prevalencia de la candidiasis vaginal en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, que aunque no es una patología que requiere de un diagnóstico microbiológico urgente, esta metodología servirá de bases para estudios futuros, así como para caracterizar la distribución de especies del género *Candida*, ya que los precedentes existentes en esta ciudad, están basados en técnicas de diagnóstico convencionales [2].

III. ANTECEDENTES.

1. La candidiasis en la historia.

La descripción de candidiasis, data desde cuando Hipócrates describió en su tratado sobre "epidemias" donde describe la presencia de aftas o muguet (placas blanquecinas) en pacientes debilitados; Galeno lo describió como un trastorno común en niños y aun mas en aquellos enfermizos, Rosen von Rosenstein en 1771, y Underwood en 1784, reconocieron a la candidiasis como un trastorno del recién nacido. Bennet y Robin en 1853, apoyaron la hipótesis de Hipócrates al describir que la debilidad era la característica más común para adquirirla.

Esta enfermedad llegó a ser tan común en Francia, que la Real Sociedad Francesa de Medicina, ofreció una remuneración para su estudio en 1786 [3]. En 1839 Bernard Langenbeck encontró en Alemania un microorganismo en lesiones bucales de sus pacientes que los describió como "Tiphus-Leichen". En 1841 Berg identificó el origen microbiológico del muguet inoculando e infectando a bebés sanos, con lo que lo llamó *material de membrana aftosa* [4] y en 1846, describió que era adquirido por los biberones de uso común [3]. En 1843, Charles Robin le llamó por primera vez *Oídium albicans* [4], usando desde ese entonces un sin fin de nombres para titularlo, hasta la llegada de Roth Berkhout quien en 1923 le asignó el nombre de *Candida albicans* que ha permanecido hasta nuestros días. Las infecciones por especies de *Candida* vienen a recobrar interés mundial, a partir del inicio de la era antimicrobiana y su uso universal, sumado al uso de acciones intervencionistas como el uso de prótesis, catéteres o trasplante de órganos, pues a partir de esto se empezó a observar la forma de diseminación sistémica de la enfermedad [4].

En 1875 Haussmann relacionó la candidiasis vaginal con la enfermedad del muguet en el recién nacido, infiriendo que las lesiones en la boca de los recién nacidos eran procedentes de infecciones vaginales en la madre. Las primeras descripciones de otras formas de candidiasis fueron descritas por Dubendorfer en 1904, sobre onicomycosis y en 1907 por Jacobi, sobre enfermedad cutánea. Plass

et al, documentaron en 1931 la patogenicidad de *C. albicans*, al publicar sus hallazgos en la American Journal of Obstetrics and Gynecology. En 1949, Wilkinson, realizó por primera vez la descripción de la candidiasis vaginal, estableciendo la relación existente entre la presencia de hongos vaginales y vaginitis, haciendo hincapié que los epífitos no se desarrollaban a menos que tuvieran un terreno favorable. En lo sucesivo existieron diversos investigadores que descubrieron la relación que tenía la candidiasis en las infecciones de orden sistémico [3].

2. Generalidades.

Los integrantes del género *Candida* son organismos, haploides o diploides, con reproducción sexual o asexual [12], aerobios Gram positivos, Género *Candida*, Clase *Deuteromycetes*, Subclase *Blastomycetidae* y Familia *Cryptococcaceae* [19]. Son hongos de distribución universal que forman parte de la microbiota normal de la boca, tracto digestivo y genital femenino, que no generan enfermedad clínica o subclínica en un individuo sano [5]. Raramente se han aislado del suelo, ya que es poco probable la supervivencia y reproducción en un ambiente no animal [3].

Estos hongos no son patógenos por naturaleza estrictamente hablando. Algunas que se relacionan con la enfermedad en los hombres o animales no son capaces de originar un proceso patológico en un individuo sano, si no que, para cumplir con este objetivo es necesario de que se presenten alteraciones en el sistema de defensas celulares del organismo, fisiología o microbiota normal [3]. *Candida albicans*, es un microorganismo que se considera como el patógeno oportunista más frecuentemente que ha sido aislado en pacientes con infecciones micóticas, que han creado un fenómeno creciente al nivel mundial, con patologías frecuentes desde leves a severas como vulvovaginitis, candidiasis oral, conjuntivitis, dermatitis del pañal, paroniquias e intertrigo. En sujetos inmunocomprometidos es frecuentes encontrar esofagitis, miocarditis, abscesos hepato-esplénicos, infecciones pulmonares y del sistema nervioso central [5].

Si bien es cierto, que *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada en la mayoría de las infecciones candidiasicas, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.*

guilliermondii, *C. glabrata*, *C. krusei* y algunas otras especies de género, pueden provocar infecciones e incluso suelen ser muy patógenas. En el caso de *C. parapsilosis*, puede ocasionar la endocarditis infecciosa y, por otro lado *C. tropicalis* es la responsable de la tercera parte de los casos de candidiasis profunda en pacientes neutropénicos. *C. albicans* y *C. tropicalis* son especies con una alta capacidad de adherencia en las mucosas, lo cual es un factor de patogenicidad importante. Todas estas especies pueden vivir como comensales en el ser humano [3], y se tornan patógenas en el momento en que exista alguna alteración homeostática en la respuesta inmune. El oportunismo es favorecido por un gran número de factores que se ligan a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de esteroides y antibióticos, citotóxicos, trasplantes de médula ósea, instalación de catéteres intravenosos, prematuréz, diabetes mellitus, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre otros [7].

El género corresponde aproximadamente a 200 especies de levaduras con diferencias entre sí, considerando entre las características más homogéneas, la reproducción asexual por gemación multilateral y entre sus diferencias, la morfología celular, la capacidad para formar o no micelios o pseudomicelios y en su poder de asimilación de diversos compuestos [19].

3. Descripción morfológica.

La forma de levadura o blastospora es la forma unicelular del género *Candida*. Tienen una morfología elipsoidal de 3-8 x 2-7 μm . Pueden formar largas pseudohifas, hifas o blastoconidios, dependiendo del medio ambiente y la especie respectiva [19]. La reproducción de las levaduras es por gemación, formándose una nueva célula, en una parte de la superficie celular, diferenciándose en lo sucesivo, únicamente por la cicatriz que queda en la célula madre que corresponde al septo de separación. Las hifas que forman, se observan como filamentos delgados cilindriformes, constituidos por células separadas por septos que mantienen comunicación mediante un orificio entre dichos septos. Es común observar ramificaciones o blastosporas, a partir de las hifas, obtenidas por gemación lateral, así como numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u

ovaladas, con gruesa pared refringente de 8-16 μm de diámetro, situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados.

Las especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, tienen la capacidad de formar tubo germinativo, que se desarrolla por germinación de levaduras de donde emerge una estructura cilíndrica que crece continuamente por extensión. Sin embargo, es frecuente observar que un 5 a 10% de las levaduras de *C. albicans*, no forman tubos germinales [8]. Ver fig. 1.

Un micelio, es la aglomeración o conjunto de hifas, y es la estructura necesaria para poder efectuar invasión a tejidos profundos. La especie *albicans* también es capaz de crecer formando pseudohifas, las cuales se definen como levaduras más alargadas que no se han separado totalmente y que, por tratarse de células completamente formadas, pueden ser separadas mecánicamente.

En determinadas condiciones de cultivo *in vitro*, algunas células de las hifas de *C. albicans* pueden engrosar su pared y producir formas de resistencia o clamidosporas, las cuales son unicelulares, redondas u ovaladas, con pared refringente de 8-16 μm de diámetro [35]. La capacidad de *Candida spp*, de pasar de la fase levaduriforme a la micelial, se conoce como transición morfológica, y es un proceso reversible que puede inducirse *in vitro* en respuesta a diversos factores de tipo ambiental, como el pH (~ 7) y la temperatura ($\sim 37\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$); así como factores nutricionales, por mencionar, la presencia de N-acetil glucosamina, prolina, biotina, el grupo hemo, los compuestos sulfhidrilo, el zinc y el suero [9].

Las colonias que forma en medios sólidos de cultivo, son de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, de 1 a 3 mm, que generan un olor característico a levadura [10].

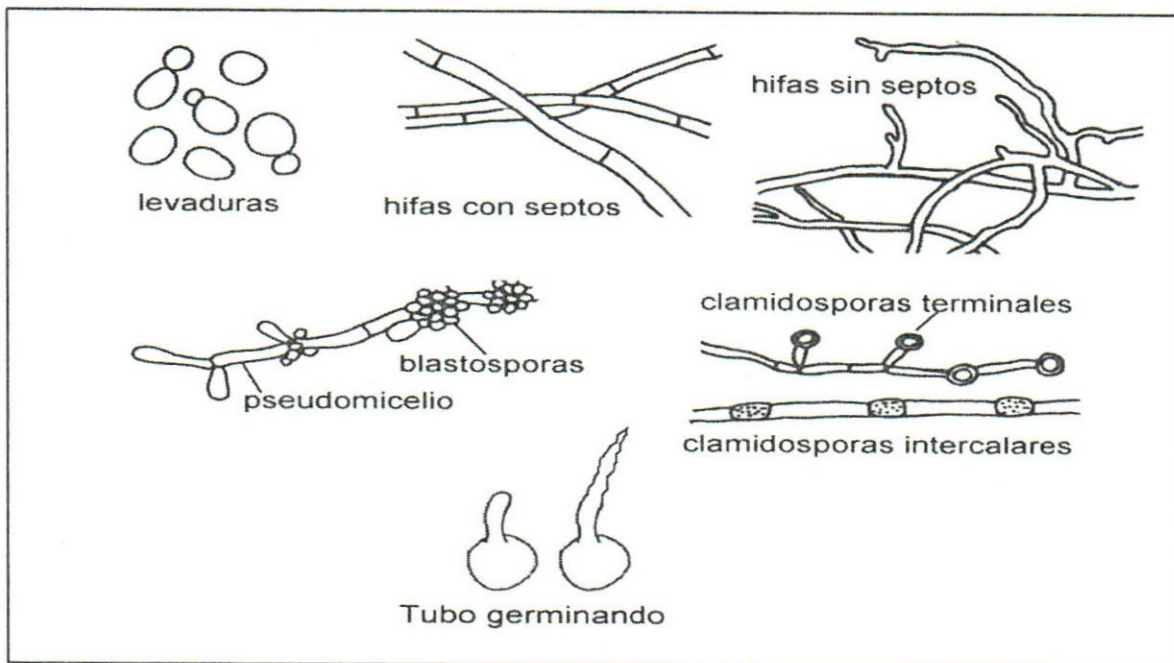


Fig. 1. Estructuras fúngicas del género *Candida*. *C. albicans* debido a su carácter pleomórfico es la especie que puede desarrollar cualquiera de estas formas según las condiciones ambientales. Tomada de Leonor Carrillo, 2005.

4. Ecología.

Las levaduras del género *Candida*, están asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Existen diferencias entre las especies del género, debido a que algunas como *C. albicans*, suele hallarse en piel y mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y genital del ser humano, de donde parten las infecciones de origen endógeno[19]. Se comporta como saprobios, de manera que su aislamiento, no implica por sí solo la presencia de infección. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas; en contraste, su supervivencia es mayor en ambientes húmedos, que disponen de una fuente de carbono orgánico e iones amonio o nitrato como aporte de nitrógeno, necesarios para sus procesos metabólicos [11]. Según Carrillo-Muñoz (2002), las especies no *albicans*, se consideran de origen exógeno, en tanto el hallazgo de *C. albicans* siempre trata de una infección endógena.

La localización de las especies de *Candida* dentro del cuerpo humano es diversa, debido a que se ha podido obtener cepas de *C. tropicalis* en especímenes

del tracto gastrointestinal, *C. glabrata* en el tracto genitourinario y cavidad oral, *C. parapsilosis* en muestras de piel y faneras; y *C. albicans* en piel, faneras, aparato urogenital, entre otras localizaciones [12, 24]. También se han aislado hongos de este tipo en cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos, ropa, así como dispositivos de uso médico. Esto se debe a la capacidad de *Candida spp.*, en particular *C. albicans* y *C. dubliniensis*, para formar biopelículas, dicho término se define como el desarrollo de microorganismos que se adhieren a la superficie de un dispositivo, con la producción de un polímero extracelular que provee una matriz estructural que facilita y aumenta su adhesión. *C. albicans* logra esto, adhiriéndose al dispositivo, haciendo una transición morfológica de levaduras a hifas o pseudohifas, de modo que al final forma una estructura tridimensional consistente en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas en una matriz de polisacáridos, carbohidratos, proteínas y componentes no conocidos. Esta característica ha permitido la diseminación nosocomial de levaduras en pacientes que se les inserta un dispositivo como catéteres endovenosos, válvulas, tubos endotraqueales, material de implante, entre otros, ocasionando con ello severos daños [13].

En los brotes de candidemia al nivel nosocomial, se ha responsabilizado a la vez, al personal de salud, puesto que se han podido aislar especies de *Candida* en manos. Esto se traduce como un constante desapego a las normas sanitarias de prevención [12].

5. Factores predisponentes.

Característicamente se ha encontrado un conjunto de factores que permiten a un individuo ser susceptible a la infección por *Candida spp.*, entre ellos destacan, enfermedades inmunosupresoras, como el cáncer, neutropenia, trasplante de órganos y el SIDA. En este tipo de pacientes se han podido aislar otras especies del género poco comunes en personas con inmunidad inalterada y se ha encontrado en áreas anatómicas habitualmente estériles como el esófago. Por otra parte el embarazo, que provee un ambiente adecuado para la colonización e invasión de levaduras, además de la quimioterapia, mediante uso de antimicrobianos, antimicóticos y terapia esteroidea, enfermedades metabólicas

como la diabetes mellitus, pacientes hospitalizados en estado crítico, pacientes quemados, así como los de edades extremas de la vida [7, 14, 15]. Existen hábitos que condicionan en forma coadyuvante a la infección por *Candida spp.* Tales como el uso de ropa ajustada o de mezclilla, tejidos no absorbentes que ocasionan menor ventilación y por lo consiguiente mayor humedad local. Así mismo el uso rutinario de duchas vaginales que modifican la microbiota y pH vaginal [30].

6. Generalidades de especies de *Candida* de importancia clínica.

6.1 *Candida glabrata*.

C. glabrata ha sido clasificada de manera histórica con otros nombres. Anderson (1917) lo llamó *Cryptococcus glabratus*; en 1938 Lodder y De Vries lo reclasificaron, denominándolo *Turoloopsis glabrata* [16].

Esta levadura ha sido identificada comúnmente como un saprófito no patógeno, pero el uso indiscriminado de antibióticos, antifúngicos y otros intermediarios, han creado condiciones que favorecen su desarrollo y distribución. Su hallazgo ha ido en incremento, en forma concomitante a su patogenicidad, pues, en estudios posmortem, se le ha responsabilizado como causal de muerte en pacientes con sepsis o en estado crítico, haciéndolo con esto, un importante patógeno nosocomial.

Su crecimiento en condiciones de laboratorio es favorecido con temperaturas de 30 a 37°C, en los medios en que crecen las otras especies de su género [17]. Sin embargo, a diferencia de las demás, el dimorfismo no forma parte de sus características, debido a que solo forma blastoconidios considerablemente pequeños de 1 a 4 μm , que no son capaces de formar pseudomicelios o hifas verdaderas en tejidos o *in vitro*. Esta característica le resta virulencia al hongo, debido que la adherencia como mecanismo invasivo, está vinculada a la presencia de hifas o pseudohifas [16]. No obstante ha sido considerado como un patógeno emergente por encontrarse con frecuencia en pacientes con incompetencia inmunológica [17]. Según Espinillo *et al*, su presencia está relacionada a seropositividad al VIH y a estratos socioeconómicos bajos [18].

Las colonias que forma, son indistinguibles a otras especies de *Candida* en medios enriquecidos, a reserva de los medios cromogénicos, que permiten distinguirlos merced a los colores que desarrollan. Otras características que lo diferencian de otras especies, es su genoma haploide, en contraste con el genoma diploide de *C. albicans* y otras especies no *albicans*; así mismo lo caracteriza, la presencia de una subunidad menor en el rRNA; y la fermentación y asimilación de un limitado número de azúcares como la trealosa y glucosa [17].

Dentro de las principales características de la especie, puede citarse, la resistencia innata a diversos antifúngicos azoles, particularmente al fluconazol, lo que ubica a *C. glabrata* como un principal agente etiológico de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos hospitalizados [37]. En la tabla I, se muestran las características bioquímicas de diferentes especies del género *Candida* [19].

6.2 *Candida albicans*.

C. albicans es un hongo estrictamente pleomórfico debido a la gran variedad de formas en que se puede encontrar (figura 1), ya sea como levadura, micelio, pseudomicelio o clamidospora; sin embargo es más común definirlo como dimórfico debido a las dos formas más comunes encontradas en la naturaleza, levaduras y micelios. Esta especie pertenece a la clasificación de los hongos imperfectos, por carecer de un ciclo sexual [20]. Es considerada la especie oportunista más frecuentemente aislada en muestras clínicas de la mayoría de los estudios que involucran al género, así como agente causal de diversas infecciones al nivel tegumentario y en zonas húmedas. Anteriormente se le confundía con *C. stelatoidea*, pero como resultado de estudios meticulosos, concluyeron en que se trataba de la misma especie [21]. Así mismo, es la especie del género *Candida*, mayormente caracterizada y estudiada, por sus peculiaridades patogénicas. Aunque, en la actualidad, han cobrado mayor interés otras especies no *albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* entre otras.

C. albicans tiene una temperatura óptima de crecimiento de 30 a 37°C. En condiciones de laboratorio crece en medios enriquecidos como: agar

Sabouraud, papa dextrosa (PDA), harina maíz, Tween 80 e YPD (del inglés Yeast, Peptone, Dextrose), entre otros [59].

El genoma de *C. albicans*, se encuentra organizado en 8 pares de cromosomas homólogos, con un tamaño de 33 Mb aproximadamente, con un contenido limitado de intrones y un alto contenido de Adenina (A) y Timina (T) (65-70%). Este genoma es inestable debido a su reorganización cromosómica frecuente en respuesta a diversos factores de tipo ambientales, nutricionales y del uso de antifúngicos; variabilidad que ha utilizado el hongo como un mecanismo de defensa y de supervivencia [19].

El hongo, tiene diversos factores de virulencia conocidos, determinados por genes que se expresan en un momento concreto y que establecen el fenotipo y virulencia de cada aislamiento. Esto le permite ubicarse dentro de los agentes patógenos oportunistas más importantes. Entre éstos genes, están la hexosaminidasa (*HEX1*), genes de proteinasas aspárticas (*SAP1*, *SAP2*, *SAP3* y *SAP4*) y así como un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión (α *INT1*). Estas características, se resumen en capacidad de adherencia de la levadura a células epiteliales y endoteliales, con la formación de hifas, que permiten la diseminación a tejidos; producción enzimas proteolíticas como la aspartil proteasas, cambios fenotípicos, producción de fosfolipasas y modulación antigénica, mediante la segregación de sustancias inmunomoduladoras, que permiten la evasión de la respuesta inmune del huésped [12, 17].

6.3 *Candida tropicalis*.

C. tropicalis es una levadura, diploide, asexual, no esporulada, considerada como la segunda especie del género *Candida*, más patógena. No obstante, su hallazgo está más relacionado con candidiasis profundas y de membranas mucosas [22, 26]. Representa la tercera especie más comúnmente aislada, pero ocupa el segundo lugar, en aislamientos de muestras del aparato respiratorio. Su hallazgo es común en pacientes con inmunocompromiso, así como receptores de trasplantes de órganos o hueso, terapia citotóxica, SIDA y diabetes mellitus [23,

26]. Generalmente es susceptible a los antifúngicos azoles y polienos, pero últimamente ha demostrado resistencia al fluconazol y a la 5 fluorcitocina [23].

6.4 *Candida krusei*.

C. krusei, corresponde a un hongo oportunista, aislado con frecuencia en infantes con episodios diarreicos, así como en otras regiones del aparato respiratorio, digestivo y urinario en pacientes que cursan con granulocitopenia [26]. Son levaduras de pequeño tamaño, que forman colonias de coloración blanquecina a crema en medios habituales de aislamiento. Una característica de interés general es la poca sensibilidad que tiene a antifúngicos azoles de uso cotidiano [24].

6.5 *Candida parapsilosis*.

Es uno de los patógenos nosocomiales más importante en el mundo entero, debido a que ataca a recién nacidos prematuros y adultos inmunocomprometidos. Ocupa el segundo lugar como agente causal de infecciones por candidiasis en unidades de cuidados intensivos en los Estados Unidos [25]. Se le ha encontrado como agente causal de infecciones dérmicas, de donde es colonizador habitual, así como en personas con endoftalmitis, endocarditis y fungemia [26]. Esta levadura comparte factores de patogenicidad con *C. albicans* como son, la producción de proteinasa aspártica y lipasas, que digieren a los lípidos para nutrirse; adhesión a las células epiteliales e interacción sinérgica con otras enzimas hidrolíticas para ocasionar lesión tisular, producción del proceso inflamatorio y la respuesta inmune por parte del huésped [26].

6.6 *Candida dubliniensis*.

Es una especie recientemente identificada, pues en tiempos de antaño, solía confundírsele con *C. albicans*, por su capacidad de formar de igual manera tubos germinativos y clamidosporas, pero la técnica de Fingerprintin 27A, utilizada para *C. albicans*, disipó las dudas, al observar negatividad. Fue aislado en Dublin, Irlanda en 1995 en un paciente con candidiasis esofágica [10]. A diferencia de la especie *albicans*, no forma parte de la microbiota normal del ser humano, ya que

generalmente suele aislarse en cavidad oral de pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia adquirida (VIH) o que presentan el SIDA [20].

El cultivo in vitro es en temperaturas de 30 a 37°C, en medios enriquecidos habituales para *C. albicans*, como agar papa dextrosa o Sabouraud, sin embargo es limitado o nulo a 45°C. Se ha logrado hacer la diferenciación fenotípica entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* por la incapacidad de ésta última, para desarrollarse a 45°C y asimilar en forma nula al metil D-glucósido y la xilosa. Algunos medios como el Tween 80, permiten observar la actividad lipolítica de *C. albicans* ayudando con ello al mismo propósito. En el medio Staib, *C. albicans* produce colonias lisas y brillantes, con visualización microscópica de hifas y blastoconidios, en tanto, *C. dubliniensis*, forma colonias opacas, con blastoconidios, hifas y clamidoconidios [27]. Finalmente, los medios cromógenos, diferencian estas dos especies, por las tonalidades colorimétricas y características morfológicas que desarrollan en ellos [66. 67. 68].

Aunque en medios habituales de crecimiento, forma colonias similares a las producidas por *C. albicans* u otras especies del género *Candida*, se ha logrado hacer la caracterización y diferenciación genotípica mediante pruebas moleculares como DNA fingerprinting, análisis por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y electroforesis de campo pulsado, así como mediante ensayos bioquímicos como la prueba de actividad de la β -glucosidasa, característica que no expresa *C. dubliniensis* [20].

Tabla I. Características bioquímicas de especies de *Candida* de importancia médica. (David Ellis, Mycology online, 2008).

Características		<i>albicans</i>	<i>glabrata</i>	<i>tropicalis</i>	<i>guilliermondii</i>	<i>kefyr</i>	<i>krusei</i>	<i>parapsilosis</i>
Formación del tubo germinal		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Formación de capsula		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hidrolisis de la urea		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	variable	Negativo
Crecimiento a 37 °C		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Variable	Positivo	Positivo
Filamentación	Positivo	1, 5.	1	1, 3, 4, 5.	1, 7.	1	1	1
	Variable	3, 4.	4	7	3	1, 5, 7.	2, 3, 4, 5, 7.	3
Test de asimilación	Positivo	1, 3, 4, 5, 7, 16, 17, 23.	1, 4.	1, 3, 4, 5, 11, 16, 17, 21, 23.	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 34.	1, 2, 3, 7, 8, 19.	1, 15, 11, 25.	1, 3, 4, 5, 7, 14, 15, 16, 17, 18.
	Variable	6, 11, 15, 21, 24, 25, 26, 27.	15, 19.	7, 6, 9, 14, 15, 19, 22, 24, 27.	27, 25.	4, 9, 11, 15, 16, 17, 21, 22, 24, 27.	22, 24.	11, 19, 22, 24, 27.

1 glucosa; 2, lactosa; 3, galactosa; 4, trealosa; 5, maltosa; 6, melicitosa; 7, sucrosa; 8, rafinosa; 9, celobiosa; 10, melobiosa; 11, ácido succínico; 12, glucitol; 13, galactiol; 14, ribitol; 15, glicerol; 16, D-manitol; 17, D-xilosa; 18, D-arabinosa; 19, DL-ácido láctico; 20, L-ramnosa; 21, L-arabinosa; 22, L-sorbose; 23, D-glucitol; 24, Acido cítrico; 25, ácido láctico; 26, aorbosa; 27, D-ribosa.

7. Anatomía de la vagina.

La vagina es un músculo membranoso que se extiende del cuello uterino a la vulva, situada por delante del recto y por debajo del cuello uterino. Consta de una porción pélvica y otra porción perineal, la cual atraviesa para abrirse al exterior. Tiene una dirección oblicua hacia abajo y adelante, una longitud de 8 cm como promedio, sin embargo gracias a su elasticidad puede dilatarse hasta 2 a 3 cm más de lo normal, permitiendo en ocasiones insertar la mano o antebrazo en procedimientos obstétricos. Tiene dos caras anterior y posterior de 7 y 9 cm respectivamente, aun que existe evidencia de vaginas muy cortas (4 cm) pero también las hay muy largas, que alcanzan hasta los 14 cm de longitud. Tiene diversos medios de fijación, siendo por arriba con el cuello uterino, por abajo con el perineo y la vulva, por delante con la vejiga y por detrás con el recto.

Internamente presenta pliegues, llamadas crestas o arrugas vaginales, muy desarrolladas en sus dos tercios inferiores y poco marcadas en su tercio superior. También se encuentra constituida por tres capas musculares siendo: una capa externa constituida de tejido conjuntivo y fibras elásticas; una capa muscular, constituida por fibras musculares lisas dispuestas en dos planos y por una capa mucosa, de una coloración rosada, que se torna rojo oscuro durante la menstruación y violácea durante el embarazo, que la constituyen por epitelio estratificado fijo a un corion rico en fibras elásticas.

La irrigación sanguínea de la vagina, se la proporcionan la arteria vaginal, rama de la hipogástrica, la uterina y la hemorroidal media. Los nervios que emanan del ganglio hipogástrico inervan la porción superior y el pudendo interno la porción inferior vaginal [28].

La vagina produce en condiciones normales una secreción clara, transparente, floculada, muy viscosa, inodora, en cantidades variables, con abundantes células de descamación del epitelio vaginal y *Lactobacillus acidophilus* [30].

Las funciones que desempeña la vagina son diversas. Tiene una función de barrera, mediante la producción de secreción vaginal mucosa que impide el fácil ascenso de microorganismos al útero e inhibe el desarrollo bacteriano o fúngico por medio del pH que lo caracteriza favorecido por los *L. acidophilus* y su contenido de Inmunoglobulina (Ig) A. La función secretora se da por la producción de secreción mucosa de las glándulas vaginales que sirve de eliminación de células descamadas y eliminación bacteriana, además como lubricante durante la actividad sexual. La función secretora permite la eliminación de sustancias de desecho provenientes del útero tales como las del periodo menstrual. Otra función importante es la sexual, ya que su amplia irrigación sanguínea y nerviosa le permite la percepción y respuesta a estímulos placenteros durante la primera etapa del ciclo sexual [29].

8. Microbiota normal de la vagina.

La colonización del microecosistema vaginal se inicia desde la etapa del nacimiento, debido a que durante el parto, la recién nacida recibe al pasar por el canal del parto, el primer inóculo de flora vaginal, constituyéndose de esta manera por bacterias aerobias y anaerobias [30].

En condiciones normales, la vagina de una mujer adulta es ácida y contiene cantidades muy importantes de glucógeno, el cual es fermentado por *L. acidophilus*, un complejo de lactobacilos compuesto por dos subgrupos [30] (Tabla II) anaerobios facultativos, Gram positivos, que constituyen el 90% de la microbiota normal de la vagina y participa en la regulación del ecosistema vaginal, produciendo peróxido de hidrógeno y ácido láctico, que otorga el pH ácido normal vaginal, siendo este entre 4.0 y 4.5 [31] el cual puede variar en cada momento del ciclo menstrual de la mujer. Las bacterias, hongos y protozoos, requieren de un medio alcalino (pH mayor de 6.0) para su reproducción y también utilizan el glucógeno como fuente nutricia [32].

Tabla II. Subgrupos que integran al complejo denominado *L. acidophilus*. No incluye los subgrupos recientemente identificados como: *L. inners*, *L. amylolyticus*, *L. jensenii* y *L. buchneri*. Tomado de Cassanova *et al*, 2007.

Subgrupo A		Subgrupo B	
A1	<i>L. acidophilus</i>	B1	<i>L. gasseri</i>
A2	<i>L. crispatus</i>	B2	<i>L. johnsonii</i>
A3	<i>L. amylovorus</i>		
A4	<i>L. gallinarum</i>		

Antes de la pubertad la vagina es alcalina y no produce glucógeno, por lo que no existen *L. acidophilus*, sin embargo la microbiota en esta etapa se constituye por estafilococos, estreptococos, difteroides y *Echerichia coli*. Durante la etapa reproductiva la microbiota es modificada prevaleciendo *L. acidophilus*, seguidos de levaduras como *Candida spp*, *Turolopsis spp*, *Estreptococos*, *E. coli*, *Acinetobacter spp*, *Clostridium spp*, *Corynebacterium spp*, *Enterococcus*, *Moraxella*

spp, *Fusobacterium spp* y *Gardnerella vaginalis*, como integrantes de la microbiota normal [33].

C. albicans, coloniza en forma habitual a la vagina en un 10 a 15% de las mujeres no gestantes, incrementándose hasta un 35% durante el embarazo [49], pero a la vez, otras especies del mismo género, pueden ser residentes como, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. Kefyr* y *C. parapsilosis*, aunque con menor frecuencia y en determinadas condiciones. Al llegar la menopausia el glucógeno vaginal deja de producirse debido a pérdida de estímulos hormonales y entonces la vagina hospeda a los mismos microorganismos prevalecientes durante la niñez [35].

9. Factores locales de defensa antimicrobiana.

La vagina, cuenta con diversos mecanismos de defensa a la invasión de microorganismos, así como de control para evitar la patogenicidad en los microorganismos que la colonizan de manera habitual.

L. acidophilus o de Döderlein, juega un rol muy importante en la conversión del glucógeno a glucosa [30], favoreciendo con ello, la reproducción de la flora bacteriana que la fermentan. Así también participan en la producción del ácido láctico, lactadinas, acidolina, lactacin β y el peróxido de hidrógeno, que neutralizan a diversas bacterias que invaden el epitelio vaginal; además que inhiben la adhesión de esporas, mediante un proceso de co-agregación y competencia de receptores de membrana en el epitelio vaginal. Los leucocitos polimorfonucleares y monocitos, inhiben la infección auxiliados por otros miembros de la flora microbiana normal [36]. Otro mecanismo de defensa es la producción de moco cervical que forma un tapón mucoso que impide la invasión microbiana y que a su paso en el canal vaginal, contribuye a la lubricación, arrastre de productos de desecho y células muertas [32].

La presencia de inmunoglobulinas locales secretoras (Ig A), juegan un rol en el mecanismo inmunológico de defensa [30]. Si estas barreras naturales se ven alteradas, los microorganismos proliferan rápidamente, empleando sus enzimas

hidrolíticas que dañan a las membranas y establecen la infección conllevando a una respuesta tisular muy variable por el huésped [32].

10. Respuesta inmune contra la infección por *Candida spp.*

Los mecanismos de defensa inmune contra la mayor parte de las especies de *Candida* son poco conocidos, no obstante, es más notable el conocimiento sobre estas bases en la especie *albicans*, por tal motivo se abordará esta respuesta siguiendo dicho modelo [43].

La primera línea de defensa ante una invasión fúngica por *Candida spp.*, lo constituyen la piel y mucosas, con la microflora de *L. acidophilus* y su pH, así como las células de Langerhans, queratinocitos y algunas moléculas como lactoferrina y transferrina, que participan en forma activa en la respuesta inflamatoria. Esta primera barrera es evadida cuando suceden alteraciones del ecosistema vaginal.

Los macrófagos y monocitos, constituyen la segunda línea de defensa, debido que al fagocitar las levaduras, producen mieloperoxidasas, aniones superóxidos, proteínas catiónicas y los iones ferrosos, como mecanismo de ataque y muerte [12].

La observación clínica y experimental ha establecido que los leucocitos polimorfonucleares son los responsables de la tercera línea de defensa y de la mayor parte de la respuesta. En modelos animales se ha observado la participación de las células Th1 en la producción de citoquinas como la Interleucina-2 (IL-2), interferón gamma, y la IL-12, protegiendo al huésped en la infección sistémica, mientras que las Th2 participan produciendo citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, así como inmunoglobulinas Ig A e Ig G, protegiendo de esta manera, contra la susceptibilidad a la infección sistémica [12, 43].

En efecto, la inmunidad celular, tiene un claro desempeño en la protección contra *C. albicans* al nivel de mucosas, ya que, se ha observado en el estudio de pacientes con candidiasis localizada, una disminución en el recuento de células de defensa inmunológica [43]. Esto a la vez puede condicionar la adaptación fenotípica y genotípica de *C. albicans*, garantizando con ello, la supervivencia y la evasión a la respuesta inmune del huésped [37].

11. Epidemiología de la infección por *Candida spp.*

Desde los inicios de los años 80's, se ha incrementado en forma desmedida los episodios de candidiasis. En estudios recientes han encontrado incremento del 207% del número de casos, entre 1979 y el año 2000, que se asocian paralelamente al acrecentamiento de enfermedades de inmunocompromiso, así como enfermedades metabólicas, disfunción de neutrófilos, defectos en la inmunidad celular y otros factores que lo favorecen [38].

Dentro de las infecciones al nivel nosocomial, es considerada la 4ª causa de candidiasis sistémica y aproximadamente el 80% de las infecciones fúngicas. En las últimas décadas, un 35% de estas infecciones han remplazado a la *C. albicans* por especies *no albicans* [39]. Así mismo la frecuencia de las infecciones sistémicas aumentó en las dos décadas pasadas, con una mortalidad del 50 al 80%, pese a un tratamiento antifúngicos idóneo [58]; causa de ello, ha sido la resistencia antifúngica natural, que caracterizan algunas especies del género, como *C. krusei* y *C. glabrata* y otras que han desarrollado resistencia secundaria, como *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. lusitanae* [39].

La candidiasis vaginal constituye uno de los padecimientos ginecológicos más frecuentes, cuya incidencia ha aumentado desde la década pasada, involucrando cada vez más a especies *no albicans* [12, 30]. El 20 al 30% del total de las atenciones de la consulta ginecológica, se le han atribuido a ella [49], observándose con mayor frecuencia en mujeres sexualmente activas de 20 a 30 años de edad [40].

C. albicans, es responsable del 90% de las infecciones vaginales por levaduras [41], y de otras patologías ginecológicas como la peritonitis candidiasica [42], el resto lo constituyen *C. glabrata* y *C. tropicalis* principalmente [43]. No obstante, en recientes años otras especies de *Candida*, *no albicans*, se han incrementado y han despertado el interés de varios investigadores, encontrando como especies de importancia al nivel nosocomial a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*, entre otras [44, 49]. *C. glabrata*, se encuentra cada vez más en muestras de exudado vaginal de mujeres y pacientes hospitalizados con larga estancia [16]. En lo que respecta a la vaginitis candidiásica, se ha

considerado que el 75% de las mujeres entre el inicio de la menarca y la llegada de la menopausia, han presentado por lo menos un episodio de vulvovaginitis candidiásica en su vida, el 40% ha tenido más de dos episodios y el 5% de ellas ha presentado la infección de manera recurrente [49, 44].

En México, según los reportes de la Secretaría de Salud en el año 2007 la prevalencia de candidiasis urogenital fue del 1% de la población femenina de 15 a 45 años de edad y en 1.6% de las mujeres Chiapanecas. No obstante, diversas investigaciones en nuestro país, han reportado mayor prevalencia. Cassanova *et al* (2007), ha encontrado especies de *Candida* en el 39% de las mujeres en edad reproductiva [30], y ha descrito que en muchas de las veces reside en la microbiota vaginal causando infección asintomática. Reyna *et al*, lo encontraron en el 27% de una población de mujeres mexicanas [45], en contraste Rivera *et al* (2006) describió una prevalencia del 10% en otra población femenina en México. Martínez *et al* (2004) identificaron a *Candida spp.*, en 15% de mujeres de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas [2].

Es preciso señalar que para entender la situación epidemiológica de la candidiasis vaginal, es conveniente comprender su íntima relación con factores geográficos y estacionales, mecanismos de transmisión, métodos de diagnóstico disponibles en cada región, medidas preventivas de control, tratamientos disponibles y el uso de antifúngicos [24].

12. Candidiasis vaginal.

La candidiasis vaginal es una vaginitis sintomática, que en ocasiones involucra a la vulva, denominándolo de esta manera vulvovaginitis candidiasica. Es causada por levaduras del género *Candida* [47] y constituye a una de las entidades infecciosas al nivel vaginal más frecuente en la consulta ginecológica [49]. *C. albicans* como ha sido la especie predominante en diversos estudios, seguida de *C. glabrata* y otras especies no *albicans* que se han aislado con mayor frecuencia en últimos años. Esta aseveración se debe al uso indiscriminado de antimicóticos de uso tópico y sin prescripción médica, que en el transcurso del tiempo han

favorecido que las levaduras establezcan mecanismos de evasión a la respuesta inmune del huésped y generen cepas farmacorresistentes [47].

Debido a que *Candida spp* tiene la posibilidad de transmitirse por vía sexual, se le ha clasificado dentro de las enfermedades de transmisión sexual [4] y se le considera como la segunda causa de infección vaginal en las mujeres en etapa reproductiva [48] únicamente superada por la primer causa, la vaginosis bacteriana [30].

Para fines de definición se hace referencia a vulvovaginitis esporádica, aquella que se presenta en una o dos ocasiones al año, en contraste, se habla de vulvovaginitis recurrente cuando se presentan de tres a más episodios al año. Este tipo de infecciones puede clasificarse en primarias o secundarias. Las vulvovaginitis primarias, son las que se presentan de manera idiopática o de causas desconocidas. Las vulvovaginitis secundarias se presentan ante la presencia de uno o diversos factores condicionantes, como lo son diabetes mellitus descontrolada, embarazo o uso de medicamentos esteroideos o antimicrobianos, uso de hormonales anticonceptivos, enfermedades favorecedoras de inmunodeficiencias, así como otros factores que contribuyen a la infección como el uso de pantalones ajustados, ropa interior de nylon y la utilización rutinaria de duchas vaginales [49].

La recidivancia en las enfermedades micóticas vaginales, se debe en gran parte por falta de una erradicación completa o por la existencia de hongos que presentan resistencia natural o adquirida a los antifúngicos como *C. krusei*. Esto se refleja en un fallo terapéutico y por tanto a la no solución del problema [42].

12.1 Manifestaciones clínicas.

Los síntomas que predominan en la enfermedad vulvovaginal por levaduras del género *Candida*, son prurito vaginal de mediana a gran intensidad, que puede involucrar vulva y labios vaginales, así como un exudado vaginal de característica semilíquida adherente con aspecto de "queso tipo Cottage", con o sin mal olor [30]. Es característico encontrar despulimiento la mucosa vaginal y congestión intensa, asociado a la formación de placas blanquecinas en paredes vaginales [49]. Sin

embargo es necesario recordar que esta enfermedad suele ser asintomática en un porcentaje significativo, por lo que no basta hacer un diagnóstico definitivo basado solamente en los criterios clínicos [70].

12.2 Fisiopatogénesis de la infección vaginal por *Candida albicans*.

Las blastosporas, son el fenotipo de transmisión, extensión, diseminación y transmisión; y debido a que forman una estructura de resistencia, se asocian a colonizaciones vaginales asintomáticas. El primer paso para la adquisición de la enfermedad es la adhesión, mecanismo que permite la supervivencia de las esporas y el cual consiste en el anclaje de una proteína transmembrana de la membrana de la levadura (análoga a la integrina), al receptor epitelial de membrana iCb3 y fibronectina. Las esporas *per se*, son incapaces de invadir los tejidos, por lo que es crucial su germinación con la producción de hifas, pseudohifas y formación de micelios que producen y liberan proteasas para la proteólisis defensiva del ecosistema vaginal [42] En respuesta a esta invasión a tejidos vaginales, se producen prostaglandinas, bradicininas y citoquinas proinflamatorias que ocasionan eritema vaginal, el característico prurito vaginal y auxiliado con la respuesta inmune celular, un flujo vaginal blanquecino, consistente en células epiteliales de descamación y polimorfonucleares [43].

12.3 Tratamiento de la candidiasis vaginal.

Es común observar como en la actualidad los clínicos se encargan del tratamiento de las vaginitis en general, con el uso de la sospecha clínica como herramienta principal, omitiendo a menudo, realizar pruebas de aislamiento en medios de cultivo y pruebas de sensibilidad antimicrobiana o antifúngica [8, 47], fracasando con ello en el 50% de los casos, debido a que en nuestros días se sabe que, no existen síntomas o signos clínicos patognomónicos de una enfermedad vaginal infecciosa como la tricomoniasis urogenital, vaginosis bacteriana y la vaginitis por *Candida* [50]. Esto ha suscitado una serie de mecanismos en el hongo, que permite establecer cada vez mayor resistencia antifúngica, ya sea por modificaciones en su información genética o por otros mecanismos de evasión a la respuesta inmune del huésped [37].

En el empleo de tratamientos para combatir a las candidiasis, han sido utilizados diversos compuestos, tales como: metales pesados, metaloides y derivados azufrados, sulfonamidas hasta los primeros antifúngicos como la griseofulvina, nistatina, anfotericina B o 5-fluorocitosina y los derivados azólicos. Estos últimos, a partir del hallazgo de su poder terapéutico en 1949 (Kimming y Rieth) y el descubrimiento del primer imidazol, el clotrimazol en 1969 (Plemple *et al*), se han considerando como los de mayor uso y en investigación continua para disponer de nuevas innovaciones y opciones terapéuticas mejoradas [24, 42]. Así también se ha desarrollado nuevas moléculas como las alilaminas, derivados de la morfolina, y equinocandinas, como las que se han ligado a lípidos como anfotericina B y nistatinas [24]. Ver tabla III.

Tabla III. Clasificación química de los antifúngicos. Tomado de Cassanova *et al*, 2007.

Grupo	Antifúngico
Poliénicos	Nistatina: nistatina liposomal. Anfotericina B.
Benzoimidazoles.	Imidazoles: Miconazol, clotrimazol, ketoconazol. Triazoles: Itraconazol, fluconazol. Triazoles de 2ª generación: Voriconazol, ravuconazol, senticonazol, sertaconazol, posaconazol.
Alilaminas	Terbinafina, naftilina.
Lipopéptidos	Papulacandinas. Equinocandinas: Caspofungina. Triterpenos glicosilados.

12.4 Tratamiento en episodios agudos.

Los medicamentos que se encuentran disponibles para el tratamiento de las vaginitis candidiasicas, tienen diferentes mecanismos de acción concediendo diversos grados de seguridad, efectividad y espectro, frente a los patógenos expuestos. Se encuentran en diversas presentaciones, ya sea como de uso tópico o enteral [24].

En los episodios agudos, se recomienda el uso de antifúngicos aplicados de

manera tópica, que inclusive pueden utilizarse a partir del segundo trimestre de la gestación (Tabla IV). En la terapia antifúngica por vía oral se utilizan desde imidazoles, hasta triazoles de primera o segunda generación [30].

Tabla IV Esquemas de tratamiento de la candidiasis vaginal aguda. Tomado de Cassanova, 2007.

Grupo terapéutico	Antifúngico	Vía	Posología
Benzoimidazoles	Butoconazol	Vaginal	Crema al 2%: 5 g diarios por 3 días o dosis única.
	Clotrimazol	Vaginal	Crema al 1%: 5 g diarios por 7-14 días o tabletas vaginales de 100 mg: 2 diarias por 3 días o una dosis única de 500 mg.
	Miconazol	Vaginal	Crema al 2%: 5 g por 7 días, u óvulos de 100 mg: 1 óvulo diario por 3 días.
	Tioconazol	Vaginal	Pomada al 6.5%: 5 g en dosis única.
	Terconazol	Vaginal	Crema al 0.4%: 5 g por 7 días o al 0.8%: 5 g diarios por 3 días o un óvulo de 80 mg diario por 3 días.
	Ketoconazol	Oral	Tabletas 200 mg: 2 veces al día por 5 días.
	Itraconazol	Oral	Cápsulas 100 mg: 2 diarios por 3 días o 1 al día durante 15 días.
	Fluconazol	Oral	Cápsulas 150 mgs: Dosis única.
Polienos	Nistatina	Vaginal	Crema 125,000 U (5g): Una aplicación diaria por 7 días o tabletas de 100,000 U: Una tableta cada 12 hrs por 7 días.

12.5 Tratamiento en episodios recurrentes.

El tratamiento en vaginitis candidiasicas recurrentes debe prolongarse durante un periodo de 6 meses, para garantizar la curación de la mujer afectada, por lo tanto según Casanova *et al* (2007), el manejo deberá ser el siguiente:

1. Prolongar la terapia tópica durante 14 días.
2. Fluconazol (150 mg) 1 cápsula diaria durante 3 días y posteriormente una dosis semanal por 6 meses o:
3. Itraconazol (100 mg) 1 cápsula dos veces al día durante 7 días, posteriormente cada 3 semanas durante 6 meses.

12.6 Mecanismos de acción de los antifúngicos.

Los medicamentos que se encuentran disponibles para el tratamiento de las vaginitis candidiasicas, tienen diferentes mecanismos de acción concediendo diversos grados de seguridad, efectividad y espectro, frente a los patógenos expuestos [24].

Los antifúngicos azoles, constituyen los principales fármacos, mayormente utilizados en la práctica médica diaria, debido a que estos actúan en la membrana celular de los hongos con un efecto fungistático, principalmente ante la enzima lanosterol 14-alfa demetilasa dependiente del citocromo P450 microsomal, bloqueando a consecuencia, la síntesis del ergosterol, con la consiguiente alteración de la permeabilidad, pérdida de elementos intracelulares con lisis final del hongo. Así también esta enzima ocasiona acumulo de 14-a-metil esteroides, los cuales, rompen las cadenas de fosfolípidos de la membrana celular, impidiendo la función de algunos sistemas enzimáticos, ligados a la membrana que ocasionan un inadecuado crecimiento de los hongos [42, 51].

Los polienos tienen un efecto fungicida, debido a que estos no actúan directamente sobre la membrana celular del hongo, pero la desestabilizan, debido a que se unen a la membrana citoplasmática, ocasionando alteraciones de permeabilidad, pérdida de contenido intracelular y muerte del mismo. Los polienos, representados principalmente por la Anfotericina B, fueron descubiertos durante los años 50's, y esta última es actualmente uno de los medicamentos de elección en micosis profundas e invasoras que amenazan la vida del paciente inmunocomprometido [52].

Dentro de las equinocandinas disponibles, la caspofungina, trata de una equinocandina semisintética que actúa alterando la síntesis de la pared celular fúngica, al inhibir la enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa, debido a que altera la producción de polímeros de glucano y principalmente la 1,3- β -D-glucano, que constituye uno de los elementos estructurales y fisiológicos de la pared celular. Este mecanismo genera inestabilidad osmótica y muerte celular finalmente. La selectividad está dada, debido a que el ser humano no posee el blanco de acción

de la droga [19, 52].

12.7 Resistencia antifúngica.

En consecuencia que dentro del género *Candida*, la especie *albicans* ha sobresalido en diversos estudios, otras especies como *C. glabrata* y *C. krusei* se han visto poco frecuentes, de tal modo que sus hallazgos se han relacionado con resistencia a la mayor parte de los antifúngicos azólicos y por lo tanto, la presencia de vaginitis de tipo crónico. Como es el caso de *C. krusei* que tiene resistencia azoles de uso cotidiano [37] y *C. glabrata* que resiste a la terapia con fluconazol.

A pesar de que *Candida albicans* ha demostrado sensibilidad a la mayoría de los antifúngicos, que incluye al fluconazol [34], se han encontrado diferencias antigénicas existentes en las manoproteínas de la pared celular de los serotipos A y B de *C. albicans*, con la presencia de determinantes antigénicos 1, 4, 5 y 6 en el primero y con ausencia del epítipo 6 en el segundo [52]. En tanto, aunque se ha encontrado una alta prevalencia del serotipo A en muestras de pacientes con candidiasis superficial [53], recientemente se ha identificado un notorio aumento en el serotipo B [54]. Este último se considera tiene mayor resistencia medicamentos antimicóticos como el fluconazol, 5-fluorocitocina e itraconazol.

13. Otros tipos de candidiasis.

Existen diversas maneras para que *Candida spp* pueda generar infección. Dentro de las causas más comunes, está la candidiasis orofaríngea que afecta principalmente a niños y personas con inmunocompromiso [3], dicha infección procede de la colonización que se produjo al pasar por el canal del parto materno [30]; la candidiasis esofágica se encuentra con frecuencia en pacientes con alto grado de alteración inmunológica, como en pacientes con SIDA; la candidiasis mucocutánea afecta de igual forma a infantes en sus primeros años de vida. En pacientes que cursan un estado crítico de salud, con diversas patologías de fondo que comprometen la barrera inmunitaria, es frecuente encontrar candidiasis desminada que se manifiesta en un amplio repertorio patológico, como meningitis,

miocarditis, nefritis, abscesos profundos, shock séptico con falla multiorgánica múltiple en el peor de los casos [57].

14. Métodos de estudio de *Candida spp.*

Las infecciones ocasionadas por levaduras del género *Candida*, se presentan desde formas leves y superficiales, que involucra piel y tegumentos, hasta infecciones profundas o invasoras. El cuadro clínico que desarrollan los pacientes afectados en un estado crítico, es inespecífico, toda vez que se le confunde con mucha frecuencia con infecciones de tipo bacterianas, deteriorándose con esto, el estado clínico del paciente y retrasando el tratamiento oportuno y específico [56, 58]. Esto conlleva a un pronóstico, muy reservado para la vida del paciente, pues la mortalidad es del 50 al 80%, el cual mejoraría en forma significativa, con estudios rápidos y eficaces, toda vez, que al establecer un tratamiento empírico, generaría además de errores de tratamiento, elevados costos, retraso en la rehabilitación del paciente, así como una resistencia antifúngica [57].

Para la identificación de *Candida spp.*, se han utilizado a través del tiempo diversos métodos, cada uno de ellos con ventajas y desventajas, con mayor o menor grado de especificidad y sensibilidad, pero que en conjunto permiten orientar la terapéutica adecuada.

14.1 Observación microscópica en directo.

Esta técnica sencilla, permite realizar una presunción diagnóstica rápida y económica, pues el tamaño de las levaduras, a diferencia de las bacterias, facilita su visualización directa a bajos aumentos en diversos especímenes sin fijar (Fig. 2). Es accesible en muestras considerablemente líquidas y a veces resulta útil, la aplicación de KOH al 10% o NaOH, cuando existen cantidades abundantes de detritus celulares, debido a que favorece la identificación de las estructuras fúngicas, porque disuelve los diversos elementos celulares y clarifica el campo visual. La presencia de hifas verdaderas y clamidosporas obtenidas en distintos medios como el medio de agar harina de maíz, agar Wolin-Bevis, agar arroz o agar

patata-zanahoria, es característica y de utilidad para la identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* [5, 8, 12].

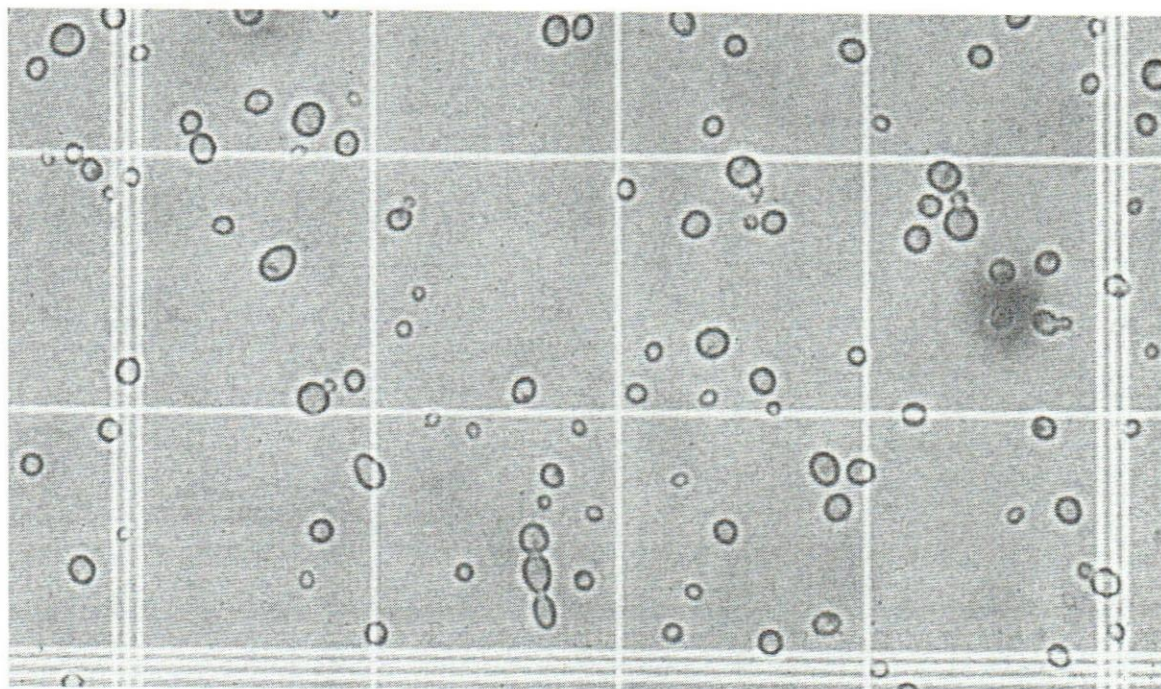


Figura 2. Micrografía a 400X de *C. albicans*. Muestra levaduras, tubos germinativos y artroconidios. Tomada de Paul Fidel Jr *et al.* 1999.

El uso de colorantes en las muestras, como el azul de metileno, o el blanco de calcofluor, permiten delimitar las estructuras micóticas. Este último, tiene afinidad a la quitina, a la cual se une, emitiendo una fluorescencia, definiendo de esta manera los elementos fúngicos. La coloración que se observa en *C. albicans* al utilizar un microscopio de fluorescencia, es verde brillante [10]. Esta técnica es útil para el diagnóstico de candidiasis de mucosas, tegumentos y algunas formas invasoras como la candidiasis meníngea, no obstante, presenta desventajas que la limitan su uso, como el de dar falsos positivos con fibras vegetales, colágeno o elastina; corto tiempo para su estudio y al igual que las muestras directas sin colorantes, su sensibilidad y especificidad son bajas, ya que están directamente relacionadas a la cantidad, calidad y número de microorganismos en las muestras a estudiar, además de la incapacidad de identificación de especie y de realizar pruebas de sensibilidad antifúngica [57, 58].

14.2 Observación microscópica usando tinciones.

Por fortuna, las levaduras se tiñen adecuadamente con la mayoría de los colorantes bacterianos, como la tinción de Gram, Giemsa o ácido periódico de Schiff (PAS), que nos permiten observar con mayor claridad las estructuras de *Candida spp.* Debido a que éste género, trata de un hongo Gram positivo, su identificación es básicamente sencilla en muestras adecuadas. En tinciones histológicas se han utilizado, tinciones como la de Gomori metenamina de plata, hematoxilina-eosina, o PAS, que permiten la observación bien diferenciada. A excepción de la tinción de Gomori metenamina de plata, que es una técnica difícil, reservada solo para laboratorios especializados [59]; el bajo costo, rapidez y sencillez de las tinciones, admiten tomar decisiones oportunas [10] en algunos casos, debido a que el retraso en el diagnóstico implica oportunidades perdidas de tratamiento y presentación de complicaciones [60]. Además, tienen la desventaja de dar falsos positivos o negativos, no siempre es oportuna la toma de biopsias, así como la sensibilidad que ofrecen es variable, debido a que la experiencia del microscopista es crucial para la interpretación acertada [62].

14.3 Prueba del tubo germinal o filamentación precoz.

Trata de una prueba sencilla, económica y rápida, para la identificación de las especies de *albicans* y *dubliniensis*, mediante el uso de sustratos como el suero humano o de animales. Las estructuras observadas al microscopio, se identifican como una extensión de la levadura, sin estrechamiento en su unión u origen, con una anchura que llega a la mitad de la célula madre y una longitud, 3 o 4 veces mayor que ésta [62] (Fig. 1). Para poder emitir un reporte negativo, es necesario contar con experiencia previa, debido a que el tubo germinativo, suele confundírsele comúnmente con otras estructuras, como en el caso de *C. tropicalis* que forma pseudohifas precoces de aspecto muy similar a los tubos germinativos, pero con una zona de constricción característica. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que un 5 a 10% de *C. albicans*, no forman tubos germinales [57, 62].

14.4 Medios de cultivo convencionales.

Los cultivos han sido la piedra angular en el aislamiento de agentes causales de diversas enfermedades infecciosas, sin embargo debido a que se requieren más de 48 hrs para la interpretación, no constituye un método diagnóstico rápido en enfermedades infecciosas graves [58]. El hemocultivo, ampliamente utilizado para el aislamiento de microorganismos de regiones habitualmente estériles, no es de gran utilidad en la candidiasis severa, debido a que su sensibilidad es baja y su positividad no ha superado el 50% en pacientes con confirmación posmortem de candidiasis invasora [57, 69]. En contraste, han sido muy útiles en el diagnóstico de enfermedades micóticas superficiales.

Para el aislamiento de especies de *Candida*, se utilizan diversos medios de cultivos convencionales que permiten el crecimiento levaduriforme con facilidad, sin o con la adición de antibióticos, para la inhibición del sobre crecimiento microbiano; entre ellos destacan, el agar chocolate, agar sangre, agar Cled, agar harina-maíz, agar YPD, agar cerebro-corazón y agar glucosado de Sabouraud (SDA) entre otros. Este último es el medio más indicado por excelencia y el mayormente utilizado para el aislamiento de levaduras y otros hongos [61, 62].

La temperatura óptima de crecimiento levaduriforme es a 37°C, durante 48 a 72 hrs, a partir del cual se forman colonias característicamente blanquecinas de 1 a 3 mm de diámetro, opacas o brillantes, de bordes elevados o planas, de aspecto liso, de olor dulzón agradable, de consistencia mantecosa, que cuando envejecen, adquieren una consistencia pastosa. Generalmente no forman micelio aéreo, sin embargo, pueden observarse estructuras aracneiformes en la periferia colonial. Estas características pueden observarse con mínimas diferencias entre cada especie del género *Candida*, de modo que una observación meticulosa, puede llevarnos a la presunción diagnóstica, auxiliado con otros métodos diagnósticos auxiliares [10]. Es necesario tener en cuenta que, pueden existir contaminantes ambientales, como especies del género *Prototheca*, que posterior a una incubación a 28°C, puede formar colonias muy similares a las producidas por *Candida spp*; *Geotrichum*, *Trichosporon* o *Blastochizomices*, pueden formar verdaderos micelios blanquecinos; y *Cryptococcus neoformans*, una levadura capsulada, puede

desarrollar colonias blanquecinas, de aspecto y consistencia mucóide. Debido a lo anterior es necesario ser prudente en las medidas de seguridad al manejar y sembrar las muestras a analizar, así como los medios de cultivo a utilizar [62].

El crecimiento de colonias fúngicas en medios de cultivo diferenciales a través de la variación de las fuentes de carbono, es considerado el método diagnóstico más usado. Este método dispone de ventajas tales como especificidad, en contraste con su grado de sensibilidad de 50%, que demerita en gran parte su carácter preciso. Aunado a esto, esta técnica presenta el problema de requerir un tiempo prolongado de reporte, debido al tiempo que ameritan las levaduras para su desarrollo [63]. Y aunque no es posible diferenciar a la colonización habitual de las especies de *Candida* de una infección, Higashide *et al*, establecieron criterios para lograr este propósito, describiendo a la recuperación menor a 10 colonias en placas de cultivo específicos, como colonización habitual y de 10 a más colonias recuperadas como sinónimo de infección [64].

14.5 Medios de cultivo cromogénicos.

La identificación mediante criterios bioquímicos, basados en sistemas enzimáticos, mediante el uso de sustratos cromogénicos, ha permitido en la última década, el aislamiento e identificación simultánea de especies del género *Candida*, tras incubación a 30-37°C, durante 24 a 48 hrs. Su fundamento está basado en la capacidad de la levadura de hidrolizar sustratos cromogénicos, en presencia de un indicador colorimétrico de la enzima, diferente para cada especie. El medio CHROMagar Candida® (CHROMagar, Microbiology, Francia), descrito por Odds y Bornaerts en 1994, es un ejemplo de ellos, utilizado para diferenciar las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*, con la producción de una coloración colonial para cada especie [65]. En *C. albicans* la β -N-acetilgalactosaminidasa, es la enzima responsable de la reacción en el medio cromógeno, que produce una coloración verde esmeralda [39, 66] (tabla V). Además de la pigmentación desarrollada, es factible observar determinadas características establecidas como consistencia, aspecto y otros datos de interés que permiten una adecuada diferenciación [10]. Los medios cromogénicos tienen

ventaja sobre los fluorogénicos ya que para su visualización no requieren de luz ultravioleta y diferencian entre un mayor número de especies del género, no obstante, el tiempo requerido para el desarrollo colonial con tinte cromogénico le resta utilidad en pacientes que ameritan un diagnóstico en tiempo real [59].

Este medio diagnóstico, tiene una sensibilidad y especificidad para la identificación de *C. albicans* superior al 95 %, y para la identificación de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei* la sensibilidad es del 90.9 % y la especificidad es del 100%.[39, 66, 67].

El medio CandiSelect ® (Bio Rad ®) constituye otro método selectivo que permite la identificación de *C. albicans* y presuntivamente las especies de *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. El diagnóstico se basa en la actividad enzimática de la hexosaminidasa en un sustrato cromógeno contenido en el medio de cultivo, dicha propiedad enzimática, es exclusiva de *C. albicans*, que desarrolla colonias con una coloración rosácea a violeta. La identificación presuntiva de otras especies, se obtiene merced a un segundo sustrato que detecta la actividad enzimática de la fosfatasa, que produce una coloración turquesa en las colonias a diferentes tonalidades y con la ayuda de las características morfológicas de las colonias se logra esta diferencia [67]. Ver tabla VI.

Tabla V. Características de las colonias de *Candida* spp, en CHROMagar Candida.

Especie	Característica de la colonia	Color
<i>C. albicans</i>	Lisas, crecen a 45°C	Verde esmeralda claro
<i>C. dubliniensis</i>	Lisas, no crecen a 45°C	Verde esmeralda oscuro
<i>C. tropicalis</i>	Lisas	Azul oscuro con halo púrpura marrón
<i>C. krusei</i>	Rugosas, de aspecto seco y bordes irregulares	Centro rosa con halo blanco
<i>C. glabrata</i>	Brillantes y cremosas	Violeta morado
<i>C. parapsilosis</i>	Lisas	Rosácea o blanco marfil.

Tabla VI. Características de las colonias de *Candida spp.* en CandiSelect.

Especie	Característica de la colonia	Color
<i>C. albicans</i>	Lisas	Rosa a violeta
<i>C. tropicalis</i>	Lisas, abombadas, mates con coloración homogénea.	Turquesa intensa.
<i>C. glabrata</i>	Lisas, planas, brillantes.	Colonias en "ojo de pez", centro turquesa pálido y periferia blanca.
<i>C. krusei</i>	Rugosas, de aspecto seco y contorno irregular	Azul turquesa.

14.6 Medios de cultivo fluorogénicos.

Los medios fluorogénicos, son medios selectivos y diferenciales utilizados para el aislamiento de especies de *Candida albicans*, como métodos de aislamiento primario. Su metodología se fundamenta en la capacidad de enzimas del hongo para degradar componentes del medio generando una fluorescencia blanquecina por la producción de un metabolito fluorescente; dicha característica puede observarse mediante la exposición con luz ultravioleta a 365 nm. Dentro de los medios comerciales más utilizados se encuentran Fluroplate *Candida* (Merck) que permite identificar a *C. albicans* por actividad de la N-acetil-galactosaminidasa (NAGasa) sobre la 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-galactosaminida; el Agar SDCA-MUAG (Biolife), identifica a *C. albicans*, al actuar sobre la 4-metilumbeliferil-2-acetamida-2-desoxi- β -Dgalactosamina, generando fluorescencia de igual forma [59, 62].

14.7 Identificación mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Para este fin se ha venido utilizando el auxonograma convencional, que aunque es poco utilizado en la actualidad, era útil en la identificación de levaduras, por la particularidad del uso de diversos nutrientes, como hidratos de carbono y compuestos nitrogenados y a partir de la observación del requerimiento nutricional se hacía la identificación. Esta identificación está basada en el cambio de coloración de la colonia en medio utilizado, dicha coloración revela el pH. Trata de un método muy laborioso, por lo que se han elaborado productos comerciales que aplican este conocimiento con una mayor facilidad. Dentro de los métodos

comerciales manuales se pueden citar: el Auxacolor (Bio-Rad), Sistema Uni-Yeast-Tek (Remel), Tween 80, API 20C AUX (bioMérieux), entre otros. Existen otros métodos semiautomáticos y automáticos, cada uno con sus ventajas y desventajas, pero al final de cuentas, el fundamento teórico es el mismo. Este método permite la identificación de un sin número de especies de levaduras, incluyendo *Cryptococcus neoformans* [10, 59, 60].

14.8 Pruebas inmunológicas.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas, diferentes del cultivo, con la intención de mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para obtener un diagnóstico certero. Las principales técnicas abordan el diagnóstico a través de detección de anticuerpos sanguíneos contra *Candida spp* y de antígenos contra componentes fúngicos, así como detección de metabolitos. Estas técnicas de diagnóstico, identifican componentes de la pared celular de *Candida albicans* y otras especies de interés clínico, como residuos del manano, mediante anticuerpos monoclonales [10, 59].

El uso de estos métodos es limitado, debido a que reaccionan en forma cruzada con otros géneros distintos a *Candida*; la sensibilidad que ofrecen es relativamente baja, pues no superan el 40-50% y el 80-90% respectivamente [10]. El diagnóstico basado en la identificación de anticuerpos, mejora su sensibilidad y especificidad con el uso de antígenos recombinantes, debido a que disminuyen las reacciones cruzadas. En contraste, tienen desventajas relacionadas con el factor tiempo, ya que es necesario para generar la respuesta inmune a los antígenos. Además que identifican niveles elevados de anticuerpos anti-*Candida* en pacientes que solo se encuentran colonizados y no infectados como podría conjeturarse con nula o baja respuesta en pacientes con compromiso inmunológico [59].

La identificación de metabolitos y otros componentes fúngicos, aunque son útiles en la identificación de *C. albicans* y otras especies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr*, han caído en la actualidad en desuso debido a que no son aplicables a todos los casos, puesto a su interferencia en patologías precisas y a su baja sensibilidad y especificidad [59].

La prueba de ELISA, no ha demostrado mucha utilidad en el diagnóstico de candidiasis invasora, debido a que su sensibilidad y especificidad son del 88.9% y 82.6% respectivamente según lo descrito por José Pontón [1].

14.9 Métodos moleculares.

Si tomamos en cuenta la particularidad que posee cada una de las especies del género *Candida*, como lo es la resistencia natural o adquirida a ciertos antifúngicos de uso cotidiano, resulta necesario establecer el diagnóstico especie específico [5]. Este diagnóstico debe ser rápido en su interpretación y eficientes para el establecimiento del modelo terapéutico a seguir en pacientes con candidiasis invasora. Considerando también, que los métodos habituales, no cumplen con esta expectativa, es necesario contar con un método diagnóstico que cumpla con las características de alta especificidad, alta sensibilidad y rapidez para que se traduzca en un mejor pronóstico [58, 69].

En las últimas décadas se han utilizado ampliamente, las herramientas moleculares como un recurso valioso, y que han permitido dar una orientación molecular a la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Entre las técnicas más utilizadas está la PCR, que permite la amplificación de secuencias conservadas en todos los hongos, mediante PCR panfúngica, así como con amplificación de secuencias específicas en una sola especie (PCR específica). Es un recurso innovador que puede conjugarse con otras técnicas moleculares como southernblot, electroforesis en campos pulsados, análisis con enzimas de restricción, análisis de fragmentos y secuenciación, entre otras. La PCR, sin duda, ofrece una mayor sensibilidad y rapidez en el diagnóstico oportuno del hongo, por lo que resulta útil en padecimientos invasivos como la candidiasis profunda o candidemia, que no manifiestan signos clínicos característicos que sugieran su presencia [57]. Existen diversos estudios que lo fundamentan. Francisca Colom et al (2004), demostraron en un estudio la utilidad de la PCR en pacientes con episodios de neutropenia y fiebre con sospecha de invasión fúngica, con sensibilidad analítica de 1ufc/ml de sangre, detectándose con dos muestras consecutivas al 100% de los pacientes con candidemia [68]. Giraldo et al (2002),

comparó la utilidad del cultivo y la PCR en el diagnóstico de candidiasis vaginal, concluyendo mayor sensibilidad del método de amplificación genómica en la identificación de la levadura, debido a la capacidad de identificarla en estado de colonización y no solo de infección. En contraste, no encontraron esta capacidad en método de cultivo [69].

Baquero (*op citus*), evaluaron recientemente la utilidad de la PCR en el diagnóstico de candidiasis invasora. En esta aproximación usaron una pareja de primers INT1 (secuencia 5'-AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG-3') e INT2 (secuencia 5'-AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC-3'), generados a partir de la secuencia del intrón del gen caYST1 de *Candida albicans*, con la finalidad de identificar homología en secuencias de diversas especies de *Candida* y otros microorganismos, encontrando en los aislados clínicos de *C. albicans* el amplicón de 310 pb esperado. También se identificaron *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Cryptococcus neoformans* con amplicones de 1200, 1250 y varios amplicones mayores de 1200 pb respectivamente. No se obtuvieron amplificadores en otros microorganismos. Estos resultados indican que los genes que presentaron intrones pudieran ser de utilidad en el diseño de oligonucleótidos cebadores específicos de especie para la identificación mediante PCR de cepas fúngicas. La sensibilidad del método fue bastante aceptable, tanto como amplificar desde 5.4 pg del ADN de *C. albicans*, por lo que considerando estos resultados, el estudio pudiera ser útil en la detección temprana de candidiasis invasora [58].

En el presente estudio se aplicó esta experiencia, para la identificación de *C. albicans* en muestras de exudado vaginal, procedentes de mujeres de 15 a 45 años de edad, que acudan al módulo de toma de Papanicolaou en el Centro de Salud "Tuxtla", en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

15. Descripción demográfica de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez.

Tuxtla Gutiérrez, es la ciudad capital del Estado de Chiapas, ubicada al sureste de México, en la región centro y depresión central de Estado, en latitud Norte 16°45'10", longitud Oeste 93°07'00" y a una altitud de 550 msnm, a una distancia de 1080 km al sur de la ciudad de México. El clima que lo caracteriza es

cálido sub-húmedo con lluvias en verano. Sus colindancias son las siguientes: Al norte con el municipio de San Fernando, Osumacinta y Chiapas de Corzo; al este con el municipio de Chiapa de Corzo; al sur con los municipios de Suchiapa y Ocozocoautla; al oeste con los municipios de Ocozocoautla y Berriozabal [70]. En Tuxtla Gutiérrez existen 84 localidades, siendo 3 de tipo urbana y 81 rurales.

La ciudad cuenta con una población total de 490,455 habitantes (INEGI-2005), de la cual el 52.1% (255,970) lo constituyen las mujeres, y el 28.4% (139,675) las que se encuentran con edades entre 15 y 45 años que representan al universo de estudio.

Aunque según el Consejo Nacional de Población (CONAPO, 2005), el grado de marginación del Estado de Chiapas se encuentra ocupando el 2º lugar Nacional, la ciudad de Tuxtla Gutiérrez está muy lejos de esa condición, pues, como se muestra en la figura 3 se encuentra catalogada como de muy bajo índice de marginación.

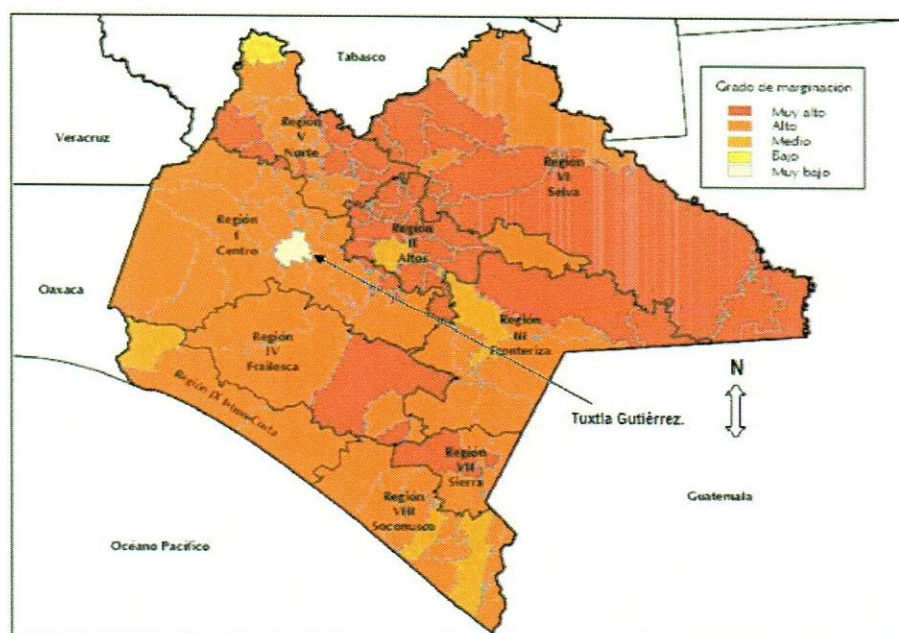


Figura 3, Chiapas: Grado de marginación por municipio. (CONAPO, 2005).

El módulo de toma de citologías vaginales del Centro de Salud Urbano "Tuxtla", el cual está ubicado en la 2ª calle oriente sur No. 1012 de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez brinda atención gratuita a población abierta. La unidad médica consta de 12 consultorios médicos con horarios de atención de las 24 hrs del día de lunes a domingo.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Determinar la prevalencia de las infecciones vaginales causadas por *Candida spp* en mujeres mediante métodos bioquímicos, microbiológicos y con la identificación genético molecular de fragmentos amplificados del gen ribosomal CaYST de *C. albicans* por Reacción en Cadena mediada por Polimerasa a fin de establecer un método de diagnóstico rápido y preciso.

Objetivos particulares.

1. Determinar mediante encuestas aplicadas a mujeres que se les realice toma de muestra de exudado vaginal los factores socioeconómicos, demográficos y clínicos y su correlación con la presencia de la infección por *Candida spp*.
2. Identificar distintas especies de *Candida* obtenidas de aislados vaginales de mujeres de 15 a 45 años de edad que acudan al módulo de toma de citologías vaginales y que residan en Tuxtla Gutiérrez, por medio de métodos genético moleculares.
3. Diferenciar entre las especies de *Candida* obtenidas al nivel de formación de colonias, entre colonización e infección vaginal, mediante la aplicación de los criterios de Higashide.
4. Analizar la prevalencia de las diferentes especies de *Candida* por medio de la comparación de fragmentos obtenidos en electroferogramas a fin de determinar la prevalencia de cada especie.
5. Generar un protocolo confiable y reproducible para la identificación molecular de las diferentes especies de *Candida* por medio de la amplificación del gen CaYST de *C. albicans* comparado con métodos convencionales.

V. HIPÓTESIS.

1. La prevalencia de candidiasis vaginal durante el periodo mayo del 2007 a mayo del 2008, en mujeres de 15 a 45 años de edad de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, es igual comparada con la prevalencia reportada al nivel nacional en el año 2007.
2. La secuencia del intrón procedente de una cadena nucleotídica del gen CaYST1 de *Candida albicans* amplificada por medio de la PCR con la pareja de oligonucleótidos (primers) INT1 e INT2, permite identificar las diferentes especies del género *Candida*.

VI. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.

1. Tipo de Estudio.

El estudio epidemiológico realizado fue de tipo analítico, transversal y correlacional.

2. Área de estudio.

El área de estudio fue la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. La capital del estado de Chiapas tiene una población de 490,455 habitantes, con un 52.1 % de mujeres y el 28% lo constituyen mujeres de 15 a 45 años de edad que integran al universo de estudio. El 96% de las localidades de la ciudad son de tipo rural. El analfabetismo caracteriza al 8% de la población mayor de 15 años.

3. Unidad de muestreo.

El módulo de toma de citologías vaginales del centro de salud urbano "Tuxtla", constituyó la unidad de muestreo con domicilio en la 2ª calle oriente sur oriente No. 1012 de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. El Centro de Salud, consta de 12 consultorios médicos de atención a población abierta, las 24 hrs del día todo el año.

4. Descripción de los sujetos de estudio.

4.1 Población objetivo.

La población objetivo estuvo constituida por mujeres de 15 a 45 años de edad con vida sexual activa, residentes en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

4.2 Población en estudio.

La población de estudio fueron mujeres entre 15 y 45 años de edad que acudieron a realizar citología cervicovaginal en el Centro de Salud "Tuxtla" y que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo de estudio.

5. Periodo de estudio.

El periodo de estudio estuvo comprendido entre los meses de mayo del 2007 y mayo del 2008.

6. Criterios de selección.

Los criterios de selección fueron los siguientes:

- Mujeres sin periodo menstrual, ni sangrado uterino anormal.
- Mujeres con residencia en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez.
- Mujeres libres del uso de antimicrobianos sistémicos o locales tres semanas previas a la fecha de toma de muestra.
- Mujeres libres de ducha vaginal matinal.
- Mujeres con abstinencia sexual de 72 hrs previas a la hora de toma de muestra.
- Mujeres que consintieran participar en el estudio.

7. Criterios de positividad.

El criterio aplicado para considerar a una muestra positiva a la infección por *Candida spp.*, fueron aquellas muestras que presentaron tres características: en primer lugar, las muestras que presentaron crecimiento colonial en medio YPD a partir de una colonia con morfotipo correspondiente a *Candida spp.*, durante el aislamiento primario. En segundo lugar, que las colonias aisladas demostraran células levaduriformes por microscopía óptica. Finalmente, aquellas muestras que presentaron crecimiento en medios cromogénicos con las características colorimétricas correspondientes a cada especie en el aislamiento secundario.

8. Diseño estadístico del proyecto:

8.1 Diseño del muestreo.

El plan de muestreo fue probabilístico bietápico, designándose como conglomerado al Centro de Salud "Tuxtla".

8.2 Tamaño de la muestra.

El tamaño muestral se calculó con un margen de error de estimación del 5% y un nivel de confianza del 95%.

8.3 Unidad muestral.

El módulo de toma de citologías vaginales del Centro de Salud Tuxtla, se estableció como unidad muestral.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Material biológico.

Los aislados clínicos fueron obtenidos de muestras de exudado vaginal tomadas a mujeres de 15 a 45 años de edad con vida sexual activa que acudieron al módulo de toma de Papanicolaou en el Centro de Salud "Tuxtla". Las cepas denominadas como de referencia de especies de *Candida* utilizadas, fueron donadas gentilmente por el Dr. Cesar Hernández de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de Instituto Politécnico Nacional. Ver tabla VII.

2. Toma de la muestra.

El procedimiento utilizado para la toma de muestra estuvo dividido en tres tiempos. Inicialmente se informó a cada mujer que acudía al módulo de citologías vaginales y que cumplía con los criterios de inclusión, sobre el objetivo del estudio y generalidades de la infección candidiásica, con el fin de obtener su consentimiento escrito en un formato prediseñado. Posteriormente se realizó una encuesta que contenía una lista fija de preguntas cerradas, en una secuencia estandarizada y respuestas precategorizadas. Las variables que se evaluaron fueron: edad, ocupación, nivel socioeconómico, enfermedades concomitantes, número de parejas sexuales en el transcurso de su vida, uso previo de antimicóticos, antimicrobianos u hormonales, gestación, síntomas clínicos presentes como lo son: prurito vaginal, ardor, y leucorrea. Así como las características del flujo vaginal observado, como consistencia, color, olor, entre otras que se apreciaran durante el procedimiento.

El tercer tiempo correspondió a la toma de muestras de acuerdo a lo descrito por Giraldo y Llovera *et al* (2000/2004) con modificaciones. Un hisopo estéril se insertó en la mucosa de la pared posterior y laterales de la vagina en forma rotatoria durante 10 segundos, evitando todo contacto con el área genital externa. En seguida la muestra obtenida se inoculó en medio YPD con 0.05% de cloramfenicol. Posteriormente la misma muestra se suspendió 0.5 mL de solución salina al 0.9% [70]. Una segunda toma de muestra se utilizó para hacer un frotis en

directo y con éste aplicar la prueba de Gram.

3. Transporte de las muestras.

Las muestras se transportaron en un termo a 37°C para su análisis en el laboratorio, en un plazo no mayor a 1 hora.

4. Métodos convencionales.

4.1 pH vaginal.

La medición del pH vaginal se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Fernández (2004), mediante el uso de tiras reactivas.

4.2 Prueba de aminas (Prueba de Whiff).

La prueba de Whiff se realizó a las muestras tomadas agregando 2 gotas de KOH al 10% en la rama del espéculo. La liberación de un olor característico a “pescado” en forma inmediata, fue calificada como un resultado positivo a esta prueba [10, 49].

4.3 Prueba selectiva rápida de la ureasa.

La prueba de la ureasa se llevó a cabo mediante lo descrito por Sambrok *et al*, 1989 con modificaciones. Los aislados clínicos obtenidos (ver más adelante), se incubaron en 0.5 mL de caldo urea de Christensen, durante 48 hrs a 37°C. Un cambio de coloración del medio, de rojo a púrpura se tomó como positivo a la prueba [72].

4.4 Prueba de producción de tubo germinal.

El método para determinar si los aislados clínicos eran capaces de emitir un tubo germinal fue mediante la siembra de la muestra en 0.5 ml de suero humano incubado en estufa a 37°C durante 2 a 3 horas. Posterior a este tratamiento se observó en directo con un microscopio Carl Zeiss modelo Axiolab Pirámide.

Tabla VII. Características de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Especie	Procedencia	Fuente
CAL1	<i>C. albicans</i>	Vagina	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CTR34	<i>C. tropicalis</i>	Expectoración	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CLU12	<i>C. lusitane</i>	Boca	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CGU1	<i>C. guilliermondii</i>	Orina	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CPA4	<i>C. parapsilosis</i>	Boca	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CKE2	<i>C. kefyr</i>	Boca	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CGL51	<i>C. glabrata</i>	Boca	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CRU1	<i>C. rugosa</i>	Boca	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CPE1	<i>C. peliculosa</i>	Boca	(Cesar Hernández <i>et al.</i> 2007)
CaTX1	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX2	<i>C. parapsilosis</i>	Vagina	Este estudio
CaTX3	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX4	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX5	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX6	<i>C. krusei</i>	Vagina	Este estudio
CaTX7	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX8	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX9	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX10	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX11	<i>C. krusei</i>	Vagina	Este estudio
CaTX12	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX13	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX14	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX15	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX16	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX17	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX18	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX19	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX20	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX21	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX22	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX23	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX24	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX25	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX26	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX27	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX28	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX29	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX30	<i>C. albicans</i>	Vagina	Este estudio
CaTX31	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX32	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX33	<i>C. parapsilosis</i>	Vagina	Este estudio
CaTX34	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio
CaTX35	<i>C. glabrata</i>	Vagina	Este estudio

4.5 Examen por microscopía directa.

La visualización directa se llevó a cabo mediante la observación al microscopio de la muestra de exudado vaginal en solución salina [10] y de los frotis teñidos con técnica de Gram, con un microscopio Carl Zeiss modelo Axiolab Pirámide.

4.6 Tinción de Gram.

La prueba de Gram se llevó a cabo mediante lo descrito por Castro y Martin (2000) sin modificaciones.

4.7 Aislamiento primario de *Candida spp* en medio YPD.

El aislamiento primario consistió en la siembra directa de la muestra en medio YPD con 0.05% de cloramfenicol. El tiempo de incubación fue de 72 hrs a 37°C. Se hizo el recuento de colonias aisladas para la aplicación de los criterios de Higashide, así como la descripción de la morfología colonial macroscópica [10, 63].

4.8 Identificación morfológica en medios cromogénicos.

Las cepas obtenidas en cultivos puros fueron sembradas en medio de cultivo de CHROMagar *Candida*® y *CandiSelect*®, para la identificación de especies clínicamente significativas de *Candida* según las indicaciones del fabricante. La incubación se llevó a 37-38 °C, durante 48 hrs. Las colonias de las diversas especies de *Candida* fueron identificadas de acuerdo a la coloración expresada y a la morfología macroscópica [10, 66, 67, 70]. Ver tabla V y VI.

Para diferenciar entre las especies de *C. albicans* y *dubliniensis*, las colonias se crecieron a 42°C por 48 hrs. El crecimiento a esta temperatura fue confirmatoria de la especie *albicans* [66, 70].

5. Métodos moleculares.

5.1 Extracción de ADN en especies de *Candida*.

La extracción de ADN de *Candida spp.*, se llevó a cabo mediante kit de extracción Aqua Pure (Bio Rad®), con modificaciones.

Los aislados clínicos se cultivaron en 3 ml de medio YPD con una temperatura de 28-32 °C durante 16 h con agitación a 250 rpm. Este cultivo se transfirió a un tubo Eppendorf® de 1.5 ml y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min para obtener la pastilla. Se agregó 300 µl de solución de lisis (kit de Aquapure de Bio Rad ®) a las células y se resuspendió varias veces para lograr la lisis celular.

El lisado celular se sometió a tratamiento con RNAsa (Ver más adelante). Posterior al tratamiento con ribonucleasas se llevó a cabo la precipitación proteica (kit de Aquapure de Bio Rad ®). Al lisado celular se le agregó 100 µl de solución de precipitación proteica, vortexeando en forma vigorosa durante 20 segundos a alta velocidad para mezclar la solución en forma uniforme. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante que contenía el ADN y se transfirió a un tubo Eppendorf ® que contenía 300 µl de isopropanol al 100%, mezclándolos por inversión en forma cuidadosa por 50 veces. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. Luego se desechó el sobrenadante y se agregó 300 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto, desechando el sobrenadante y secando invirtiendo los tubos sobre una toalla absorbente. Una vez seco se resuspendió en 30 µl de TE (Tris-HCl 10 mM de pH 7.5 con EDTA 1 mM).

5.1.1 Tratamiento con RNAsa.

El tratamiento con RNAsa consistió en agregar 1.5 µl de solución de RNAsa A (4mg/mL) al lisado celular para su posterior homogenizado. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 5 minutos.

5.2 Diseño de oligonucleótidos

En el estudio se utilizaron los oligonucleótidos INT1 (secuencia 5'-AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG-3') e INT2 (secuencia 5'-AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC- 3'), derivados de una secuencia del gen CaYST1 de *C. albicans*.

5.3 Ensayo de PCR.

El ensayo de PCR fue realizado de acuerdo a lo descrito por Sambrook *et al*, 1989 [73] modificado. La mezcla de reacción consistió en 500 ng de ADN problema, 1 U de polimerasa TaqKara (TaqKara Bio USA ®), 0.3 mM de cada primers (INT1 e INT2), 0.2 mM de dNTP's Mix (Promega ®), 2 μ l de 10X EX buffer de reacción (TaqKara Bio USA ®) en un volumen final de 20 μ l.

El ensayo de PCR se llevó a cabo aplicando un gradiente de prueba para la amplificación con temperaturas de 60, 62, 64, 66 y 68o en un termociclador marca Cycler Bio Rad ®), usando 1 ciclo a 95°C por 3 minutos, y después 40 ciclos de: 60 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de alineamiento a 55°C, y 45 s de la extensión del primers a 62°C. En el ciclo final se realizó una incubación adicional de 5 minutos a 72°C para asegurar la polimerización completa de los productos remanentes de PCR.

5.4 Electroforesis en gel de agarosa.

El corrimiento electroforético de ADN amplificado se realizó en geles de agarosa al 2% utilizando TAE (Tris-acetato 40 mM, ácido acético glacial, de pH 8 y EDTA 1 mM). Cada muestra que se aplicó contenía 7 μ l de ADN muestra y 3 μ l de buffer de carga (bromofenol 0.025%, glicerol 30%). Se aplicó corriente continua a 150 V (10 v/cm), durante 120 min. El estándar de peso molecular utilizado fue 1Kb DNA Ladder Plus (Bio Rad ®). Ver fig. 4.

El revelado de la electroforesis se llevó a cabo sumergiendo el electroforegrama en una solución de bromuro de etidio (10 μ g/mL) durante 15 min, para revelarlo en un transiluminador de luz UV Bio Rad ® con cámara integrada, modelo Gel Doc XR system [58, 63].

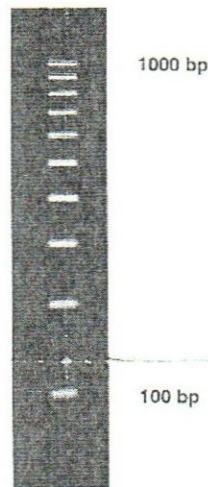


Figura 4. Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Promega ®).

6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado con los programas SPSS versión 15.0 y Epidat versión 3.01. Las pruebas empleadas fueron: Estadísticas descriptivas (medidas de tendencia central, medidas de dispersión), pruebas de independencia mediante tablas de contingencia (2x2) simples con corrección de Yates para variables dicotómicas y MxN en el caso de variables politómicas, Odds ratio (OR), y test de pruebas diagnósticas.

7. Aspectos éticos.

Las actividades realizadas en este estudio contaron con la aprobación del comité de ético-científico de Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Chiapas. Todas las mujeres participantes dieron su consentimiento escrito en un documento prediseñado denominado formato de consentimiento informado, que fue leído a cada mujer antes de iniciar las actividades concernientes al estudio, y lo firmaron o aplicaron huella digital en su defecto.

VII. RESULTADOS.

El planteamiento metodológico para llevar a cabo el estudio epidemiológico molecular consistió en desarrollar tres etapas con propósitos y metodologías definidas.

La primera etapa consistió en la toma de muestra para obtener aislados clínicos con los datos demográficos, socioeconómicos y clínicos de la población estudiada. En la siguiente etapa se caracterizaron los aislados desde dos diferentes metodologías, una caracterización bioquímica y otra molecular. La caracterización bioquímica consistió en obtener aislados clínicos correspondientes a diferentes especies de *Candida*, los cuales fueron posteriormente sometidos a una caracterización molecular. En la última etapa se correlacionaron los datos demográficos, socioeconómicos y clínicos con prevalencia de diferentes especies de *Candida* determinadas a partir de la caracterización obtenida con las metodologías bioquímica y molecular.

1. Población y muestra.

El estudio se llevó a cabo con una muestra de 167 mujeres con edades comprendidas entre 15 y 45 años, durante el periodo mayo 2007 a mayo del 2008 que acudieron al módulo de toma de citologías vaginales del Centro de Salud "Tuxtla" (Secretaría de Salud) de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

La muestra fue analizada a través de los datos registrados en la encuesta para determinar las características demográficas y socioeconómicas. Los resultados que a continuación se presentan corresponden a 167 (100%) mujeres estudiadas en el presente estudio.

1.1 Características demográficas.

Las características demográficas estudiadas de la muestra fueron: edad y residencia. La población presentó características demográficas interesantes. La edad promedio (μ) de las mujeres fue de 32 ± 8 años, con límites de clase inferior y superior de 16 y 42 años respectivamente, y un coeficiente de variación del 26%.

El 26 % (44) de las mujeres encuestadas pertenecían al grupo de 15-24 años de edad, 26% (43) al de 25-34 años y el mayor porcentaje 48.0% (80) tenía entre 35 y 45 años de edad (Fig. 5). En cuanto a la residencia, el 56% (94) de la población habitada en zona urbana mientras que el 44% (73) restante vivía en zonas rurales.

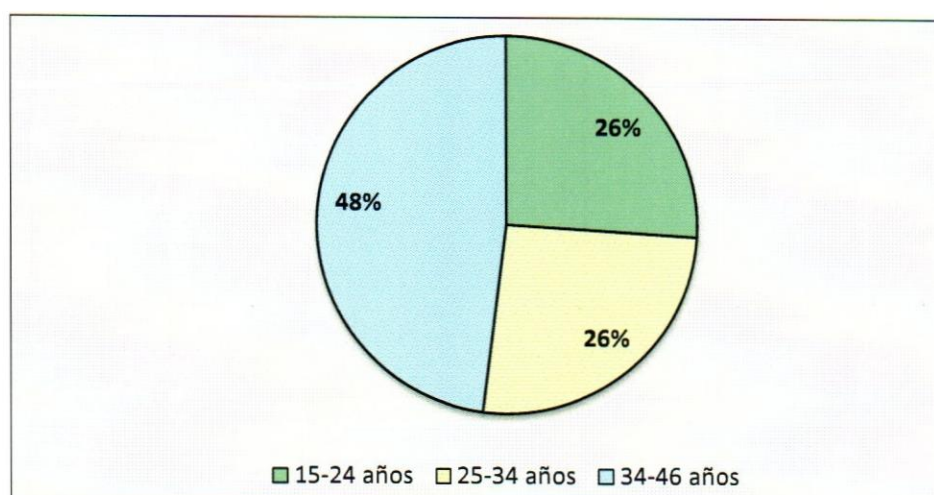


Figura 5. Distribución porcentual de mujeres en grupos de edad. En verde: edad de 15 a 24 años; en amarillo, 25 a 34 años y en azul, 35 a 45 años.

1.2 Características socioeconómicas.

Las características socioeconómicas incluidas fueron: nivel socioeconómico y ocupación.

Los resultados del análisis de las características socioeconómicas indican que la ocupación principal de la población de estudio fueron labores no remuneradas 76% (126), y como actividades con menor frecuencia fueron las actividades remuneradas tales como las ventas con 16% (27); el comercio con 4% (7) y otras actividades 4% (7). Estos resultados son congruentes con el nivel socioeconómico bajo con un el 87% (145) de la población y solamente el 13% (22) afirmó tener un al nivel medio (Tabla VIII).

Tabla VIII. Factores socioeconómicos y demográficos en mujeres estudiadas.

Variable	Clasificación	F n=167	%
Residencia	Urbana	94	56
	Rural	73	44
Nivel socioeconómico	Bajo	145	87
	Medio	22	13
	Alto	-	-
Oficio	Labores no remuneradas	126	76
	Ventas	27	16
	Comerciantes	7	4
	Otras actividades remuneradas	7	4

1.3 Características clínicas.

La caracterización clínica de la población de estudio contempló dos aspectos, el análisis de la actividad sexual que incluye al estado de gravidez y el análisis del estado general de salud y algunos factores relacionados con candidiasis que se han reportado en otros estudios [11, 12, 38].

El estudio de la actividad sexual analizó los hábitos sexuales, el número de parejas sexuales, antecedentes de infecciones de transmisión sexual y el estado de gravidez. Mientras que los factores relacionados con la candidiasis incluyó el estudio de enfermedades concomitantes, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, uso de fármacos (contraceptivos, antimicrobianos y antifúngicos), signos y síntomas previos a la toma de muestra y las alteraciones vaginales encontradas en el estudio de especuloscopia vaginal.

Los resultados del análisis de los hábitos sexuales indicaron que la mayoría de las mujeres tienen una vida sexual activa en un 99% (166). El 69% (115) de las mujeres había tenido una pareja sexual durante su vida, 23% (39) dos, y 8% (13) tres o más parejas. El 4% (6) de la población tenía antecedentes de infecciones de transmisión sexual. El 14% (23) de la población estaba embarazada (Tabla IX).

Tabla IX. Características de los hábitos sexuales.

Variable	Clasificación	F n=167	%
Vida sexual	Activa	166	99
	Pasiva	1	1
Número de parejas sexuales.	Una	115	69
	Dos	39	23
	Tres o más	13	8
Antecedentes de ITS	Si	6	4
	No	161	96
Estado de gravidez	Presente	23	14
	Ausente	144	86

Respecto de la caracterización clínica de los factores relacionados con candidiasis los datos obtenidos indican que el 13% de la población cursaba con alguna enfermedad crónica, de las que destacan, hipertensión arterial sistémica 4% (7), diabetes mellitus 2% (4), enfermedades autoinmunes 1% (1), en tanto el 6% (10) presentaba otras enfermedades. 12% (20) de las mujeres consumía hormonales contraceptivos de uso sistémico. Mientras que solamente el 1% (1) consumía antifúngicos.

El estudio de las alteraciones vaginales incluyó la presencia de signos (leucorrea, eritema cervicovaginal) y síntomas (prurito, ardor y dispareunia). Las principales causas de molestia vaginal en las mujeres fueron la leucorrea 34% (57); prurito 14% (23). Los síntomas presentes en el área vaginal fueron, ardor 5% (8) y dispareunia en el 3% (6). Solamente el 44% (73) estuvieron asintomáticas en el estudio.

El procedimiento de especuloscopia vaginal demostró en contraste con los datos proporcionados por las mujeres, descritos en el párrafo anterior, algunas alteraciones vaginales tales como leucorrea y diferentes tipos de eritema. El 88% (147) de los casos tenía algún tipo de leucorrea, de estos el 8% (13) de los casos presentó el aspecto característico en candidiasis vaginal reportado por otros

autores [30, 31, 44] de tipo blanquecino semisólido y grumoso con aspecto de “queso Cotagge” y el 80% (134) a leucorrea no característica. Finalmente el 12% (20) restante no presentó leucorrea. Adicionalmente, se presentó eritema en el 85% de los casos en alguna de sus formas: en el cuello uterino 50% (84), en la mucosa vaginal 17% (28) y en ambas regiones 16% (26). Del total de las mujeres estudiadas solamente el 2% (3) presentaron en el epitelio vaginal placas blanquecinas adheridas. Ver tabla X.

Tabla X. Caracterización clínica de la población estudiada.

<i>Variables</i>	<i>Clasificación</i>	<i>F</i> n=16 7	<i>%</i>
Uso de medicamentos	contraceptivos	20	12
	Antifúngicos	1	1
	Ninguno	146	87
Signos y síntomas asociados con candidiasis	Leucorrea	57	34
	Prurito vaginal	23	14
	Ardor vaginal	8	5
	Dispareunia	6	3
	Ninguno	73	44
	Leucorrea característica	13	8
	Leucorrea no característica	134	80
	Sin leucorrea	20	12
Alteraciones vaginales encontradas.	Eritema cervical	84	50
	Eritema vaginal	28	17
	Eritema cervical y vaginal	26	16
	Placas blanquecinas adheridas	3	2
	Ninguna alteración	26	15

1.4 Caracterización bioquímica.

El estudio incluyó la caracterización variables bioquímicas tales como pH vaginal, la prueba de aminas (prueba de Whiff) [10, 36, 49] y la prueba de la ureasa [72]. El valor del pH vaginal de la muestra indica que un 43% (72) presentó un pH superior a 4.5 lo que es indicativo de un factor de riesgo por invasión de

microorganismos patógenos [30]. En tanto que la prueba de aminas fue positiva en 43% (72) de los exudados vaginales analizados. La prueba de la ureasa solamente resultó positiva en el 3% (1) de los aislados clínicos (n=35), lo que con posteriores análisis determinó que correspondía a una cepa de *C. krusei* (fig. 6).

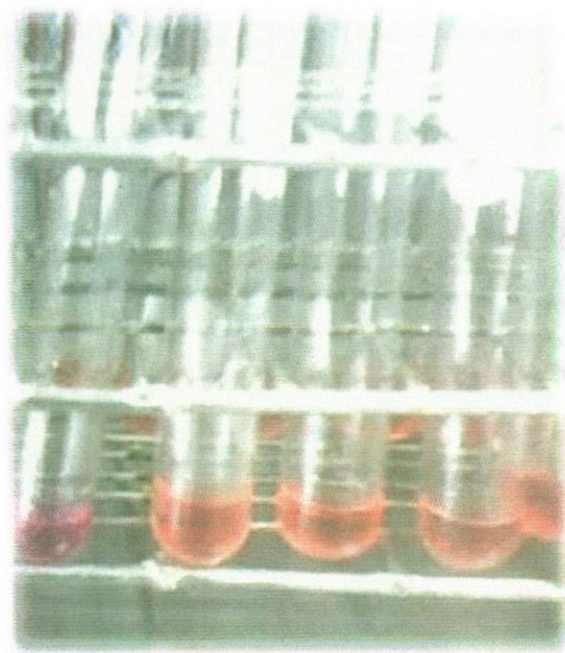


Fig 6. Prueba de la ureasa. La muestra positiva vira a una coloración fúccia como resultado de la hidrólisis de la urea.

1.5 Caracterización microbiológica.

La caracterización microbiológica de las muestras incluyó el análisis inmediato mediante la visualización al microscopio en directo y la tinción de Gram. El análisis del tubo germinativo se realizó a partir de cultivos obtenidos de un aislamiento primario.

La observación microscópica directa de los exudados vaginales reveló la presencia de células levaduriformes en 19% (32) de las muestras, las cuales al teñirse con la técnica de Gram, se identificaron en 27% (46) como Gram positivas. (Fig. 7). Esta última, permitió la identificación de células clave en el 13% (22) de frotis teñidos.

1.6 Aislamiento e identificación de *Candida spp.*

Los exudados vaginales fueron cultivados en medio YPD solido y 35 de los 167 presentaron morfologías coloniales presuntivas de *Candida spp* (fig. 8 y 9). Los tres tipos de morfologías que se consideraron como presuntivas están descritas en la tabla XI. Se utilizaron criterios de positividad tal como se describe en la estrategia metodológica de este estudio. De acuerdo a los criterios utilizados por Higashide para establecer infección al aislamiento de 10 y más colonias en cultivo

primario y colonización cuando son menos de 10, se encontró que el 80% de los aislados clínicos (28, n= 35) desarrollaron más de 10 colonias, que corresponde al 17% de la población de mujeres estudiadas. En la tabla XII se muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en los exudados vaginales y aislados clínicos.

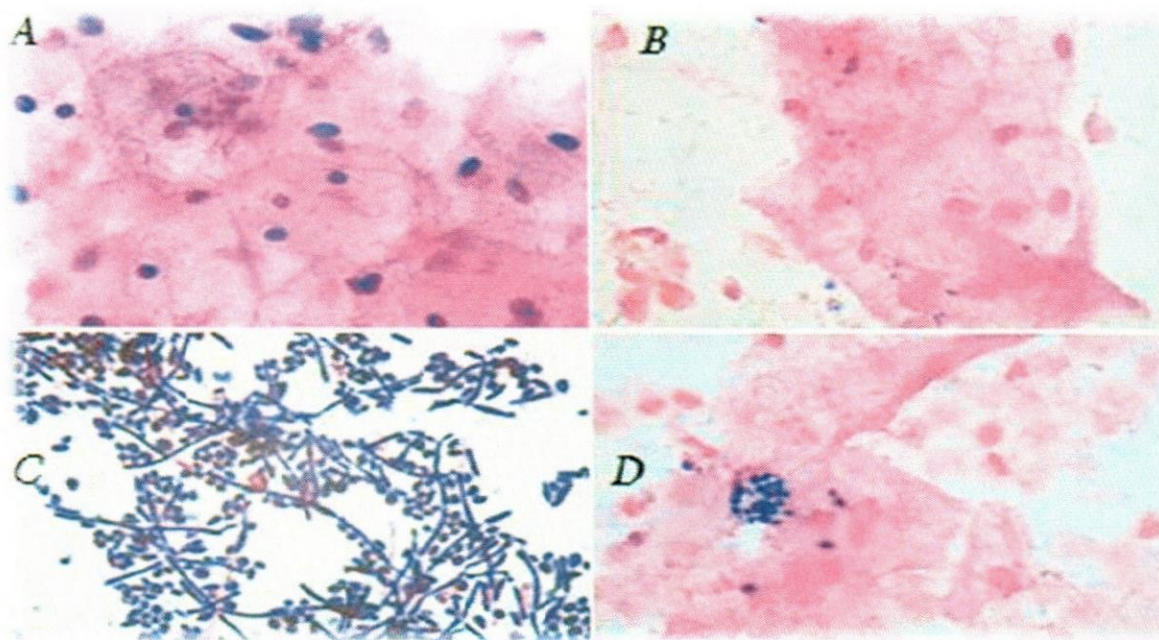


Fig. 7 Tinción de Gram. A, B y D, células levaduriformes adheridas a células del epitelio vaginal. C, levaduras e hifas de un aislado clínico.

Tabla XI. Morfología colonial de cepas de *Candida* spp.

Características morfológicas de las colonias	Tipo	Aislados n=35	%
Circulares, pastosas y blandas con olor característico a levadura de 1 a 3mm de diámetro.	A, B, C	35	100
Lisas, blancas de bordes precisos con centro ligeramente prominente.	A	32	91
Planas, color crema pálida, con bordes irregulares, centro claro y contorno seco, de crecimiento rápido.	B	2	6
Planas, color crema pálida, con bordes irregulares y de superficie plana y lisa.	C	1	3



Figura 8: Morfología colonial de cepas aisladas de *Candida spp.* Tipo A: Cepas No. 1-4, 7-10 y 12-35; tipo B: Cepas No. 6 y 11; tipo C: Cepa No. 5

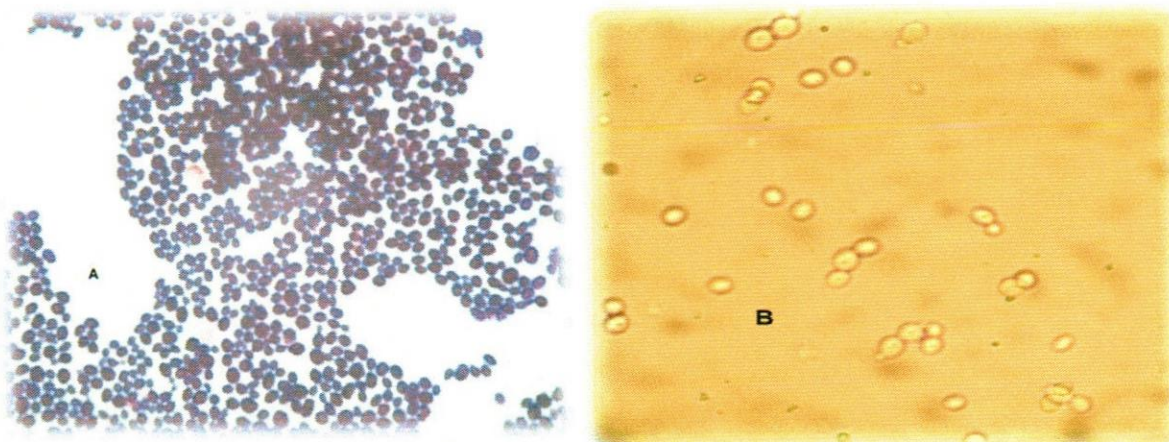


Figura 9: Morfología celular de *Candida spp.* A. Levaduras teñidas con técnica de Gram. B. Levaduras, blastoconidios y células gemantes observadas mediante técnica de visualización directa con uso de KOH 10%.

Tabla XII. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados de *Candida* spp. Tomada de este estudio.

No	pH > 4.5	Aminas	Ureasa.	Exudado en fresco	Gram	Células Guía.	Tipo de Morfología colonial	Microscopía.	Tubo Germinativo	No. de colonias	CHROMagar Candida	CandiSelect
1	No	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
2	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. parapsilosis</i>	No aplica
3	Si	+	-	+	+	-	A	+	+	> 10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4	Si	-	-	-	+	-	A	+	-	1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
5	Si	-	-	+	+	-	C	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
6	Si	+	-	+	+	-	B	+	-	> 10	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
7	Si	+	-	-	+	+	A	+	-	1	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
8	Si	+	-	+	+	+	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
9	Si	+	-	-	-	+	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
10	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	Si	-	+	-	-	-	B	+	-	> 10	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
12	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
13	Si	-	-	-	-	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
14	No	-	-	+	+	+	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
15	No	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
16	Si	-	-	-	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
17	Si	+	-	-	+	-	A	+	+	> 10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
18	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
19	No	-	-	-	-	-	A	+	+	1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
20	No	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
21	Si	+	-	-	+	-	A	+	+	5	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
22	Si	+	-	-	-	-	A	+	+	8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
23	Si	-	-	-	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
24	Si	-	-	-	-	-	A	+	+	> 10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
25	Si	+	-	-	+	-	A	+	+	8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
26	No	-	-	-	-	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
27	No	-	-	+	-	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
28	Si	+	-	-	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
29	Si	-	-	-	+	-	A	+	+	> 10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
30	No	-	-	-	+	-	A	+	+	> 10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
31	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	4	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
32	Si	-	-	-	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
33	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. parapsilosis</i>	No aplica
34	Si	+	-	-	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
35	Si	-	-	+	+	-	A	+	-	> 10	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>

2. Taxonomía de las especies de *Candida*.

La identificación de la especie de los 35 aislados primarios se llevó a cabo mediante el análisis de la morfología colonial desarrollada en dos medios cromogénicos (CandiSelect ® y CHROMagar *Candida* ®). El cultivo de los 35 aislados clínicos en medio CandiSelect permitió la identificación de 3 especies de *Candida* y 4 con el medio CHROMagar *Candida*. Con CandiSelect se identificaron: *C. glabrata* 13% (21), *C. albicans* 6% (10) y *C. krusei* 1% (2) (figura 10); con CHROMagar *Candida* se identificaron: *C. glabrata* 13% (21), *C. albicans* 6% (10) *C. krusei* 1% (2) y *C. parapsilosis* 1% (2) (Figuras 10, 11 y 12). Los aislados de *C. albicans* resistieron a la prueba de termosensibilidad a 42°C para descartar falsos positivos con *C. dubliniensis*. El resumen de la taxonomía de las especies de *Candida* se presenta en la tabla XIII.

Tabla XIII. Especies aisladas del género *Candida*.

Especie	CHROMagar <i>Candida</i>		CandiSelect	
	F n=35	% n=167	F n=35	% n=167
<i>Candida glabrata</i>	21	12.6	21	12.6
<i>Candida albicans</i>	10	6.0	10	6.0
<i>Candida krusei</i>	2	1.2	2	1.2
<i>Candida parapsilosis</i>	2	1.2	-	-
<i>Candida spp.</i>	-	-	2	1.2
Total	35	21.0	35	21.0

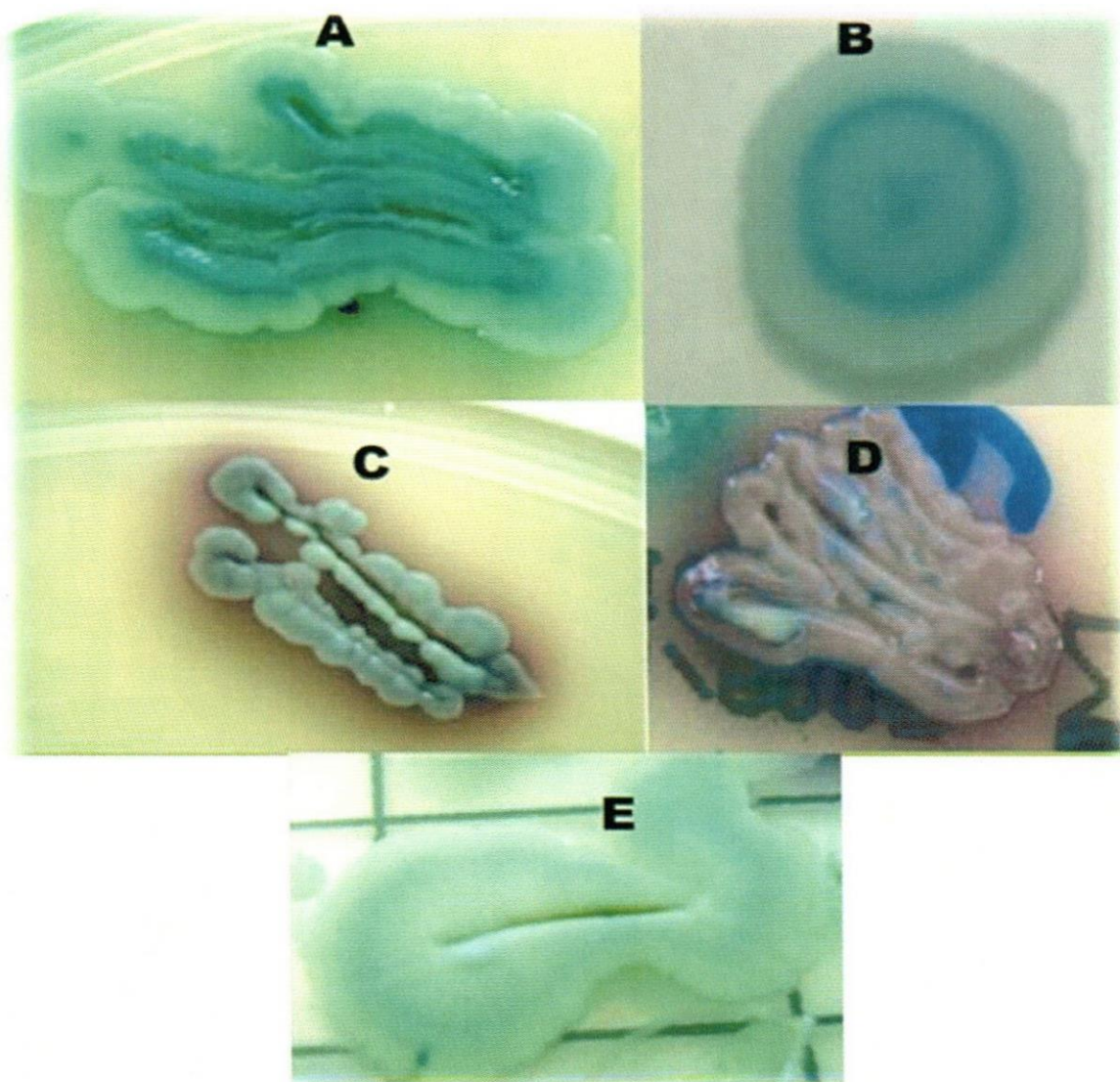


Figura 10. Morfología colonial de especies de *Candida* en CandiSelect. A, cepa de referencia CGL51 (*glabrata*). B, aislado clínico (*C. glabrata*). C, cepa de referencia CAL1 (*C. albicans*). D, aislado clínico (*C. albicans*). E, aislado clínico (*C. krusei*).

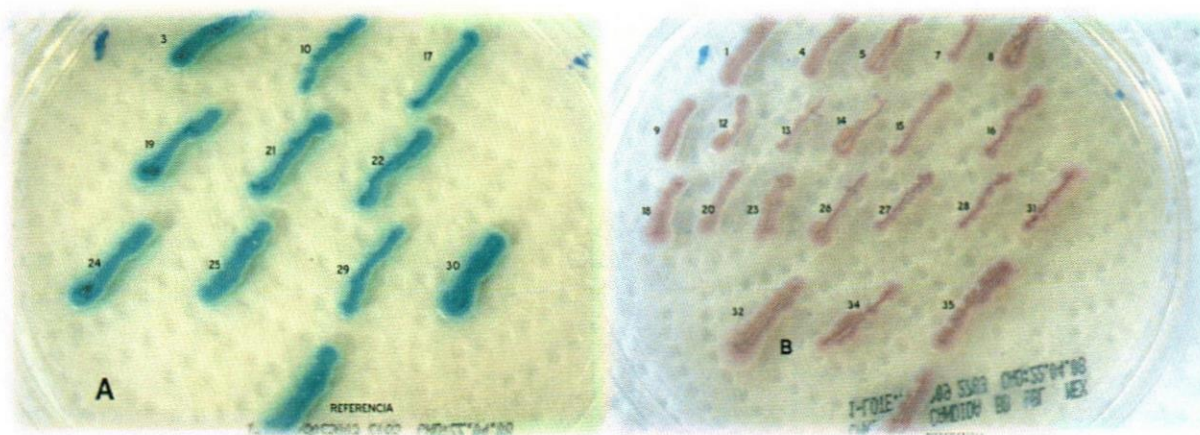


Figura 11 Morfología colonial de las especies de *Candida* en CHROMagar Candida. **A.** Aislados clínicos (*C. albicans*). **B.** aislados clínicos (*C. glabrata*).

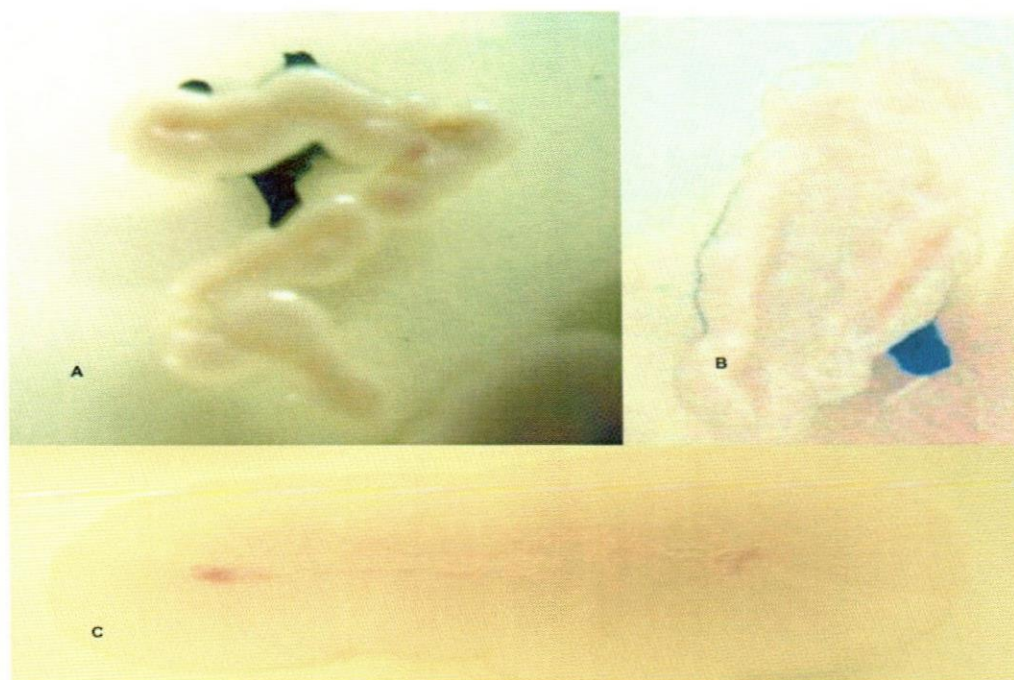


Figura 12. Morfología colonial de las especies de *Candida* en CHROMagar Candida. **A.** Cepa de referencia CPA6 (*C. parapsilosis*). **B.** aislado clínico (*C. parapsilosis*) y **C.** aislado clínico (*C. krusei*).

3. Caracterización de candidiasis vaginal.

Los siguientes resultados corresponden a muestras de exudados vaginales de 35 mujeres que resultaron positivas a la infección por *Candida spp.* A continuación se describen sus características demográficas, socioeconómicas y clínicas, así también, detallan los hallazgos en las pruebas bioquímicas y microbiológicas.

La media de edad de las mujeres con candidiasis vaginal fue de 30 años con desviación estándar (DE) de 8.7, siendo el rango de edad mínimo de 16 y máximo de 45, con un coeficiente de variación del 29%. De acuerdo a la distribución por grupos etarios, el 29% (10) de las vaginitis por *Candida spp.*, fueron identificadas en mujeres con el rango de 15-24 años, 31% (11) entre 25-34 años y el 40% (14) en el rango de 35-45 años de edad como se muestra en la figura 13.

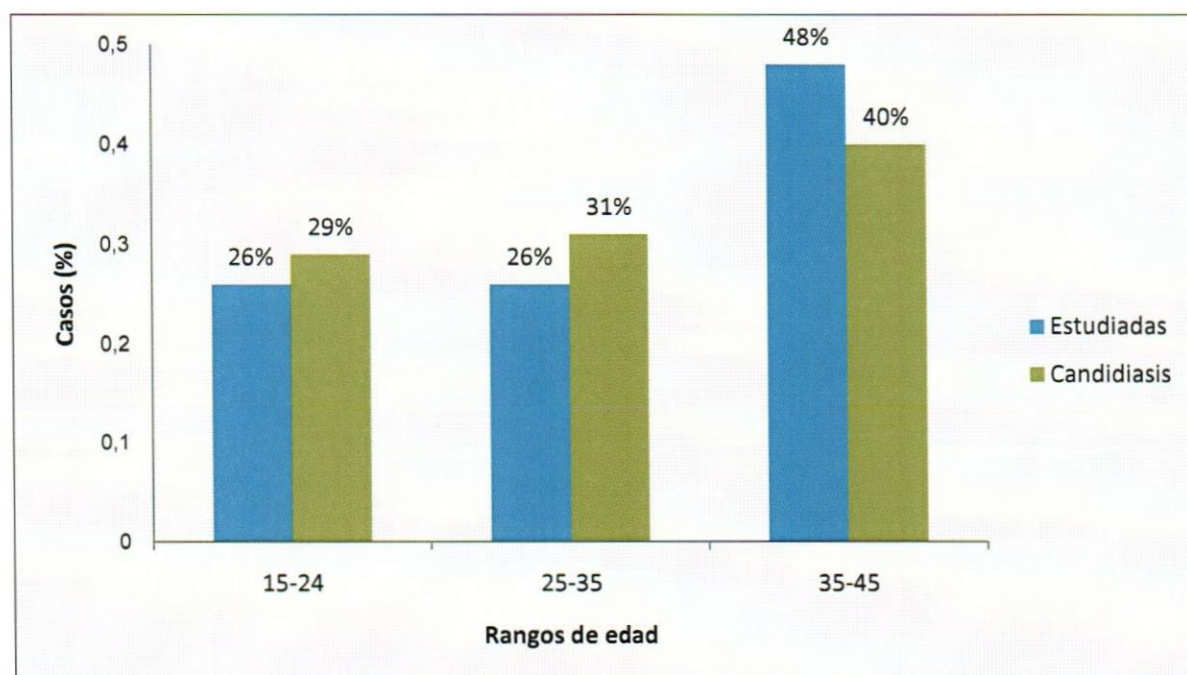


Figura 13 Distribución comparativa de mujeres con candidiasis vaginal vs mujeres estudiadas en grupos etarios. En Azul se muestra la distribución porcentual de mujeres estudiadas, en verde las de mujeres con candidiasis vaginal.

La residencia urbana de las mujeres con candidiasis vaginal caracterizó al 54% (19) y la rural al 46% (16). La principal actividad correspondió a labores no

remuneradas 80% (28), seguida de ventas 14% (5), comercio 3% (1) y otras actividades remuneradas 3% (1) como se muestra en la tabla XIV. El 91% (32) tuvo un nivel socioeconómico bajo y el 9% (3) un nivel socioeconómico medio.

La mayoría de las mujeres (80%, 28) había tenido una pareja durante su vida, 11% (4) dos y el 9% (3) tres o más. El 85% (30) no presentó enfermedades asociadas con la infección vaginal, sin embargo en los casos con enfermedades asociadas con la infección candidiasica fueron: diabetes mellitus 6% (2), enfermedades autoinmunes 3% (1) y otras enfermedades 6% (2). Ver tabla XIV.

En lo que respecta al estado clínico general de las mujeres con candidiasis vaginal, todas tenían vida sexual activa, el 17% (6) de ellas consumía contraceptivos, el resto no hacía uso de medicamento alguno (Tabla XIV). La gravedad estuvo presente en el 23% (8).

Las principales causas de molestia en las mujeres con candidiasis vaginal fueron: leucorrea 34% (12), prurito vaginal 17% (6) y dispareunia 3% (1). Cabe destacar que 46% (16) cursaban con infección asintomática (Figura 16 y tabla XV). No obstante, la especuloscopia vaginal, demostró que el 83% (29) de ellas tenía algún tipo de leucorrea, correspondiendo al de aspecto blanquecino semisólido y grumoso con aspecto de "queso Cottage" que caracteriza a la candidiasis vaginal al 17% (6) de los casos y el 66% (23) a leucorrea no característica. El 17% (6) restante no presentó leucorrea.

El eritema local se presentó en el 84% (29) de los casos de las mujeres con candidiasis vaginal, de ellas las zonas en donde se presentó fue: en el cuello uterino 66% (23), en la mucosa vaginal 9% (3) y en ambas regiones 9% (3). El 3% (1) de las mujeres estudiadas, presentaron placas macroscópicas blanquecinas adheridas a las paredes vaginales. Ver tabla XIV.

Tabla XIV. Características demográficas, socioeconómicas y clínicas de las mujeres con candidiasis.

<i>Variables de estudio.</i>		<i>Mujeres estudiadas n=167</i>		<i>Mujeres con candidiasis n= 35</i>	
		<i>F</i>	<i>%</i>	<i>F</i>	<i>%</i>
Edad en rangos (P=0.5)	15-24	44	26	10	29
	25-34	43	26	11	31
	35-45	80	48	14	40
Residencia (OR, 0.9; IC 95%, 0.4-1.9; p= 0.9)	Urbana	94	56	19	54
	Rural	73	44	16	46
Ocupación (OR, 0.7; IC 95%, 0.4-6.4; p= 0.7)	LNR	126	76	28	80
	Ventas	27	16	5	14
	Comercio	7	4	1	3
	OLNR	7	4	1	3
Nivel socioeconómico (OR, 1.7; IC 95%, 0.4-6.4; p= 0.5)	Bajo	145	87	32	91
	Medio	22	13	3	9
Enfermedades asociadas (OR, 0.7; IC 95%, 0.2-2.2; p= 0.8)	HAS	7	4	0	0
	DM	4	2	2	6
	EI	1	1	1	3
	Otras	16	10	2	6
Vida sexual (OR, 0.7; IC 95%, 0.7-0.8; p= 1)	Activa	166	99	35	100
	Pasiva	1	1	0	0
No. De parejas sexuales (p= 0.1)	Una	115	69	28	80
	Dos	39	23	4	11
	Tres y más	13	8	3	9
Embarazo OR, 2.3; IC 95%, 0.8-6.0; p= 0.1	Presente	23	14	8	23
Antecedentes de ITS OR, 0.7; IC 95%, 0.2-2.2; p= 0.8	Presente	6	4	0	0
Uso de fármacos (OR, 1.6; IC 95%, 0.5-4.5; p= 0.5)	Hormonales	20	12	6	17
Signos y síntomas p= 0.9	Leucorrea	57	34	12	34
	Prurito vaginal	23	14	6	17
	Ardor vaginal	8	5	0	0
	Dispareunia	6	3	1	3
Características del exudado vaginal (OR, 1.1; IC 95%, 0.2-4.4; p= 1.0)	Característica	13	8	6	17
	No característica	134	80	23	66
	Sin Leucorrea	20	12	6	17
Observaciones por especuloscopia (p= 0.9)	Eritema cervical	84	50	23	66
	Eritema vaginal	28	17	3	9
	ECV	26	16	3	9
	PBA	3	2	1	3

LNR= Labores no remuneradas, OLNR= Otras LNR, HAS= Hipertensión arterial sistémica, DM= Diabetes mellitus, EI Enfermedades inmunitarias, ECV= Eritema cervicovaginal, PBA= Placas blanquecinas adheridas.

La tabla XV, muestra el análisis de los datos que se obtuvieron con estudios convencionales en exudados positivos *C. albicans*. El 77% (27) presentó valores del pH superior a 4.5, el 28% (10) resultó con prueba de aminos positivas, 3% (1) de las muestras fueron ureasa positivas (*C. krusei*). Únicamente en el 46% (16) de las muestras positivas a *Candida spp.*, se observaron células levaduriformes por microscopía directa, y al ser teñidas con la técnica de Gram, fueron identificadas en el 77% (27). Esta última técnica permitió la identificación de células clave en el 11% (4) de las muestras positivas a *Candida spp.* El 26% (9) de los aislados primarios que corresponden al 90% (9) de los clasificados como *C. albicans* por pruebas bioquímicas, produjo tubos germinativos que se observaron como estructuras en forma de un tubo que emergía de una célula levaduriforme posterior a su crecimiento en suero humano.

Tabla XV. Resultados comparativos de las pruebas bioquímicas empleadas.

Pruebas	Total de exudados (n=167)		Exudados (+) a <i>Candida spp</i> (n=35)	
	F	%	F	%
pH > 4.5	72	43	27	77
Aminos (+)	72	43	10	28
Ureasa (+)	1	3	1	3
Levaduras en fresco	32	19	16	46
Levaduras Gram (+)	46	27	27	77
Células clave	22	13	4	11
Tubo germinativo	9	15	9	26

4. Caracterización molecular.

En el presente estudio se examinaron 35 muestras de aislados clínicos de *Candida spp.*, mediante PCR para amplificar una secuencia del intrón CaYST1 que procede de *C. albicans*, ampliamente conservada en la especie y necesaria para la maquinaria de traducción nucleotídica. Los oligonucleótidos utilizados fueron INT1 e INT2 que se derivan de dicho intrón (Baquero *et al*, 2004) como se especifica y detalla en material y métodos.

El producto de amplificación del ADN genómico de 10 aislados clínicos

identificados como de *Candida albicans* por medios bioquímicos y microbiológicos, generó bandas de 310 pb en 7 (70%) de ellos. En los 3 (30%) aislados restantes no hubo evidencia de amplificación. La muestra que correspondió a la cepa de referencia de la especie *albicans* presentó un amplicón de 310 pb. Ver figura 14.

Las 21 muestras correspondientes a *C. glabrata* amplificaron en 8 (38%) aislados un patrón de 2 bandas de 100 y 350 pb, 6(29%) con bandas de 100 pb, 4 (19%) aislados con bandas de 350 pb y 3 (14%) de ellos sin producto de amplificación. La cepa de referencia utilizada de esta especie no presentó amplificación.

El producto amplificado de las muestras de 2 aislados clínicos de *C. krusei*, presentó un amplicón de 310 pb en 1 (50%) de ellas y en la otra (50%) no existió producto alguno, al igual que en la cepa de referencia de esta especie.

La amplificación de las muestras de 2 aislados clínicos de *C. parapsilosis*, presentó una longitud del amplicón de 310 pb en 1 (50%) de ellas y en la otra (50%) no se obtuvo producto amplificado. Tampoco se observó producto amplificado en la muestra correspondiente de la cepa de referencia.

En el presente estudio se utilizaron 3 controles negativos para el procedimiento de PCR. En 2 de ellos no se adicionó uno de los dos oligonucleótidos de manera alterna. En la última muestra control se utilizó una cepa de referencia de *C. tropicalis*. En los dos primeros no se obtuvo producto amplificado, pero en la referencia de *C. tropicalis* se obtuvo una banda de 310 pb.

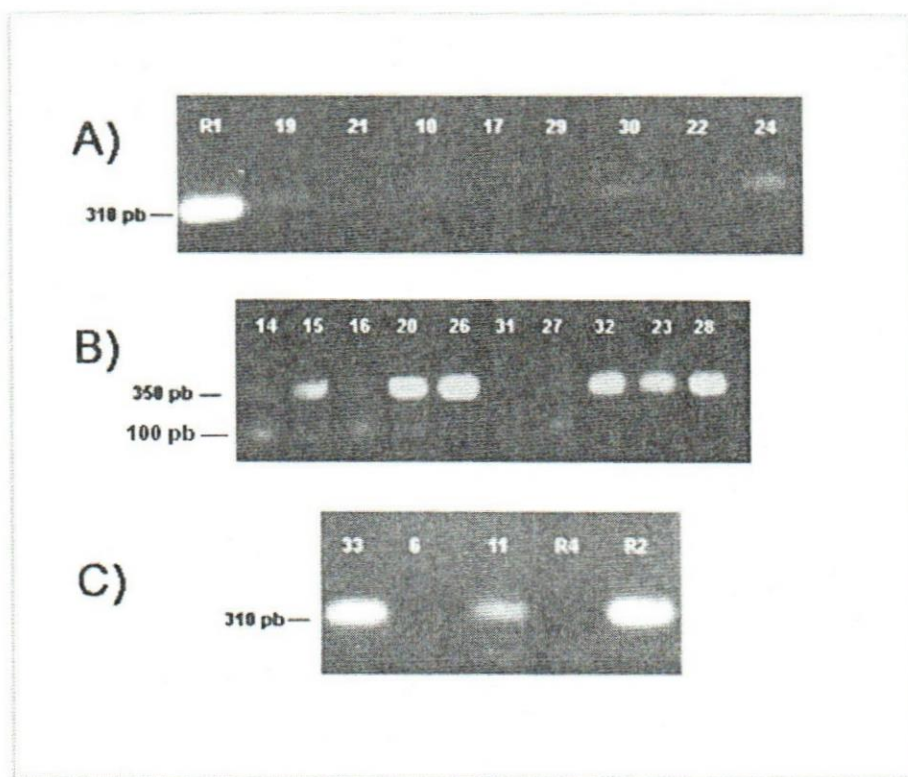


Figura 14. Electroferograma de producto de amplificación de ADN genómico de aislados de *Candida spp.*, teñidos con bromuro de etidio. **A)** R1, cepa de referencia CAL1 (*C. albicans*); 19, 21, 10, 17, 29, 30, 22, 24, aislados clínicos (*C. albicans*). **B)** Aislados clínicos 14, 15, 16, 20, 26, 31, 27, 32, 23 y 28 (*C. glabrata*). **C)**, aislado clínico 33 (*C. parapsilosis*) aislados clínicos 6, 11, (*C. krusei*); R4, cepa de referencia CPA (*C. parapsilosis*); R2, cepa de referencia CTR34 (*C. tropicalis*).

Tabla XVI. Resultados del procedimiento de PCR.

<i>Muestra</i>	<i>Especie</i>	<i>F</i>	<i>Longitud de amplicones (pb)</i>
Aislados clínicos	<i>C. glabrata</i>	4	350
		6	100
		8	100 y 350
		3	SA
	<i>C. albicans</i>	7	310
		3	SA
	<i>C. krusei</i>	1	310
		1	SA
	<i>C. parapsilosis</i>	1	310
		1	SA
Cepas de referencia	<i>C. glabrata</i>	1	SA
	<i>C. albicans</i>	1	310
	<i>C. krusei</i>	1	SA
	<i>C. parapsilosis</i>	1	SA
	<i>C. tropicalis</i>	1	310

SA= Sin amplificación.

5. Manejo estadístico de datos.

5.1 Pruebas de independencia.

Los resultados que se obtuvieron con el análisis de independencia entre las variables demográficas y la candidiasis vaginal se describen a continuación.

El análisis de la relación entre la candidiasis vaginal y los rangos de edad tuvieron un valor χ^2 de $1.21 < \chi^2_{0.05;2}$, $p = 0.54$. En tanto que para la residencia urbana o rural computó un valor de χ^2 de $0.006 < \chi^2_{0.05;1}$, $p = 0.93$; OR de 0.93, IC 95% (0.42-1.90).

El análisis de relación de dependencia con las variables socioeconómicas fueron: entre la ocupación y la candidiasis vaginal con valor de χ^2 igual a $1.74 < \chi^2_{0.05;4}$, $p = 0.78$. El nivel socioeconómico resultó ser $\chi^2 = 0.39 < \chi^2_{0.05;1}$, $p = 0.53$; OR de 1.79, IC 95% (0.49-6.44).

Las variables clínicas, en esta prueba resultaron con $\chi^2 = 0.03 < \chi^2_{0.05;1}$, $p = 0.85$; OR de 0.78, IC 95% (0.27-2.25), para las enfermedades asociadas; $\chi^2 = 0.39$

$\chi^2_{0.05;1}$, $p = 0.52$; OR de 1.61, IC 95% (0.57-4.52), para el uso de medicamentos; $\chi^2 = 0.00 < \chi^2_{0.05;1}$, $p = 1.00$; OR de 0.78, IC 95% (0.72-0.85), para la resultado de para la vida sexual activa; $\chi^2 = 3.52 < \chi^2_{0.05;2}$, $p = 0.17$, para el número de parejas asociadas. El embarazo dio un valor ji cuadrada igual a $2.18 < \chi^2_{0.05;1}$, $p = 0.13$; OR de 2.31, IC 95% (0.89-6.00); las causas de molestia vaginal, un valor de $\chi^2 = 2.59 < \chi^2_{0.05;4}$, $p = 0.62$; las características del exudado vaginal, un valor de $\chi^2 = 0.00 < \chi^2_{0.05;1}$, $p = 1.00$; OR de 1.14, IC 95% (0.29-4.40); las alteraciones vaginales por lo consiguiente computaron un valor $\chi^2 = 5.8 < \chi^2_{0.05;4}$, $p = 0.23$. Ver tabla XVI.

Tabla XVII. Evaluación de variables con tablas de contingencia y razón de probabilidad (Odds ratio).

Variable	Valor χ^2	p	gl	OR	LC (OR) 95%	
					LI	LS
Rangos de edad	1.215	0.545	2	--	--	--
Residencia	0.006*	0.939	1	.90 3	.427	1.90 9
Ocupación	1.745	0.783	4	--	--	--
Nivel socioeconómico	0.390*	0.532	1	1.7 94	0.49 9	6.44 6
Enfermedades asociadas	0.035*	0.85	1	0.7 8	0.27 6	2.25 2
Uso de medicamentos	0.397	0.528	1	1.6 13	0.57 5	4.52 1
Vida sexual activa	0*	1.000	1	0.7 89	0.72 9	0.85 4
Número de parejas sexuales	3.529	0.171	2	--	--	--
Embarazo	2.186*	0.139	1	2.3 11	0.89 0	6.00 4
Causas de molestia vaginal.	2.594	0.628	4	--	--	--
Características del exudado vaginal	0*	1.000	1	1.1 44	0.29 7	4.40 2
Alteraciones vaginales	5.582	0.233	4	--	--	--

*Corrección de continuidad de Yates.

5.2 Análisis de pruebas de diagnóstico.

Los resultados obtenidos con los estudios de diagnóstico bioquímico y de microscopía fueron analizados con el test de pruebas diagnósticas, obteniendo los

datos que se muestran en la tabla XVIII. Es preciso señalar que en este análisis se excluyeron a los medios cromogénicos y a la PCR, debido a que ambos dependieron del aislamiento por cultivo y no directamente con muestras de exudado vaginal.

Tabla XVIII. Resultados del test de pruebas de diagnóstico. Prueba de referencia: Cultivo en medio YPD; Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VP+), Valor Predictivo negativo (VP-), Índice de Youden (IY).

Estudio	S (%)	E(%)	VP+ (%)	VP- (%)	IY
pH vaginal	45.71	57.58	22.22	80.00	0.03
Prueba de aminos	28.57	53.03	13.89	73.68	-8.18
Exudado en fresco	42.86	87.12	46.88	85.19	0.30
Tinción de Gram	62.86	82.58	48.89	89.34	0.45
Tubo germinativo	25.71	100.00	100.00	83.54	0.26
Prueba de la ureasa	2.86	96.97	20.00	79.01	0.00
Exudado vaginal característico	17.14	90.15	31.58	0.92	0.07

VIII. DISCUSIÓN.

En el presente estudio, se determinó la prevalencia de *Candida spp* con base en una muestra de 167 mujeres de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. El análisis consistió en llevar a cabo una caracterización sociodemográfica de las mujeres que participaron en el estudio, así como la caracterización clínica, bioquímica, microbiológica y molecular de los aislados obtenidos a partir de exudados vaginales. Los factores sociodemográficos analizados fueron: edad, lugar de residencia, nivel socioeconómico y ocupación. En la caracterización clínica se incluyó: vida sexual activa, número de parejas sexuales, embarazo, uso de fármacos, signos y síntomas previos y hallazgos encontrados en el estudio de especuloscopia vaginal. La caracterización bioquímica consistió en llevar a cabo las siguientes pruebas: pH vaginal, prueba de aminas y prueba de la ureasa. La caracterización microbiológica fue realizada mediante: la clasificación taxonómica obtenida por análisis de la morfología colonial macro y microscópica, tinción de Gram, formación de tubo germinativo y morfología colonial en medios cromogénicos. La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación de un fragmento de un intrón del gen CaYST1 de *C. albicans* en las muestras clínicas.

La candidiasis vaginal se presentó mayormente en mujeres con rangos de 35 y 45 años de edad. Esto podría relacionarse con la mayor proporción de mujeres incluidas en el estudio dentro de ese rango y que si tomamos en cuenta que la unidad muestral fue el módulo de toma de citologías cervicales donde tienen por misión la identificación oportuna del cáncer cervicouterino que de acuerdo a las estadísticas nacionales su mortalidad empieza a acrecentarse a partir de los 35 años de edad [72], es prudente que la población mayormente consciente de esto sea el de este grupo etario.

El nivel socioeconómico bajo, se relaciona con la actividad no remunerada en las mujeres y esto implica acudir a instituciones de salud dirigidas a población abierta y gratuita como el centro de salud donde se realizó esta investigación. La residencia en área rural presente en casi la mitad de las mujeres estudiadas, podría tener relación en que la ciudad de Tuxtla Gutiérrez está constituida por 81

localidades rurales y 3 urbanas según el CONAPO [80], que permiten a poblaciones con nivel socioeconómico bajo vivir en zonas rurales.

Los factores demográficos, socioeconómicos y clínicos en este estudio, no demostraron relevancia estadística suficiente a un nivel de significancia alfa ($X^2 < X^2_{\alpha; 0.05}$) para asumir su relación con la presencia de la candidiasis vaginal. Aunque otros autores hayan documentado una estrecha interrelación con factores tales como: edad reproductiva, actividades no remuneradas, nivel socioeconómico bajo, antecedentes de ITS, diabetes mellitus no controlada, embarazo, uso de hormonales contraceptivos, pacientes quemados y con inmunosupresión [24, 30, 42, 15]. Sin embargo los resultados de este estudio indican que para poseer el hongo no se requiere necesariamente reunir estas condiciones *a priori*, debido a su hallazgo en mujeres sin las características citadas.

El estudio que analizó el riesgo de adquirir la candidiasis con la presencia o ausencia de las variables estudiadas no representó relevancia estadística alguna (OR con IC 95% poco confiables).

En este estudio fue notable la presencia de alteraciones en el ecosistema vaginal de las mujeres debido a que existe coincidencia exacta de un 43% con positividad a la prueba de aminas y valores del pH vaginal por arriba de 4.5 que según Casanova *et al*, 2007 [30] son indicadores de sustitución de la microbiota vaginal habitual por flora bacteriana anaerobia. Además el 11% (4) de las mujeres con candidiasis, reúne 3 o más criterios que determinan el diagnóstico de vaginosis bacteriana según Amsel [74] (pH > 4.5, aminas positiva, presencia de células guía, leucorrea homogénea), lo que concluye la presencia de infección mixta como lo describen Medina *et al* (1999) y Bucemi *et al* (2004) [49, 75]. Estos cambios en el microambiente vaginal permiten el establecimiento de la vaginitis candidiásica, ya que también suceden cambios bioquímicos, fisiológicos y de la microbiota, tales como el aumento del glucógeno epitelial, pH alcalino, disminución de la flora bacilar y sobrepoblación de anaerobios [30].

La presencia de manifestaciones clínicas como la leucorrea, prurito y ardor vaginal, no necesariamente determinan la candidiasis vaginal, de acuerdo a

los resultados obtenidos en este trabajo ($p > 0.05$), y al elevado porcentaje de infección candidiásica (48%) en mujeres asintomáticas, lo que coincide con lo reportado por Medina *et al* (1999) y Guevara *et al* (2000) [47, 51] donde describen que estos síntomas y un flujo vaginal líquido, blanquecino como el que presentaron algunas mujeres se puede observar en otros tipos de vaginitis como las de tipo bacteriano. Los cambios histológicos asociados a la vaginitis candidiásica en este estudio se relacionan con procesos inflamatorios en el epitelio cervicovaginal que podrían correlacionarse con la capacidad de adherencia e invasividad que tienen *C. albicans* y *C. glabrata*, como lo han descrito Castro (2000) y Fernández (2004) [10, 32]. Las placas blanquecinas adheridas al epitelio vaginal en el 1.8% (3) de las mujeres estudiadas, no fueron estadísticamente relevantes ($p > 0.05$), aunque Torres *et al* (2005) [54] lo refiera como un hallazgo sugestivo de infección por *Candida spp.*

Los indicadores estadísticos utilizados para la evaluación de la eficacia inherente a pruebas habituales de diagnóstico resultaron poco sensibles y específicos para establecer el diagnóstico de candidiasis vaginal en este estudio, como lo han descrito Montiel *et al* (1997), Baquero (*op citus*) y Pontón (2002) [58, 59, 60], y aún más, para distinguir entre especies del género. Por ejemplo, la sensibilidad (S) y especificidad (E) de la medición del pH vaginal son bajas (46 y 58% respectivamente) y aunque su valor predictivo negativo es aceptable (80%) el índice de Youden ($ij = 0.03$) no es significativo lo que concluye que esta prueba solo nos podría servir para descartar la presencia de la enfermedad, pero no para confirmarla. Las técnicas de exudado en fresco y tinción de Gram, tienen una buena especificidad, mala sensibilidad y un aceptable valor predictivo negativo, lo que su uso se limitaría a lo que se describió en el pH vaginal. La prueba del tubo germinativo resultó excelente para discriminar a *C. albicans* de otras especies *no albicans* ($E = 100\%$), por lo que un valor negativo nos da un 83% [10] de seguridad de que la especie analizada tratase de una *no albicans* y una alta probabilidad ($VP = 100\%$) de que un resultado positivo corresponda acertadamente a infección por *C. albicans*. Sin embargo la prueba es deficiente para confirmar las especies *no*

albicans (S= 26%). Respecto a la prueba de la ureasa que resultó con muy buena especificidad (97%), mala sensibilidad (3%) y valor predictivo negativo aceptable (79%), ciertamente se utiliza para discriminar a *Candida spp.*, de *Cryptococcus neoformans*, una levadura que hidroliza la urea, aunque en este estudio un aislado de *C. krusei* fue positivo a esta prueba, porque en efecto, es la única especie de *Candida* que pudiera tener esta capacidad [21].

Las especies identificadas en este trabajo mediante el uso de medios cromogénicos fueron: *C. glabrata* (12.6%), *C. albicans* (6.0%), *C. krusei* (1.2%) y *C. parapsilosis* (1.2%). Estos resultados difieren de los obtenidos por otros estudios, ya que en la mayor parte de ellos se describe a *C. albicans* como la especie que encabeza las estadísticas de infección [2, 5, 51]. No obstante, en este trabajo, la especie con mayor frecuencia fue *C. glabrata*, resultado semejante con lo obtenido por Iglesias *et al*, 2007 [76] y como lo mencionan Paul *et al* (1999), Castaño *et al* (2006) y Torres *et al* (2007) [16, 17, 77]. Según Bucemi *et al.* (2004), esta transición sugiere la asociación con el uso indiscriminado de quimioterapia antifúngica con azoles de uso local y al incremento del fluconazol como uso profiláctico por vía entérica [49], que podría condicionar así mismo la presencia de vaginitis recurrentes [16, 17]. La candidiasis por *C. glabrata*, es coherente con el bajo porcentaje de placas blanquecinas adheridas en la mucosa vaginal encontradas, ya que esta especie carece de propiedades de filamentación. Esta característica llevó a considerar a *C. glabrata* como un hongo de baja virulencia. Pero su producción de proteinasas codificadas por una familia de genes subteloméricos y la hidrofobicidad en la superficie celular que le confieren poder de adherencia comparado con la de *C. albicans* y su asociación con mortalidad elevada y su frecuencia ascendente, han permitido en la actualidad catalogarlo como un patógeno emergente [16, 17]. Aunque *C. glabrata* tiene mayor relación filogenética con *Saccharomyces cerevisiae* que con *C. albicans*, comparte con este último algunas características de virulencia. Ambos tienen alta capacidad de adherencia a las células epiteliales y la formación de biopelículas que les permiten adaptarse a diversas condiciones en el huésped. Además *C. glabrata*, así como tiene la

capacidad de adoptar mayor virulencia por mutaciones de los genes subteloméricos homólogos al gen EPA1, también puede sufrir cambios morfogénicos de adaptación al medio donde crece, generando variación en la coloración de las colonias [77], tal como se observó en los tres tipos de colonias obtenidas en este estudio. En este estudio fue notable la correlación entre la alta prevalencia de la infección por *C. glabrata* y el alto número de mujeres con vaginitis asintomáticas, toda vez que como lo describe Sobel [78], tiende a producir síntomas muy ligeros o nulos en las mujeres que lo albergan en su aparato genital.

Los medios cromogénicos permitieron la adecuada discriminación entre especies del género *Candida*, como lo demuestran los resultados obtenidos en este estudio y que coinciden con lo descrito por Houang *et al* y Yücesoy *et al* (2003) [65, 66].

El estudio molecular ofreció resultados muy interesantes ya que presentan una tendencia particular de la población estudiada. Se obtuvo producto de amplificación en los aislados de *C. glabrata* (amplicones de 100 y 350 pb), *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (amplicones de 310 pb). Sin embargo difiere a los hallazgos obtenidos por Baquero (*op cit*), ya que en ese estudio solo lograron amplificados en *C. albicans* (310 pb), *C. pseudotropicalis* (1200 pb), *Kluyveromyces marxianus* (1250 pb) y *C. neoformans* (más de 1200 pb). Estos resultados concuerdan con las conclusiones de Baquero (*op cit*), en que existe un importante grado de polimorfismo genético en la secuencia del intrón CaYST1. No obstante, sugerimos que esa variabilidad genética ocasiona inconstante conservación en las especies del género *Candida*. Es prudente mencionar que nuestra población forma parte de una mezcla genética de diversos grupos étnicos que podrían condicionar los hallazgos moleculares de este estudio. No obstante hay que hacer notar que en su estudio Baquero (*op cit*), no se presenta la evidencia de pruebas alternas de identificación confirmatoria de las especies no *albicans* utilizadas.

Los resultados obtenidos con las técnicas moleculares concluyen a favor de la hipótesis nula de este estudio, rechazando consigo a la hipótesis alterna

planteada, toda vez que no hay evidencia suficiente a un nivel alfa ($p > 0.05$) para pensar que la secuencia del intrón procedente de una cadena nucleotídica del gen CaYST1 de *Candida albicans* amplificada por medio de la PCR con la pareja de oligonucleótidos INT1 e INT2, permita identificar las diferentes especies del género *Candida*, toda vez que en esta investigación solo fue útil para la identificación del hongo al nivel de género.

La prevalencia de *Candida spp.*, en la población estudiada fue del 21.0%, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Flores *et al*, 2003 [79] y Reyna *et al*, 2004 [45]. Aunque fue más alta si se compara con lo obtenido por Jiménez *et al*, 2004 [2] en otra población de Tuxtla Gutiérrez (15%), quienes utilizaron la prueba del tubo germinativo como único estudio de discriminación de la especie *albicans* de las *no albicans*. Se debe tener en cuenta que esta prueba no identifica al 5-10% de *C. albicans* no formadoras de tubos germinativos. Por otra parte, la prevalencia obtenida en este estudio fue significativamente ($p > 0.05$) superior a la prevalencia reportada durante el 2007 en nuestro país (1%) y estado (1.6%) [80], lo que permite el rechazo de la hipótesis nula planteada en este estudio que dice: “La prevalencia de candidiasis vaginal durante el periodo mayo del 2007 a mayo del 2008, en mujeres de 15 a 45 años de edad de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, es igual comparada con la prevalencia reportada al nivel nacional”, y con esto se concluye con la aceptación de la hipótesis alterna al demostrar que la prevalencia de candidiasis vaginal en mujeres de 15 a 45 años de edad de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, es mayor comparada con la prevalencia reportada al nivel nacional.

Toda vez que esta patología no constituye un padecimiento de reporte epidemiológico obligatorio estricto, como suele suceder en otros países, cabe la posibilidad de que existan subregistros de diagnósticos en documentos que son utilizados como fuentes primarias para el reporte de casos nuevos de enfermedades transmisibles en instituciones públicas del Sistema Nacional de Salud (IMSS, ISSSTE, SSA, PEMEX, etc.) y con ello sesgos en la evaluación estadística. La situación resulta más obvia si se toma en cuenta que contados consultorios de medicina privada hacen un informe periódico a las autoridades

sanitarias de la morbilidad de la población que atienden.

Es posible que la prevalencia nacional de candidiasis vaginal no refleje la situación real de esta patología por desapego a las normas de identificación microbiológica en infecciones vaginales, al no realizar rutinariamente diagnósticos basados en aislamientos primarios en medios de cultivo y pruebas de sensibilidad antifúngica como lo menciona Ritcher *et al*, 2005 y Martínez *et al*, 2007 [81, 83]. En consecuencia, el diagnóstico de la candidiasis vaginal se fundamenta en la sospecha clínica y el tratamiento en el empirismo [8, 81]. Hay que tomar en cuenta que para caracterizar epidemiológicamente a la enfermedad, resulta necesario hacer una identificación correcta y contar con la presencia del agente causal [39], para que de este modo puedan establecerse estrategias para limitar el daño, otorgar un tratamiento eficaz y establecer la prevención oportuna.

Según los criterios de Higashide *et al*, 1984 [64] que distinguen la infección de la colonización vaginal, la prevalencia de infección fue del 16.2% y colonización del 4.8%. Toda vez que no es posible establecer una clasificación basada en el número de colonias aisladas y que la virulencia de una cepa no depende del número de colonias desarrolladas en cultivos primarios, se utilizó la primera aserción de acuerdo a los criterios de este estudio.

IX. CONCLUSIONES.

1. La prevalencia de la candidiasis vaginal fue del 21.0%, según los criterios establecidos en este estudio.
2. Las especies aisladas en este estudio fueron: *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*.
3. La especie aislada con mayor frecuencia como agente causal de las infecciones vaginales correspondió a *C. glabrata*.
4. El diagnóstico de candidiasis vaginal se debe establecer con el aislamiento del agente causal.
5. La identificación de especies de *Candida* se obtiene con éxito con el aislamiento de hongo mediante cultivos convencionales y pruebas bioquímicas, confirmación del género mediante PCR con el uso de los primers INT1 e INT2 y clasificación de especie mediante medios cromogénicos.

X. REFERENCIAS.

1. Pontón J, Palacios A. Avances y limitaciones del diagnóstico precóz de las infecciones invasoras causadas por levaduras. *Rev Iberoam micol* 2007; 24: 181-186.
2. Jiménez TA, Ramírez JA, Guillén K. Prevalencia de candidiasis en mujeres usuarias del Hospital General de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Enferm Infec Microbiol* 2004; 24.
3. Willard-Rippon, J. Micología médica: Infecciones oportunistas, candidiasis y levaduras. Castañeda, Laura. Ed. Mcgraw-Hill-Interamericana, 3a ed. México, D.F: 574-587 (1990).
4. Lansing P, Jhon H, Donaid K. Microbiología. Enfermedades humanas causadas por hongos y protozoos. Gamazo, ed. Mcgraw-Hill-Interamericana. 5a ed. España; 2004.
5. De la Parte M, Brito A. Identificación de levaduras del Género *Candida* provenientes de pacientes con vulvovaginitis. *Academia Biomédica Digital* [online], 1-6. Disponible en: vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=7&n=87 (Febrero 2007)
6. Isselbacher K, Braunwald E. Harrison Principios de Medicina Interna. 13ª Madrid, España: Mcgraw-Hill-Interamericana; 1994.
7. Hernández F, Córdova E, Manzano P. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la ciudad de México. *Salúd Púb Méx* 2007; 45: 455-460.
8. Suarez LI, Perurena MR. Identificación de levaduras de exudados vaginales: Características clínicas asociadas a candidiasis. *Rev Cubana Med Trop* 2004; 56.
9. Diaz S. Caracterización funcional de los genes *ENG1* y *ENG2* de *Candida albicans*. Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Microbiología II, 2001.
10. Castro C, Martín E. Diagnóstico de la Infección fúngica por levaduras del

- Género *Candida*: *C. dubliniensis*. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_mico/pdf/Cdublinien.pdf
11. Skinner CE, Fletcher DW. A Review of Genus *Candida*. Department of Bacteriology and Public Health, Washington State University, Pullman, Washington, and Department of Biology, San Francisco State College, San Francisco, California.
 12. M Cuenca E. Infecciones por *Candida spp*: Infecciones superficiales y profundas 2002. Revisiones y actualizaciones de enfermedades infecciosas. [online], Disponible en: <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista>
 13. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infection of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:255-267.
 14. D-Meeûs T, Renaud F, Mouveroux E. Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and Non-AIDS patients. *J of Clin Microbiol* 2002; 40:2199-2206.
 15. Scott F, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal Infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 499-511.
 16. Torres J, Morera Y, López O. *Candida glabrata*: un patógeno emergente. SEIMC control de calidad. [online] disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_mico/cglabra.htm (Acceso Julio, 2007).
 17. Paul L, Fidel Jr, Vázquez J. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:80-96.
 18. Spinillo A, Capuzzo E, Egbe TO. *Torulopsis glabrata* vaginitis. *Obstet Gyneco* 1995; 85: 993-8.
 19. Thomas Patterson *et al.* *Doctorfungus corporation*, (2006). [online] Disponible en: www.doctorfungus.org (Acceso Julio, 2007).
 20. Alvarez PE. Estudio sobre los mecanismos de construcción de la pared celular de los hongos. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación y

- Estudios Avanzados del Instituto Politécnico, UI. Departamento de Ingeniería Genética, 2003.
21. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification". J of Clin Microbiol 1998; 36:329-334.
 22. Zaugg C, Borg-von M, Utz R. Secred aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. Infection and Immunit 2000; 69:405-412.
 23. Vandeputte P, Larcher G, Bergés T. Mechanism of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrobial agents and Chemotherapy 2005; 49: 4608-4615.
 24. Carrillo AJ, Brió S, Cárdenas CD. Infecciones fúngicas superficiales por levaduras y sertaconazol. Dermatol Peru 2002; 12: 198-210.
 25. Gácsér A, Trofa D, Schäfer W. Targeted gene in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. The J of Clin Inves 2007; 117: 3049-3058.
 26. Carrillo AJ, Tur C. Actualidad dermatológica: Micosis superficiales y *Candida spp.* [online] Disponible en: <http://www.actualidaddermatol.com/art4697.pdf>
 27. Mila L, Arcaya N, Cañas O. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2004; 21:135-138.
 28. Quiroz F. Tratado de Anatomía Humana: El aparato genital de la mujer. 34 th ed. Vol. III. México, D.F: editorial Porrúa, 1996.
 29. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed. Mc Graw-Hill: México,
 30. Casanova G, Reyna J, Ortiz FJ. La ecología vulvovaginal y el papel de los *lactobacillus*, en: Manual para el manejo de las infecciones vulvovaginales. Janssen Cilag. 1ª Ed, México. 2007.
 31. Jones H, Coltons A, Burnett L. Tratado de Ginecología de Novak. 11ª Mc Graw-Hill: México, D.F, 1991.
 32. Fernandez A, Fernández M. El pH vaginal y su importancia clínica.

- Ginecol Obstet Clin 2004; 5:75-80.
33. Francisco M. Flora bacteriana habitual. Boletín de la Escuela de Medicina. Pontífica Universidad Católica de Chile. 23(3) (1997).
34. García M, García S, Copolillo E.F. Prevalencia de la candidiasis vaginal en mujeres. Identificación de levaduras y sensibilidad de los antifúngicos. Rev Argentina Microbiol 2006; 38: 9-12.
35. Mandigan M, Martinko J, Parker J. Brock: Biología de los microorganismos: Relaciones hospedador-parásito en humanos. 10a ed. Pearson educación S.A. Madrid, 2004.
36. Fredricsson B, Englund K. Could bacterial vaginosis be due to the competitive supression of lactobacilli by aerobic microorganisms. *Gynecol Obstet* 1992; 33: 119-123.
37. Díaz Mónica, Oliveros O, Oscar O. Análisis SSCP (ITS2, *ERG11*) de aislamientos clínicos de *Candida spp.*, de cavidad oral en pacientes oncológicos. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 182-186.
38. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-163.
39. Balleste R, Arteta Z, Fernández N. Evaluación del medio cromógeno CHROMagar *Candida* para la identificación de levaduras de interés médico. *Rev Med Uruguay* 2005; 21: 186-193.
40. Azzam M, Cermeño J, Orella G. Vulvovaginitis por *Candida spp.*, y *Trichomonas* en mujeres sexualmente activas. *Ivest Clin* 2002; 43: 03-13.
41. Beigi RH, Meyn LA, Moore DM, Krohn MA, Hillier SL. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. *Obstet* 2004; 104: 926-939.
42. Ziarrusta GB. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 22-24.
43. Fidel-Jr P, Sobel J. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1996; 335-348.
44. Helen M. ABC of sexually transmitted infections: Vaginal discharge,

- causes, diagnosis and treatment. *MBJ* 2004; 328: 1306–1308.
45. Reyna J, Morales V, Ortiz F. Eficacia de un instrumento clinimétrico en el diagnóstico de candidiasis vulvovaginal. *Ginecol Obstet Méx* 2004; 72: 219-226.
46. Rivera R, Flores R, Arriaga M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población Mexicana. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2006; 24; 634-6.
47. Marrazzo J. Concise clinica evidence: vulvovaginal candidiasis. *BMJ* 2002; 325-586.
48. Bucemi L, Arechavala A, Negroni R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis en pacientes del Hospital de enfermedades infecciosas J. Muñiz. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 1277-181.
49. Torres C, Soto A, Sandrea D. Candidiasis vaginal en primigestas. *Rev Obstet Ginecol Venezuela* 2005; 65: 55-58.
50. Guevara J, Bejar V, Cáceres A. Variedades de *Candida* en mujeres con flujo vaginal anormal. *Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Marcos* 2000; 61 (1).
51. Cannon R, Lamping E, Holmes A. *Candida albicans* drugs resistance—another way to cope with stress. *Microbiol* 2007; 153: 3211–3217.
52. Martinez JP, Gil L, López-Ribot J. Serologic response to cell wall Mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 121-141.
53. Martinez ML, Martínez G, Fernandez C. Serotyping of *Candida albicans* isolated from clinical specimens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 61-64.
54. Torres JM, Nicolas MC, Msdrenys N. Distribution of serotypes A and B of *Candida albicans* in 502 strains isolated from Pathological Specimen. *Med Clin* 1991; 97: 1-3.

55. Quindós G, San Millan R, Burgos A. Assessment of the sensitivity to antifungal agents of clinical isolates of *Candida albicans* serotype A and B by the ATB Fungus method. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 209-212.
56. Guzmán AM. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev Chilena Infec* 2004; 21: 39-47.
57. Baquero C, Montero M, Sentandreu R, Eulogio V. Identification of *Candida albicans* by polimerase chain reaction amplification of CaYST1 gene intrón fragment. *Rev Iberoam micol* 2002; 19:80-83.
58. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam micol*. 19 (2002): 25-29.
59. Montiel F, Guzmán AM. Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas. Boletín de la Escuela de Medicina de la Universidad Católica de Chile. 26(3) (1997).
60. Alvarez E, Rodríguez B, Rosado I. Obtención, caracterización de antígenos y evaluación de la técnica de inmunotransferencia para la detección de candidiasis sistémica. *Rev Cubana Med Trop* 2000; 52.
61. Linares MJ, Solís F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoam de Micol 2001; 11.1-11.18.
62. Ausubel F, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in molecular biology. 4a edición. New York, USA; 1999.
63. Guzmán AM. Microbiología clínica: Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev Chil Infect* 2004; 21: 39-47.
64. Higashide K, Aman R, Yamamuno O. Clinical characteristic correlated with different fungi causing vulvovaginal micosis. *Mycoses* 1984; 31: 213-25.
65. Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. Use for CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *Rev Clinic Pathol* 1997; 50:563-565.

66. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Annals Clin Microbiol and Antimic* 2003; 2:8.
67. CandiSelect TM 4. Bio-RAAd. Gelosa/ Medio de aislamiento selectivo de levaduras, de identificación directa de *Candida albicans* y presuntiva de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*. 63746.
68. Colom F, Jover A, Ferro C. Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. *Rev Iberoam Micol* 2006; 29:26-28.
69. Giraldo P, Nowaskondki A, Gómez F. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet gynecol* 2000; 95: 413-416.
70. INEGI, Cuaderno Estadístico Municipal. Tuxtla Gutierrez, Chiapas (2006). Disponible en: <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem06/estatal/chs/m101/index.htm>
71. Díaz R, Gamazo C, López I. Manual práctico de Microbiología. 3a ed. Barcelona, España. Masson S.A; 1996.
72. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva. Secretaría de Salud de México. Mortalidad por cáncer cervicouterino por entidad federativa 2005. Disponible en: http://www.generoysaludreproductiva.gob.mx/articulo.php?id_rubrique=9&id_article=1094.
73. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 3rd edit. New York, USA; 2001.
74. Navarrete P, Dominguez M, Castro E. Evaluation of Nugent and Amsel criteria for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Rev med Chil* 2000;128:767-771.
75. Medina R, Rechkemmer A, Marco G. Prevalencia de vaginitis y vaginosis bacteriana en pacientes con flujo vaginal anormal en el Hospital Nacional

- Arzobispo Loayza. Rev Med Hered 1999; 10: 144-150.
76. Iglesias J, Saldivar D, Tijerina R. Especies de *Candida* en la consulta ginecológica. Med Univer 2007; 9: 161-5.
77. Castaño I, Cormack B, D-Peñas A. Virulencia del hongo oportunista *glabrata*. Rev Latinoam Microbiol 2006; 48: 66-69.
78. D Sobel J. Candidiasis vulvovaginal. Lancet 2007; 369:1961-71.
79. Flores R, Rivera R, García E, Arriaga M. Etiología de la Infección cervicovaginal en el Hospital Juárez de México. Salud Pública Mex 2003;45 (supl. 5).
80. Dirección General de Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud. Información epidemiológica en línea. Disponible en:> <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/infoinea.html><.
81. Ritcher S, Galask R, Messer S. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis of epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol 2005; 43: 2155-2162.
82. Estimación del CONAPO. III Conteo de población y vivienda 2005. Encuesta Nacional de ocupación y empleo (ENOE) 2005, IV trimestre.
83. Martínez M, Saldaña J, Sánchez MA. Criterios para el diagnóstico de cervicovaginitis aplicados en el primer nivel de atención: correlación con la norma oficial mexicana. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2007; 45: 249-254.

XI. ANEXOS.

1. Glosario de términos.

Amplicón: Es un fragmento de ADN que ha sido sintetizado mediante técnicas amplificación molecular.

Aminas: Compuestos químicos derivados del amoníaco, productos de la biodegradación proteica de flora bacteriana anaerobia.

Anaerobios: Bacterias que no requieren del oxígeno para su supervivencia y que residen en el tracto digestivo bajo.

Área urbana: Se define como área urbana, una región geográfica habitada con una población mayor a 25,000 habitantes (CONAPO).

Área rural: Es una región geográfica habitada con una población mayor a 25,000 habitantes (CONAPO).

Antifúngico: Sustancia química o natural, utilizada para combatir a hongos patógenos.

Células clave: Células del epitelio vaginal con múltiples bacterias adheridas que no permiten diferenciar en forma clara el contorno celular.

Clamidospora: Es una estructura fúngica de resistencia o supervivencia (espora), con una pared celular muy gruesa y forma redonda.

Conidio: Es una espora asexual inmóvil que se forma merced a una hifa o célula conidiogénica.

Dispareunia: Es la sensación dolorosa que se presenta con la actividad sexual.

Espéculo vaginal: Instrumento utilizado en exploraciones vaginales, cuyo objetivo es la separación de las paredes anterior y posterior de la vagina.

Eritema: Es un aumento de la irrigación sanguínea en un área determinada de la piel o mucosas, en respuesta a citoquinas proinflamatorias que ocasionan un tinte rojizo o rubicundo.

Especies no *albicans*: Especies del género *Candida* que no corresponden a la especie *albicans*.

Filamentación: Es la formación de filamentos o tubo germinativo a partir de una levadura.

Hifas: Es una estructura tubular, filamentosa que procede de una célula y que al ramificarse con otros filamentos forman una masa de tejido llamada micelio.

Infecciones de transmisión sexual (ITS): Son infecciones que se adquieren durante el acto sexual no protegido. Las más conocidas son: tricomoniasis, candidiasis, clamidiasis, chancro blando, herpes genital, sífilis, condilomatosis, hepatitis virales y el VIH.

Leucorrea: Término que se atribuye a la secreción vaginal anormal, la cual puede estar acompañada de características como: olor, color, consistencia, cantidad, y que en ocasiones son peculiares en ciertas infecciones vaginales.

Levadura: Organismo que forma parte del reino fungi, unicelular, heterótrofo, asexual y que se reproduce por fisión binaria o gemación.

Medio cromogénico: Es un medio selectivo que permite la identificación de especies bacterianas o fúngicas mediante la producción de un color específico.

Medio selectivo: Es un medio de cultivo que permite el crecimiento de ciertos microorganismos inhibiendo el desarrollo de otros.

Micelio: Es un conjunto de hifas que constituyen la parte vegetativa de un hongo.

Micosis: Denominación que se le da a las infecciones humanas generada por hongos patógenos.

Microbiota: Conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos) que habitan en una región dada con diversos tipos de interacción con el huésped e interespecífica.

Mucosa: Capa de tejido epitelial y conjuntivo subyacente que recubre la pared de órganos que guardan comunicación con el ambiente externo.

Nosocomial: Hace referencia a un ambiente hospitalario.

Oligonucleótido: Secuencia corta de nucleótidos donde parte la ADN polimerasa para la síntesis de una nueva cadena de ADN.

Placa: Mancha o membrana plana adherida a la piel o mucosa.

pH: Determina la acidez de una sustancia en por los iones libres de hidrógeno que contiene.

Polimorfismo: Hace referencia a una población diversa de alelos de un gen.

Prurito vaginal: Es una sensación incómoda y subjetiva percibida como un hormigueo o picor en la vagina que ocasiona la necesidad de rascado.

Pseudohifa: Estructura fúngica caracterizada por la presencia de múltiples levaduras que forman una cadena que simulan una hifa pero que a diferencia de esta, tienen septos que lo articulan y que son factibles de separarlos en unidades mecánicamente.

Signo: Es una manifestación objetiva y corroborable a consecuencia de un proceso patológico (ej. fiebre, sangrado)

Síntoma: Se le llama a una manifestación subjetiva no corroborable, de lo que un sujeto percibe en una enfermedad (ej. dolor, vértigo).

Suero sanguíneo: Líquido intersticial que se obtiene al sedimentar los elementos formes de la sangre.

Vaginitis: Es un término atribuido a un proceso inflamatorio o irritativo al nivel vaginal que se produce en respuesta a una infección.

Vaginosis: Se define al reemplazamiento de la flora bacteriana habitual vaginal (*L. acidophilus*) por anaerobios residentes en la piel y tracto intestinal, sin que su presencia requiera de cambios inflamatorios o defensa celular local.

Intrón: Son fragmentos nucleotídicos de ADN localizados en genes pero sin codificar proteínas y cuya función aún es desconocida.

2. Formato de encuesta.



Encuesta de Factores relacionados en la prevalencia de *Candida spp* en mujeres de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Fecha _____

Folio Núm. _____

I. DATOS GENERALES:

Nombre: _____

Edad: _____

Domicilio: _____

II. FACTORES RELACIONADOS.

1. Ocupación.

() Labores no remuneradas.

() Ventas.

() Comerciante.

() Otras labores remuneradas: _____

2. Nivel socioeconómico.

() Bajo

() Medio

() Alto

3. Enfermedades concomitantes.

() Diabetes mellitus.

() Hipertensión arterial sistémica.

() VIH.

() Enfermedades autoinmunes.

() Infecciones de transmisión sexual previa.

() Otras enfermedades de importancia.

() Ninguna.

4. Vida sexual.

() Activa.

() Pasiva.

5. Número de parejas sexuales.

☐ Una. ☐ Tres o más.

☐ Dos.

6. Uso de medicamentos previos.

☐ Antimicóticos mayor a 3 semanas previas.

☐ Antimicrobianos mayor a 3 semanas previas.

☐ Hormonales.

☐ Ninguno.

7. Gravidez.

☐ Presente

☐ Ausente.

III. DATOS CLINICOS.

1. Síntomas vaginales.

☐ Prurito vaginal

☐ Ardor vaginal.

☐ Leucorrea.

☐ Fetidez.

☐ Ninguno.

2. Características del exudado vaginal.

Cantidad: Leve ☐ Moderada ☐ Abundante ☐

Color: Blanquecino ☐ Amarillento ☐ Verdoso ☐ Transparente ☐ grisáceo ☐

Olor: Aminas ☐ Fétido ☐ Sui generis ☐

Aspecto. Líquido ☐ Cremoso ☐ Grumoso ☐ Queso cottage ☐

3. Hallazgos a la especuloscopia.

☐ Eritema vaginal.

☐ Presencia de placas blanquecinas en paredes vaginales.

☐ Eritema cervical.

☐ Cervix con aspecto de frambuesa.

Observaciones:

3. Formato de consentimiento informado.

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE EXUDADO VAGINAL.

Fecha _____

Folio Núm. _____

Nombre completo de la persona a examinar:

Edad: _____ Domicilio _____

Por medio del presente documento manifiesto mi consentimiento para que se lleven a cabo los siguientes procedimientos:

- ☐ Toma de muestras de exudado vaginal.
- ☐ Toma de muestras para citología cervicovaginal.
- ☐ Medición del pH vaginal mediante tiras reactivas reveladoras.

Y autorizo que los datos que resulten de ellos se utilicen para llevar a cabo un estudio epidemiológico-molecular en mujeres de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas del programa de maestría en Salud Ambiental y Enfermedades Transmisibles de la Universidad Autónoma de Chiapas. Así mismo, hago constar que estoy informada sobre los procedimientos que se llevarán a cabo en mi persona y el presente documento ha sido leído y entendido en su integridad, de manera libre y espontánea.

Firma



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EXTIENDE LA PRESENTE

Concancia

*Al (los) C. Monjaraz-Rodríguez, S.; Vega-Villa, V.M.; Saldaña-Trinidad, S.;
Berrones-Hernández, R.; Álvarez-Gutiérrez, P.E.*

Por su asistencia y valiosa participación en la exposición del trabajo libre:

*Estudio epidemiológico de la prevalencia de Candida spp., en mujeres de la ciudad de
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.*

V CONGRESO INTERNACIONAL **XVI** CONGRESO NACIONAL **DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**
INTERNATIONAL CONGRESS **NATIONAL CONGRESS** **OF BIOCHEMICAL ENGINEERING**
VI JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND BIOMEDICINE SCIENTIFIC MEETING
TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS / MÉXICO
DEL 10 AL 14 DE MARZO DEL 2008

I.B.Q. Miguel Rosales Domínguez
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.

I.B.Q. Raúl Chávez Alvirio
Presidente del Congreso
Vicepresidente del C.M.I.B.Q., A.C.

Dr. Héctor Mayagoitia Domínguez
Presidente Honorario

**SECRETARIA ACADEMICA**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Junio 4, 2009

Oficio No. UPC/SAC/IAI-DPE /097/09

A QUIEN CORRESPONDA

La que suscribe, Dra. Peggy Elizabeth Alvarez Gutiérrez, Profesora de Tiempo Completo de la Universidad Politécnica de Chiapas y directora de la tesis de maestría "Análisis Epidemiológico Molecular de la prevalencia de *Candida spp* en mujeres de la Ciudad de Tuxtla Gutiérrez" presentada por el Med. Sarain Monjarraz Rodríguez, hago constar que junto con los coautores hemos llevado a cabo los trámites para la publicación artículo titulado "A epidemiological-molecular study of prevalence of *Candida spp.* in women of the city of Tuxtla Gutiérrez, Chiapas" al Dr. Luis Benítez Bribiesca, editor en jefe de Archives of Medical Research el pasado mes de mayo del presente. Adjunto a la presente el citado documento y copia de las comunicaciones electrónicas con el grupo editorial Elsevier durante este trámite.

A petición del interesado y para los fines legales que convengan extendiendo la presente constancia a los cuatro días del mes de junio del dos mil nueve.

Atentamente**"Tecnología para el bien común"****Dra. Peggy Elizabeth Alvarez Gutiérrez**
PTC Ingeniería Agroindustrial**Anexo: Artículo**
Comunicaciones electrónicas

Política de Calidad: "En la UPChiapas estamos comprometidos en formar profesionales de la Ingeniería, que se distingan por su competitividad en el ámbito laboral, con valores y principios éticos, comprometidos con el desarrollo sustentable y bienestar del país".

C.c.p. Interesado.
C.c.p. Archivo.

Imprimir mensaje - Windows Live Hotmail

Página 1 de 1

Submission Confirmation

De: Archives of Medical Research (archmedres_editor@terra.com.mx)

Enviado: miércoles, 20 de mayo de 2009 03:52:47 p.m.

Para: peggyalvarez@hotmail.com

Dear Dra. Peggy Elizabeth Alvarez Gutierrez,

Your submission entitled "A Molecular Epidemiological Study of Prevalence of Candida spp. in Women in the City of Tuxtla Gutierrez, Chiapas

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com>

Your username is: peggyalvarez

Your password is: XXXXXXXXXXXX

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Archives of Medical Research

A Molecular Epidemiological Study of Prevalence of *Candida* spp. in Women in the City of Tuxtla Gutierrez, Chiapas.

Sarain Monjaraz-Rodríguez ^a, Víctor M. Vega-Villa ^a, Sergio Saldaña-Trinidad ^b, Beatriz Xoconostle-Cazares ^c, Delfeena Eapen ^b, Peggy E. Alvarez-Gutiérrez ^b.

^a Facultad de Medicina Humana, Universidad Autónoma de Chiapas, México. ^b Cuerpo Académico de Investigación y Desarrollo Agroindustrial, Universidad Politécnica de Chiapas, México. ^c Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Zacatenco, México.

Address for correspondence: Peggy E. Alvarez-Gutiérrez. Universidad Politécnica de Chiapas. Eduardo J Selvas S/N, Col. Magisterial, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 29010. Teléfono y fax: +52 961 6120484, correo electrónico: peggy.alvarez@hotmail.com.

ABSTRACT

Vaginitis caused by *Candida* spp., is a frequent fungal infection and of epidemiological significance. It affects women of childbearing age and is the leading cause of gynecological consultation in which each time non-albicans species are reported. Our main objective was to determine the prevalence of vaginal infections caused by *Candida* spp., among women in Tuxtla Gutierrez region during the period August 2007 to October 2008, by biochemical tests, microbiological assays and molecular tools (PCR). The sample was obtained from vaginal exudates of 167 women of 15 to 45 years residing in Tuxtla Gutierrez. The species identification was obtained by use of chromogenic medium and induction of fungal germ tube formation. The genus identification was done by PCR analysis using oligonucleotides INT1 and INT2 which were designed based on an intron sequence CAYST1 of *Candida albicans*. The prevalence of vaginal candidiasis in the women population studied was 21%. The isolated species were: *C. glabrata* (13%, n = 21), *C. albicans* (6%, n = 10), *C. krusei* (1%, n = 2) and *C. parapsilosis* (1%, n = 2). The symptoms associated with vaginal candidiasis are caused by four different species so, the identification of species in the diagnosis of candidiasis with antifungal susceptibility testing is crucial for effective

treatment. The PCR amplification produced bands of 100-350 bp in different species of *Candida*. Around 43% of the women studied presented were showing changes in vaginal ecology caused by candidiasis. A questionnaire was applied to the population under study to find out its relation with demographic, socioeconomic and clinical factors. According to the results, there is a high prevalence of species of *Candida* species in asymptomatic women.

KEYWORDS

Candida spp., *C. glabrata*, PCR, Prevalence, Vaginal candidiasis.

BACKGROUND.

Vulvovaginitis is one of the major causes for gynecologic consultation in the world. Among them, vaginal candidiasis (VC) is considered as the leading cause of vulvovaginitis in Mexico and Central America [1]. It is estimated that 75% of the women in their reproductive age have presented this infection at least once in their lifetime and 5% presented recurrence [2, 3]. In Mexico in 2007, the Ministry of Health reported prevalence below 1% in women of reproductive age, but other authors have found increased presence of the disease [1, 4]. It is well known that *Candida albicans* is the main agent of vaginal fungal infections [5] and other gynecological disorders [6]. Furthermore, less frequently there have been involved another *Candida* species known as "non-*albicans*", like *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*, among others [7]. However, in recent decades, non-*albicans* species had increased their frequency and thus greater clinical significance [5, 7].

Since not all species of the genus *Candida* share the same antifungal susceptibility pattern, it is necessary to identify the genus and species as well as important clinical information for epidemiological characterization as it provides reliable data to carry out preventive measures and disease control [7].

The objective of this study was to determine the prevalence of *Candida* species in vaginal exudates of women in Tuxtla Gutierrez, Mexico through identification with biochemical and molecular methods. In this study, we used a pair of oligonucleotides (INT1 and INT2), designed by Baquero et al, 2004, which originate from the intron sequence of the gene *CaYST1* of *C. albicans*, widely conserved in the species. [8].

MATERIAL AND METHODS

Methodological design

This study was transversal, analytical and experimental design with a confidence level of 95% and 80% power. The samples were obtained from 167 women who visited the module of vaginal cytology in Health Center "Tuxtla" (Ministry of Health) in the city of Tuxtla Gutierrez, Chiapas; during the period may 2007 to may 2008. The women who accepted to participate in this study were selected under the following criteria: between 15 and 45 years of age, of not under a menstrual period, without having any abnormal uterine bleeding, with residence in the city of Tuxtla Gutierrez, without history of use of antimicrobials or antifungals for three weeks prior to the date of sample collection, without morning douching, and with sexual abstinence for 72 hours; and they responded to a socio-demographic and clinical survey. To determine the prevalence, we were using the operational definition of positivity for *Candida* spp., when there was growth of one or more yeast colonies in YPD medium, which was Gram positive and could grow in the chromogen medium.

Biological material

Clinical isolates of *Candida* spp., were obtained from vaginal exudates of women who comply with criteria for participation. The reference strains used were kindly provided by Dr. César Hernández from ENCB -IPN, Mexico.

Survey and sample collection

Demographic factors included in the survey were: age and residency, socioeconomic variables, such as like occupation and socioeconomic level and clinical variables which were associated with chronic and degenerative diseases, presence or absence of sexual activity, number of sexual partners, use of medications prior to study, pregnancy, signs and symptoms and vaginal abnormalities found in the vaginal speculoscopy.

The obtention of the exudates was using sterile swabs applied to secretions of the bottom of the sac and vaginal walls.

Biochemicals tests

The biochemicals tests included the measurement were, vaginal pH, amines test (whiff test)

using 10% KOH and urease test [9].

Microbiological assays

The tests for the identification of fungal structures were done on direct visualization of samples of vaginal exudate and Gram stain.

Primary isolation of *Candida* spp.

For the primary isolation of samples, the vaginal exudate was used to inoculated YPD medium with 0.05% chloramphenicol. The colonies were identified by their morphological characteristics. Isolates were considered presumptive *Candida* spp, according to the criteria of Ausubel et al [10].

Identification of species

The *Candida* species were identified using chromogenic media CHROMagar Candida ® [11, 12] (CHROMagar, Microbiology, France) and CandiSelect ® (Bio-Rad) with the colorimetric characteristics that define each species of *Candida* by the manufacturer and the test germ tube test by sowing in 0.5 mL of human serum with incubation at 37 °C for 2 to 3 hours.

Extraction of DNA from *Candida* species

DNA extraction of *Candida* spp. was carried out using Aqua Pure extraction kit (Bio Rad). Characteristics of the oligonucleotides.

The INT1 and INT2 oligonucleotides derived from an intron sequence CaYST1 of *C. albicans*, were used in the PCR reactions. They have the following sequences:

INT1: 5'- AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG – 3'

INT2: 5'- AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC- 3'

PCR assay

The PCR assay was done according to Sambrook et al, 2001[13]. The reaction mixture consisted of 500 ng of DNA sample, 1 U polymerase TaqKara (TaqKara Bio USA ®), 0.3 mM of each primer, 0.2 mM dNTP's Mix (Promega ®), 2 (l of 10X EX buffer reaction

(TaqKara Bio USA ®) in a final volume of 20 (l.

The PCR assay was carried out by applying a temperature gradient amplification test of 60, 62, 64, 66 and 68 °C, using 1 cycle at 95 °C for 3 minutes, then 40 cycles of 60 s of denaturation at 94 °C, 30 s alignment to 55 °C, 45 s of the extended first to 62 °C. And in the final cycle with additional 5 minutes of incubation at 72 °C.

Statistical analysis

The statistical tests used in this study were descriptive statistics (measures of central tendency and dispersion), tests of independence through tables contrasted odds ratio (OR) and diagnostic tests.

Ethicals considerations

All women who participated in this study gave their consent after being informed of the nature of the study. The ethics committee of the Autonomous University of Chiapas approved the procedures.

RESULTS

Women aged 35-45 years with low socioeconomic status highlighted in the study.

The population presented interesting demographic profiles. The average age of women was 32 ± 8 years old, with a range of 16 and 42 years and coefficient of variation of 26%. As shown in Table I, 48% (80) percentage of women was between 35 and 45 years old, and 56% (94) lived in urban areas. Most of them were not receiving any remuneration in their job 76% (126), which is consistent with low socioeconomic status that characterized the 87% (145) of the population.

The leucorrhoea and vaginal pruritus were the main causes of vaginal discomfort. Most of the women participated in this survey were sexually active in 99% (166). The 69% (115) had one sexual partner during their lifetime and 23% (39) of them had two. Around 4% (6) of the population had a history of sexually-transmitted infections. The 14% (23) of them were pregnant. 13% (22) of the population had a chronic disease, emphasizing systemic hypertension 4% (7) and diabetes mellitus 2% (4). Among them a 12% (20) used drugs like hormonal contraceptives.

The main causes of vaginal discomfort were the leucorrhea 34% (57), pruritus 14% (23), heat 5% (8) and dyspareunia in 3% (6). It should be noted that 44% (73) were asymptomatic in the study. The vaginal speculscopy showed, in contrast to the data provided by the women described before, that 88% (147) of them had some kind of vaginal discharge, of these only 8% (13) introduced the feature in VC reported by other authors [1, 5] of kind off-white, semisolid and lumpy of "Cottage cheese" appearance and 80% (134) with no characteristic leucorrhea. Additionally, there was erythema in 85% of cases in some form in the cervix 50% (84), the vaginal mucosa in 17% (28) and two regions in 16% (26). Only 2% (3) presented adherent whitish macroscopic plaques in the vaginal epithelium (Table I).

Alterations in vaginal pH and a positive amine test highlights in the women studied.

The value of vaginal pH was greater than 4.5 in 43% (72) of the women studied. While the amine test was positive in 43% (72) of the vaginal exudates analyzed. The urease test was positive in only 3% (1) clinical isolates ($n = 35$).

Biochemical and microbiological tests were little utility in the identification of vaginal candidiasis.

Direct microscopic observation of vaginal exudates ($n = 167$) revealed the presence of yeasts cells in 19% (32) of the samples, which stained with the Gram technique, and were identified in 27% (46) as Gram positive (Fig. 1), and identifying clue cells in 13% (22) stained cytologies. The biochemical analysis and related optical microscopy showed no sensitivity and specificity with clinical relevance (Table II).

There were three types of colony morphology.

The vaginal exudates were grown on YPD solid medium and 35 of the 167 had presumptive colonial morphologies of *Candida spp.*, with some morphological variability that were classified into three types, which are described in Table III.

Candida glabrata was the primary causative agent of vaginal candidiasis.

The culture of 35 clinical isolates in chromogenic media allowed for the identification of four species of *Candida*. With CandiSelect were identified: *C. glabrata* 13% (21), *C. albicans* 6% (10) and *C. krusei* 1% (2), with CHROMagar *Candida* were identified: *C.*

glabrata 13% (21), *C. albicans* 6% (10) *C. krusei* 1% (2) and *C. parapsilosis* 1%. (2) Isolates of *C. albicans* showed resistance to thermosensitivity of 42°C to discard false positives with *C. dubliniensis*.

The utility of oligonucleotides INT1 and INT2 in the identification of the genus *Candida*. Ten out of seven (70%) clinical isolates, which were identified as *Candida albicans* by biochemical and microbiological tests, generated bands of 310 bp in the PCR amplification using genomic DNA of these isolates. In the 3 (30%) remaining isolates, there was no evidence of amplification of 310 bp fragment. The sample that corresponded to the reference strain of the species *albicans* presented an amplicon of 310 bp (Figure 2). Of the 21 samples from *C. glabrata* 8 (38%) amplified in a pattern of 2 bands with 100 and 350 bp, six isolates (29%) bands of 100 bp, four (19%) isolates with bands of 350 bp and three (14%) didn't give an amplification product. The reference strain used in this species did not provide amplification.

The PCR product from samples of 2 clinical isolates of *C. krusei*, presented one (50%) with an amplicon of 310 bp fragment and the other (50%) did not present any product, as in the reference strain of this species.

In the amplification of samples from 2 clinical isolates of *C. parapsilosis*, presented one (50%) with a length of 310 bp amplicon and the other (50%) without having any amplified product, neither amplification was observed in the reference sample of the strain.

In this study, we used three negative controls for PCR analysis. In 2 of them one of the two oligonucleotides was not added alternately and the third sample was used as a control for the reference strain of *C. tropicalis* (CTR34). In the first two reactions, no amplified product was obtained, but in reference to *C. tropicalis* a band of 310 bp was produced.

The low socioeconomic level characterized candidiasis.

The VC was identified in 35 women (21%, n = 167) who had a mean age of 30 ± 8.7 years, range 16-45 years and a coefficient of variation of 29%, the highest proportion (40%, 14) of them were located in the range of 35-45 years. It was found that VC stressed among women living in urban areas, with unpaid work and a low socioeconomic status. Table 1. Regarding the sexual behavior, all of them were sexually active, 80% (28) had one sexual partner and 23% (8) were pregnant. Diabetes mellitus was prevalent in 6% (2) of women with VC, and

17% (6) of them consumed contraceptives. The main causes of vaginal discomfort were leucorrhoea 34% (12) and vaginal pruritus 17% (6). A 46% (16) did not mention any discomfort. However, the vaginal speculoscopy showed that 83% (29) of them had some kind of vaginal discharge, stressing the leucorrhoea not characteristic in 66% (23). Likewise, in 84% (29) of the cases there was presence of local erythema.

The analysis of the data was obtained with conventional studies in exudates, which were positive for *C. albicans*, 77% (27) had pH values above 4.5, 28% (10) resulted in a positive amine test, and 3% (1) of the samples were urease positive. Only in 46% (16) of the samples which were positive for *Candida* spp. yeast cells were observed by direct microscopy, and when stained with the Gram technique, 77% (27) were identified as Gram positive. The latter technique allowed the identification of key cells in 11% (4) of the samples which were positive for *Candida* spp. The 26% (9) of primary isolates corresponding to 90% (9) of those determined as *C. albicans* by biochemical tests, produced germinative tubes. See table 2.

DISCUSSION.

Mostly, VC was detected in women who had some of the following factors: age 35-45 years, low socioeconomic status, with use of hormonal contraceptives, diabetes mellitus and pregnancy status. However, statistical relevance was found insufficient for an alpha level of significance (X^2 0.05) to assume their relationship with the presence of candidiasis.

Moreover, the results of this study indicate that to have an infection, the fungi might not need to comply with these conditions a priori, due to their finding in women without the above characteristics while other authors have documented a close relationship with these factors [1, 6].

The presence of significant alterations in the vaginal ecosystem of women was notable in this study because there is an exact match of 43% with a positive amine test and vaginal pH values above 4.5 according to Casanova et al (2007) are indicative of replacement of the normal vaginal microbiota by anaerobic bacteria [1]. In addition 11% (4) of women with VC, meets 3 or more criteria for the diagnosis of bacterial vaginosis according to Amsel [14] (pH > 4.5, positive amine, the presence of cell contacts, homogeneous vaginal discharge), which concludes the presence of mixed infections as described Medina et al

(1999) and Bucemi et al (2004) [15, 3]. These changes in the vaginal microenvironment allow the establishment of VC, because there occur also biochemical and physiological changes, and of microbiota, such as increased epithelial glycogen, alkaline pH, decreasing of the bacilli flora and overcrowding anaerobic flora [16]. As shown in Table II, the statistical indicators which we used to evaluate the efficiency inherent in conventional diagnostic tests were rather sensitive and specific for establishing the diagnosis of VC in this study, as mentioned in Baquero (op citus) at least for the germ tube test which is excellent for discriminating *C. albicans* from other non-albicans species ($E = 100\%$). Therefore, a negative value gives us 83% confidence in that the species analyzed could be a case of non-*albicans* and a high probability ($VP+ = 100\%$) in that a result with positive value could be infected by *C. albicans*. However, the evidence is inadequate to confirm the non-albicans species ($S = 26\%$).

The presence of clinical symptoms such as vaginal discharge, vaginal pruritus and heat, not necessarily determine the VC, according to the results obtained in this work ($p > 0.05$) and the high rate of infection candidiasis (48%) in asymptomatic women. The latter coincides with observations of Medina et al (1999) in which these symptoms and a whitish vaginal fluid, presented in some women could be seen in other types of vaginitis like in the bacterial type [15]. The histological changes associated with VC in this study are related to inflammatory processes in the cervicovaginal epithelium that may be correlate with the ability of adhesion and invasiveness of *C. albicans* and *C. glabrata*, as described in Castaño et al (2006) [17]. Whitish plaques adherent to the vaginal epithelium in 1.8% (3) of the women studied were not statistically significant ($p > 0.05$), although Torres et al (2005) [18] related it as a finding suggestive of infection with *Candida* spp.

The species identified in this study were: *C. glabrata* (12.6%), *C. albicans* (6.0%), *C. krusei* (1.2%) and *C. parapsilosis* (1.2%). These results differ from those were obtained by other studies, because in most of them described *C. albicans* species as the of the infection statistics [19, 20]. However, in this work, the species most frequently found was *C. glabrata*, with similar results obtained by Iglesias et al, 2007 [21] and as mentioned Paul et al (1999) and Brown et al (2006) [17, 22]. This transition may suggest that an it can be associated with the use of antifungal azoles for local use, empirical and indiscriminate chemotherapy treatment and increased use of fluconazole as prophylaxis for enteric route,

which could probably determine the presence of recurrent vaginitis [17, 23]. VC caused by *C. glabrata* examined in this study, is consistent with the low percentage of white plaques adherent to the vaginal mucosa found, since this species lacks properties of filamentation. This observation led us to consider *C. glabrata* as a fungus of low virulence. However, its production of proteinases encoded by a family of subtelomeric genes and hydrophobicity of the cell surface, which confers adherence property on it, in comparison to *C. albicans*, and its association with high mortality and the increasing frequency, allowed it, at present to be classified it as an emerging pathogen [22, 24]. Although *C. glabrata* has higher phylogenetic relationship with *Saccharomyces cerevisiae* rather than *C. albicans*, it shares some features of virulence with the latter. Both have high capacity for adhesion to epithelial cells and the formation of biofilms that allow them to adapt to different conditions in the host. Besides *C. glabrata*, has the ability to take greater virulence by mutation of subtelomeric genes, homologous to the gene EPA1 [17]. Indeed, it can also undergo morphogenetic changes of adaptation to the environment where it grows, creating variation in the colony appearance when grown in culture media with copper sulfate [25], and that such a situation could arise in other culture media, as was observed in all three types of colonies obtained in this study.

Chromogenic media allowed adequate discrimination between *Candida* species, as evidenced by the results obtained in this study, and it is consistent with those described by Houang and Yücesoy et al (2003) [11, 12].

The results of the molecular study offered a particular trend in the population studied. An amplification product was obtained from the isolates of *C. glabrata* (amplicons of 100 and 350 bp), *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis tropicalis* (310 bp amplicons). But different from the findings obtained by Baquero (op cit), as in this study achieved amplifications only in *C. albicans* (310 bp), *C. pseudotropicalis* (1200 bp), *Kluyveromyces marxianus* (1250 bp) and *C. neoformans* (1200 bp). These results are consistent with the findings of Baquero (op cit), that there is a significant degree of genetic polymorphism in the intron sequence CaYST1, however, suggest that these genetic variability results in inconsistent conservation species of the genus *Candida*. It is prudent to mention that our population is part of a genetic mix of various ethnic groups that could influence the molecular findings of this study. However, it should be noted that in his study, Baquero (op

cit), do present evidence of alternate tests for confirmatory identification of non-albicans species used.

The prevalence of *Candida* spp. in the analyzed population was 21.0%, which agrees with the results obtained by Flores et al, 2003 [26] and Reyna et al, 2004 [27]. Although it was higher when in comparison to what was obtained by Jiménez et al, 2004 [28] in a population of women with cervical dysplasia in Tuxtla Gutiérrez (15%) who used the germ tube test as the sole study of discrimination of the species albicans from non-albicans. However, it is necessary to take into account that this test does not identify the 5-10% of *C. albicans* not forming germinative tubes. Moreover, the prevalence obtained in this study was significantly ($p > 0.05$) higher than the prevalence reported in 2007 in our country (1%). Since this condition is not a mandatory of strict epidemiological report, as often happens in other countries, it is possible that there is underreporting of diagnoses in the records that are used as primary sources for the reporting of new cases of diseases in Institutions of public health system and thereby bias in the statistical evaluation. The situation is more obvious when we consider that private medical clinics following a report made to the health authorities of the morbidity of the population they serve.

CONCLUSIONS

The identification of *Candida* species was done successfully by isolation of fungi by conventional culture and biochemical tests, confirmation of the genus was done by PCR analysis using primers INT1 and INT2 and classification of species using chromogenic media. Analysis of results of this study concludes that the prevalence of VC was 21.0%. The isolated species were: *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. The most frequent species isolated as a causative agent of vaginal infections corresponded to *C. glabrata*. The high frequency of alterations in the vaginal ecosystem of the women studied was risk of vaginitis.

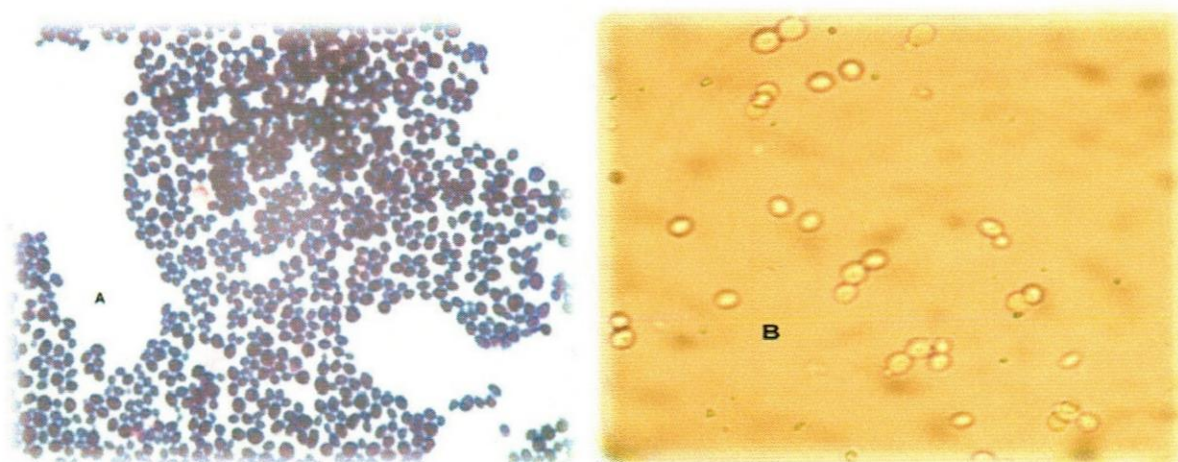


Figure 1. Cellular morphology of *Candida* spp. A. Yeast stained with Gram technique. B. Yeast, blastoconidia and gemmating cells.

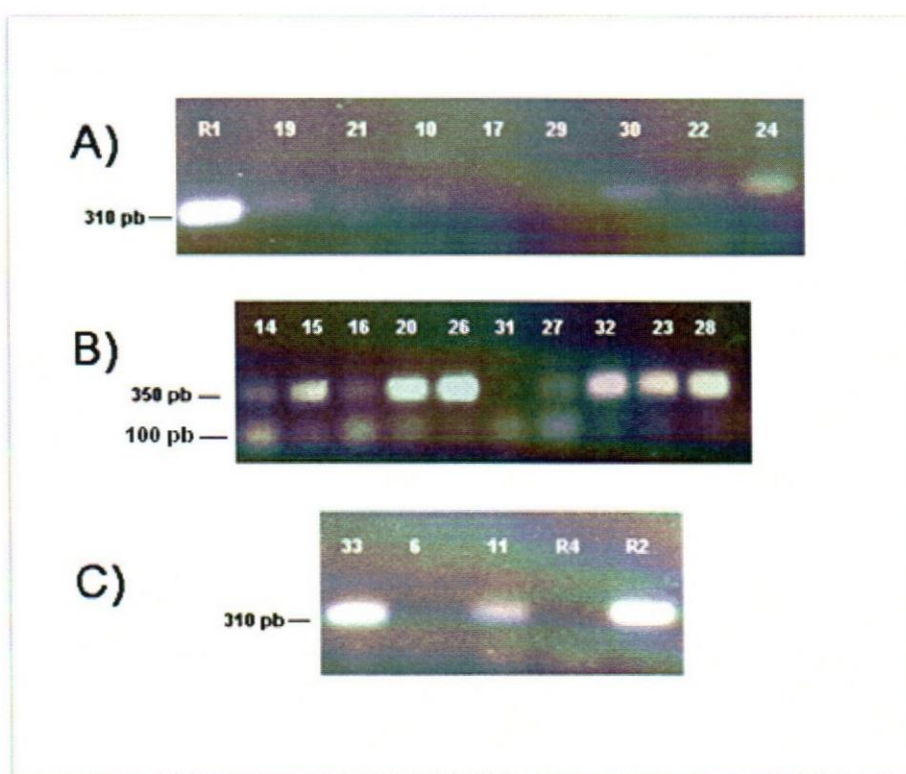


Figure 2. Amplification of from genomic DNA of isolates of *Candida* spp., stained with ethidium bromide. A) R1, Reference isolate CAL1 (*C. albicans*); 19, 21, 10, 17, 29, 30, 22, 24, clinical isolate (*C. albicans*). B) Clinical isolates 14, 15, 16, 20, 26, 31, 27, 32, 23 y 28 (*C. glabrata*). C), clinical isolate 33 (*C. parapsilosis*) isolates 6, 11, (*C. krusei*); R4, reference isolate CPA (*C. parapsilosis*); R2, reference isolate CTR34 (*C. tropicalis*).

Table I. Demographic, socioeconomic and clinical characteristics of the population.

Study Variables .		Studies womens n=167		Candidiasis Womens n= 35	
		F	%	F	%
Age ranges (P=0.5)	15-24	44	26	10	29
	25-34	43	26	11	31
	35-45	80	48	14	40
Residence (OR, 0.9; IC 95%, 0.4-1.9; p= 0.9)	Urban	94	56	19	54
	Rural	73	44	16	46
Occupation (OR, 0.7; IC 95%, 0.4-6.4; p= 0.7)	UW	126	76	28	80
	Sales	27	16	5	14
	Trade	7	4	1	3
	OUW	7	4	1	3
Socioeconomic level (OR, 1.7; IC 95%, 0.4-6.4; p= 0.5)	Low	145	87	32	91
	Medium	22	13	3	9
Associated disease (OR, 0.7; IC 95%, 0.2-2.2; p= 0.8)	SAH	7	4	0	0
	DM	4	2	2	6
	ID	1	1	1	3
	Other	16	10	2	6
Sex life (OR, 0.7; IC 95%, 0.7-0.8; p= 1)	Active	166	99	35	100
	Passive	1	1	0	0
Number of sexual couple (p= 0.1)	One	115	69	28	80
	Two	39	23	4	11
	Three and more	13	8	3	9
Pregnancy OR, 2.3; IC 95%, 0.8-6.0; p= 0.1	Present	23	14	8	23
History of STI OR, 0.7; IC 95%, 0.2-2.2; p= 0.8	Present	6	4	0	0
Drugs use (OR, 1.6; IC 95%, 0.5-4.5; p= 0.5)	Hormonals	20	12	6	17
Sigs and symptoms p= 0.9	Leucorrhea	57	34	12	34
	Vaginal pruritus	23	14	6	17
	Vaginal heat	8	5	0	0
	Dyspareunia	6	3	1	3
Characteristics of vaginal exudate (OR, 1.1; IC 95%, 0.2-4.4; p= 1.0)	Characteristic	13	8	6	17
	No characteristic	134	80	23	66
	Without Leucorrhea	20	12	6	17
Speculoscopy observations (p= 0.9)	Cervical erythema	84	50	23	66
	Vaginal erythema	28	17	3	9
	CVE	26	16	3	9
	AWP	3	2	1	3

UW= Unpaid works, OUW= Other UW, SAH= Systemic Arterial Hypertension, DM= Diabetes mellitus, ID Immune disease, CVE= Cervicovaginal erythema, AWP= Adherent whitish plaques.

Table II. Comparative results of biochemical tests used.

Pruebas	Total exudate (n=167)		Exudate (+) <i>Candida</i> spp (n=35)				V+	V-
	F	%	F	%	%	%	%	%
pH > 4.5	72	43	27	77	46	58	22	80
Amines (+)	72	43	10	28	29	53	14	74
Urease (+)	1	3	1	3	3	97	20	79
Levaduras in fresh	32	19	16	46	43	87	47	85
Levaduras Gram (+)	46	27	27	77	63	83	49	89
Clue cells	22	13	4	11	--	--	--	--
Germ tube	9	15	9	26	26	100	100	83

S=Sensibility, E= Especificity, VP= Predictive value.

Table III. Colonial morphology of isolates of *Candida* spp.

Morphological Charactics of colonies	Kind	Isolates. n=35	%
Circular, soft and pasty with yeasty smell from 1 to 3 mm in diameter.	A, B, C	35	100%
Smooth, precise borders with white center slightly prominent.	A	32	91 %
Flat, pale cream color, with irregular borders, and clearly outline dry, fast growing.	B	2	6%
Flat, pale cream color, with irregular (borders) and flat and smooth.	C	1	3%

REFERENCES

1. Casanova G, Reyna J, Ortiz FJ. Manual for the management of vulvovaginal infections. Janssen Cilag. 1ª Ed, México. 2007.
2. Helen M. ABC of sexually transmitted infections: Vaginal discharge, causes, diagnosis and treatment. MBJ 2004; 328: 1306–1308.
3. Bucemi L, Arechavala A, Negroni R. Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult patients, with special reference to candidiasis in patients of the Hospital of Infectious Diseases J. Muñiz. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 1277-181.
4. Flores R, Rivera R, García E, Arriaga M. Cervicovaginal Etiology of Infection in the Hospital Juarez of Mexico. Salud Pública Mex 2003;45 (supl. 5).

5. Beigi RH, Meyn LA, Moore DM, Krohn MA, Hillier SL. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. *Obstet* 2004; 104: 926-939.
6. Ziarrusta GB. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 22-24.
7. Balleste R, Arteta Z, Fernandez N. Evaluation of CHROMagar *Candida* chromogenic medium for identification of yeasts of medical interest. *Rev Med Uruguay* 2005; 21: 186-193.
8. Baquero C, Montero M, Sentandreu R, Eulogio V. Identification of *Candida albicans* by polymerase chain reaction amplification of CaYST1 gene intrón fragment. *Rev Iberoam micol* 2002; 19:80-83.
9. Díaz R, Gamazo C, López I. Practical Manual of Microbiology. 3rd ed. Barcelona, España; 1996. Masson S.A.
10. Ausubel F, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in molecular biology. 4a edición. New York, USA; 1999.
11. Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. Use for CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *Rev Clinic Pathol* 1997; 50:563-565.
12. Yüceso M, Marol S. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2003; 2:8.
13. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 3rd edit. New York, USA; 2001.
14. Navarrete P, Dominguez M, Castro E. Evaluation of Nugent and Amsel criteria for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Rev med Chil* 2000; 128:767-771.
15. Medina R, Rechkemmer A, García M. Prevalence of vaginitis and bacterial vaginosis in patients with abnormal vaginal discharge in the Hospital Nacional Arzobispo Loayza. *Rev Med Hered* 1999; 10: 144-150.
16. Fernandez A, Fernández M. The vaginal pH and its clinical significance. *Ginecol Obstet Clin* 2004; 5:75-80.
17. Castaño I, Cormack B, D-Peñas A. Virulence of the opportunistic fungus *glabrata*. *Rev Latinoam Microbiol* 2006; 48: 66-69.
18. Torres C, Soto A, Sandra D. Vaginal candidiasis in primigravid. *Rev Obstet Ginecol Venezuela* 2005; 65: 55-58.

19. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infection of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004; 17:255-267.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 133-163.
21. Iglesias J, Saldivar D, Tijerina R. *Candida* especies in gynecological consultation. Med Univer 2007; 9: 161-5.
22. Paul L, Fidel Jr, Vázquez J. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999; 12:80-96.
23. Giraldo P, Nowaskondki A, Gómez F. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Obstet gynecol 2000; 95: 413-416.
24. Li L, Redding S, A. Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. J Dent Res 2007; 86:204-215.
25. Lachke S, Joly S, Daniels K. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. Microbiol 2002; 148: 2661-2674.
26. Flores R, Rivera R, García E. Cervicovaginal etiology of infection in the Hospital Juárez of México. Salud Púb Mex 2003;45: s694-s697.
27. Reyna J, Morales V, Ortiz F. Clinimetric instrument effectiveness in the diagnosis of vulvovaginal candidiasis. Ginecol Obstet Méx 2004; 72: 219-226.
28. Jiménez TA, Ramírez JA, Guillén K. Prevalence of candidiasis in woman users of the General Hospital of Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Enferm Infec Microbiol 2004; 24.
29. Ritcher S, Galask R, Messer S. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis of epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol 2005; 43: 2155-2162.
30. Martínez M, Saldaña J, Sánchez MA. Criteria for the diagnosis of cervicovaginitis in primary level care: correlation with the Mexican Official Norms. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2007; 45: 249-254.



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE CHIAPAS



118

CUADERNO DE PROTOCOLOS

“Identificación de *Candida spp.*”

Sarain Monjaraz Rodríguez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; 2009



Universidad Autónoma de Chiapas

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

Universidad Politécnica de Chiapas

**CUERPO ACADÉMICO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
AGROINDUSTRIAL**

M. en C. Sarain Monjaraz Rodríguez.

Dra. Peggy Elizabeth Alvarez Gutiérrez

Dr. Víctor Manuel Vega Villa

Dr. Sergio Saldaña Trinidad

Contenido.

I. Introducción.....	121
II. Toma de muestras.....	123
III. Pruebas bioquímicas de identificación.....	127
1. Medición del pH vaginal.....	128
2. Prueba de aminas (Whiff).....	128
3. Prueba de la ureasa.....	131
IV. Pruebas microbiológicas de Identificación.....	133
1. Examen por microscopía directa.....	133
2. Tinción de Gram.....	136
3. Prueba del tubo germinal.....	139
4. Aislamiento primario de <i>Candida spp.</i> , en medio YPD.....	140
5. Aislamiento de <i>Candida spp.</i> , en medios cromogénicos.....	142
6. Crioconservación de cepas de <i>Candida spp.</i>	145
V. Pruebas moleculares.....	147
1. Extracción de ADN de <i>Candida spp.</i>	147
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	151
3. Electroforesis en gel de agarosa.....	154
III. Referencias.....	156

I. Introducción.

Los integrantes del género *Candida* son organismos, haploides o diploides, con reproducción sexual o asexual, aerobios, Gram positivos, Género *Candida*, Clase *Deuteromycetes*, Subclase *Blastomycetidae* y Familia *Cryptococcaceae*. Son hongos de distribución universal que forman parte de la microbiota normal de la boca, tegumentos, tracto digestivo y genital femenino. Raramente se han aislado del suelo, ya que es poco probable la supervivencia y reproducción en un ambiente no animal. El género corresponde aproximadamente a 200 especies de levaduras con diferencias entre sí, considerando entre las características más homogéneas, la reproducción asexual por gemación multilateral y entre sus diferencias, la morfología celular, la capacidad para formar o no micelios o pseudomicelios y en su poder de asimilación de diversos compuestos.

Estos hongos no son patógenos por naturaleza estrictamente hablando. Algunas que se relacionan con la enfermedad en los hombres o animales, no son capaces de originar un proceso patológico en un individuo sano, si no que, para cumplir con este objetivo es necesario de que se presenten alteraciones en el sistema de defensas celulares del organismo, fisiología o microbiota normal. El oportunismo es favorecido por un gran número de factores que se ligan a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de esteroides y antibióticos, citotóxicos, anticonceptivos, trasplantes de médula ósea, instalación de catéteres intravenosos; además de condiciones patológicas como diabetes mellitus descontrolada, prematuréz, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre otros.

Candida albicans, es un microorganismo que se considera como el patógeno oportunista más frecuentemente que ha sido aislado en pacientes con infecciones micóticas, que han creado un fenómeno creciente al nivel mundial, con patologías frecuentes desde leves a severas como vulvovaginitis, candidiasis oral, conjuntivitis, dermatitis del pañal, paroniquias e intertrigo, sin embargo, cuando su invasión es más profunda se presenta como candidemia o candidiasis diseminada que puede tener desenlaces fatales si no se hace un diagnóstico temprano y tratamiento eficaz. En sujetos inmunocomprometidos es frecuentes encontrar esofagitis, miocarditis, abscesos hepato-esplénicos, infecciones pulmonares y del sistema nervioso central.

Si bien es cierto, que *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada en la mayoría de las infecciones candidiasicas, otras especies denominadas *no albicans* como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. krusei* entre otras, han aumentado su frecuencia en las últimas décadas y pueden provocar infecciones similares e incluso con mayor patogenicidad.

En la identificación del hongo se han utilizado diversas técnicas de diagnóstico que ayudan a su caracterización como las técnicas bioquímicas, enzimáticas o inmunológicas, algunas con reportes inmediatos pero con baja eficacia diagnóstica, sin embargo, su uso en forma conjunta favorece la identificación de *Candida spp.* Otras técnicas como el cultivo en medios selectivos o cromogénicos han resultado con alta sensibilidad y especificidad pero que requieren de 3 a 5 días para ofrecer resultados.

Las técnicas moleculares han venido a revolucionar el estudio de los microorganismos dentro del campo de la microbiología, al igual que otras disciplinas. Su uso es cada vez mayor en el ámbito de la investigación debido a que han demostrado tener mayor relevancia clínica



en comparación con técnicas convencionales de diagnóstico. Esto ha permitido caracterizar de manera más amplia a los microorganismos, conociendo con la genotipificación la distribución regional de patógenos humanos, lo que es aplicable a sistemas de vigilancia epidemiológica. Además que se pueden estudiar patrones que se relacionan con la patogenicidad, inmunogenicidad y de farmacorresistencia.

En el presente manual se describe un método para la identificación de las especies de *Candida*, empleando técnicas de aislamiento en medios primarios, identificación del género con pruebas bioquímicas, ensayos microbiológicos y con el uso de técnicas moleculares que aportan un método de diagnóstico rápido y eficaz, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso de un par de oligonucleótidos que proceden la secuencia del intrón CaYST1 de *C. albicans* (Baquero et al, 2004). Para la clasificación de especie se hace uso de medios cromogénicos, mediante la morfología macroscópica y las características colorimétricas de cada especie (Ver algoritmo en figura 1).

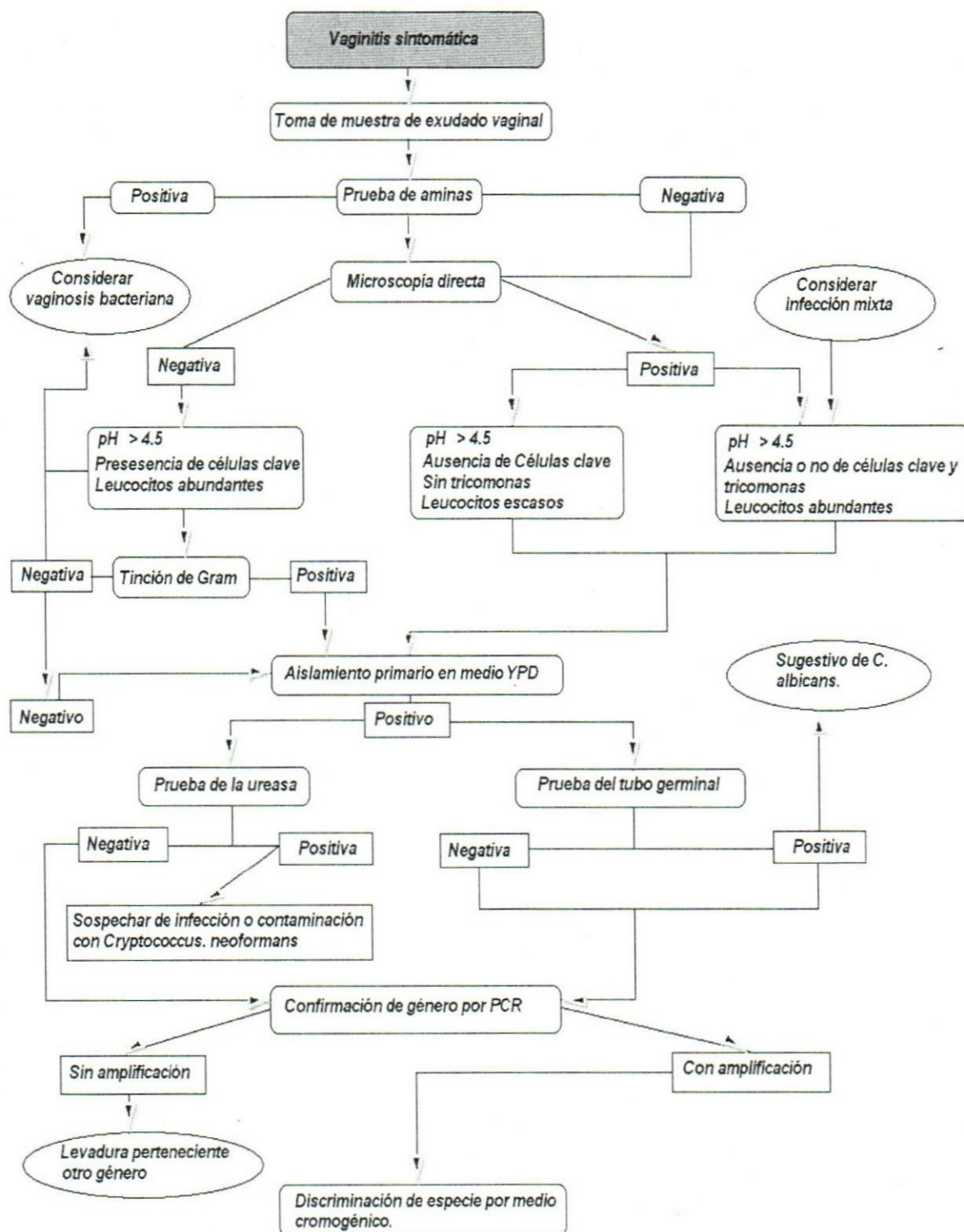


Figura 1. Algoritmo para la identificación de las especies de *Candida* en la candidiasis vaginal.
Fuente: Monjaraz et al.



II. Toma de muestras

1. Toma de muestras de exudado vaginal.

Fundamento: El moco secretado por el epitelio cervical y vaginal contiene detritus celulares, células epiteliales de descamación y microorganismos residentes en el epitelio cervicovaginal que interactúan como microbiota habitual o como colonizadores infecciosos.

Objetivo: Recolectar muestras de exudado vaginal para el aislamiento y análisis.

Definiciones.

Espéculo vaginal: Instrumento utilizado en exploraciones vaginales, cuyo objetivo es la separación de las paredes anterior y posterior de la vagina.

Microbiota: Conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos) que habitan en una región dada con diversos tipos de interacción con el huésped e interespecífica.

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
g:	Gramo
YPD:	Yeast, peptone, dextrose

Reactivos:

Hidróxido de potasio	KOH
Cloruro de Sodio	NaCl

Soluciones

Hidróxido de potasio al 10%	
100 mL	
Ingredientes:	Cantidad
Agua	100 mL
Hidróxido de potasio	10 g
Preparación:	
1. Pesar el Hidróxido de potasio.	
2. Disolver el KOH en agua destilada.	
3. Aforar en matraz volumétrico el KOH a 100 mL con el agua.	
4. Alicuotear en frascos de vidrio.	

5. Esterilizar a 15 psi 15 min.

Condiciones de almacenamiento

La solución se debe de guardar en un frasco de vidrio estéril y etiquetado.

Cloruro de sodio.

100 mL

Ingredientes:	Cantidad
Agua	100 mL
Cloruro de sodio	0.9 g

Preparación:

1. Pesar el NaCl.
2. Disolver el NaCl en agua destilada.
3. Aforar en matraz volumétrico el NaCl a 100 mL con agua.
4. Alicuotear en frascos de vidrio.
5. Esterilizar a 15 psi 15 min.

Condiciones de almacenamiento

La solución se debe de guardar en un frasco de vidrio estéril y etiquetado.

Materiales:

Tubos de ensayo de 10 mL	10
Guantes de látex	4
Hisopos de algodón estériles	20
Placas con medio YPD	10
Portaobjetos de vidrio	10
Mechero de alcohol	1
Tiras medidoras de pH.	10

Equipos e instrumentos:

Espéculo vaginal de acero inoxidable estéril	Biomex
Cama de exploración ginecológica	
Lámpara de chicote	Biomex

Procedimiento:

1. Colocar al individuo en posición ginecológica, previa indicación de vestirse con bata de exploración y sin ropa.
2. Con el uso de guantes estériles desechables, insertar el espéculo de doble rama, previa humidificación



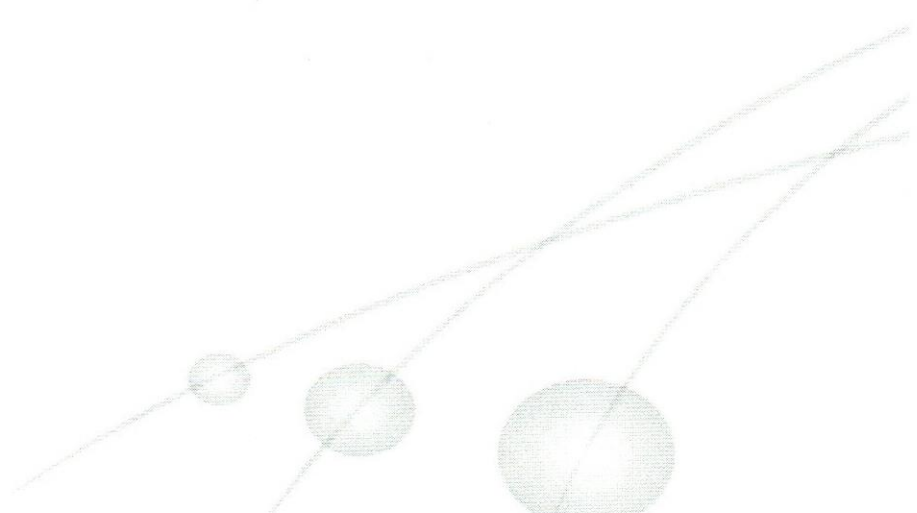
- con solución salina (NaCl 0.9%) estéril.
3. Realizar la toma de muestra en la mucosa de la pared posterior vaginal con hisopos estériles, en forma rotatoria durante 10 segundos, evitando todo contacto con el área genital externa.
 4. Destapar en forma cuidadosa la placa con medio YPD al calor de un mechero y hacer la siembra rápidamente.
 5. Con el mismo hisopo colocar una muestra en un portaobjetos que contenga 2 gotas de solución salina

y hacer un extendido uniforme. El frotis deberá fijarse a la llama de un mechero de alcohol y rotularse para su posterior uso en el laboratorio.

6. Tomar otra muestra, y depositar en 0.5 mL de solución salina en un tubo de ensayo para observación directa en el laboratorio.

Expresión de resultados:

Los resultados corresponden a muestras obtenidas para su uso en técnicas de laboratorio.





III. Pruebas bioquímicas de identificación.

1. Medición del pH vaginal.

Fundamento: *Lactobacillus acidophilus* residentes del epitelio vaginal, ayudan a mantener la acidez normal de la vagina merced a la fermentación del glucógeno. El pH (concentraciones de hidrógeno) es un indicador de la acidez de una sustancia, y la vagina tiene un pH entre 3.5 y 4.5, que cuando disminuye crea un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos patógenos como *Candida spp.*, o bacterias anaerobias.

Objetivo: Determinar valores del pH vaginal con tiras reactivas para evaluar su relación con candidiasis vaginal.

Definiciones.

pH: Determina la acidez de una sustancia en base a iones libres de hidrógeno que contiene.

***Lactobacillus acidophilus*:**

Complejo de bacilos que colonizan la vagina y otras regiones corporales, afines a un pH ácido, y que mantienen en homeostasis al ecosistema vaginal.

***Candida spp.*:** Levadura perteneciente a la familia de los deuteromicetos. Oportunista patógeno que origina diversas infecciones fúngicas.

Anaerobios: Microorganismos que no requieren de oxígeno para sobrevivir.

Materiales:

Guantes de látex	2
------------------	---

Tiras medidoras de pH.	1
------------------------	---

Equipos e instrumentos:

Espéculo vaginal de acero inoxidable estéril	Biomex
Cama de exploración ginecológica	
Lámpara de chicote	Biomex

Procedimiento:

1. La medición se realizará durante la toma de muestra de exudado vaginal.
2. Introducir la tira reactiva 3 cm sobre el canal vaginal, haciendo contacto con paredes de la misma, evitando tocar el papel indicador para no falsear los resultados.
3. Hacer la medición comparando el color generado en la capa indicadora con el esquema de colores que trae el tubo de contenedor, el cual asigna un color diferente por cada nivel de pH medido.

Expresión de resultados:

Un pH normal corresponde a un valor entre 4.0 y 4.5. Para cada valor de pH hay una definición de color que puede compararse con los controles definidos en el tubo contenedor.

2. Prueba de aminas (Whiff).

Fundamento: Las bacterias que colonizan a un ecosistema vaginal alterado como: *Gardnerella vaginalis*,

Mycoplasma spp., y otros anaerobios tienen la capacidad de producir aminas como la putrescina, cadaverina, y



trimetilamina. Exponer una muestra de exudado vaginal al KOH expele un olor característico a "pescado".

Objetivo: Analizar una muestra de exudado vaginal con la prueba de aminas para la identificación de anaerobios que sugieren vaginosis bacteriana.

Definiciones.

Aminas: Compuestos químicos derivados del amoníaco, productos de la biodegradación proteica de flora bacteriana anaerobia.

Anaerobios: Bacterias que no requieren del oxígeno para su supervivencia y que residen en el tracto digestivo bajo.

Vaginosis: Situación clínica caracterizada por reemplazo de la microbiota habitual vaginal por bacterias anaerobias, sin que su presencia condicione una reacción inflamatoria local.

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
g:	Gramo

Reactivos:

Hidróxido de potasio	KOH
----------------------	-----

Soluciones

Hidróxido de potasio al 10%	
100 mL	
Ingredientes:	Cantidad
Agua	100 mL
Hidróxido de potasio	10 g
Preparación:	
1. Pesar el Hidróxido de potasio.	
2. Disolver el KOH en agua destilada.	
3. Aforar en matraz volumétrico el KOH a 100 mL con el agua.	

4. Alicuotear en frascos de vidrio.

5. Esterilizar a 15 psi 15 min.

Condiciones de almacenamiento

La solución se debe de guardar en un frasco de vidrio estéril y etiquetado.

Materiales:

Guantes de látex	4
Pipetas Pasteur	1

Equipos e instrumentos:

Espéculo vaginal de acero inoxidable estéril	Biomex
Cama de exploración ginecológica	
Lámpara de chicote	Biomex

Procedimiento:

Esta prueba se realizará durante la toma de muestras de exudado vaginal.

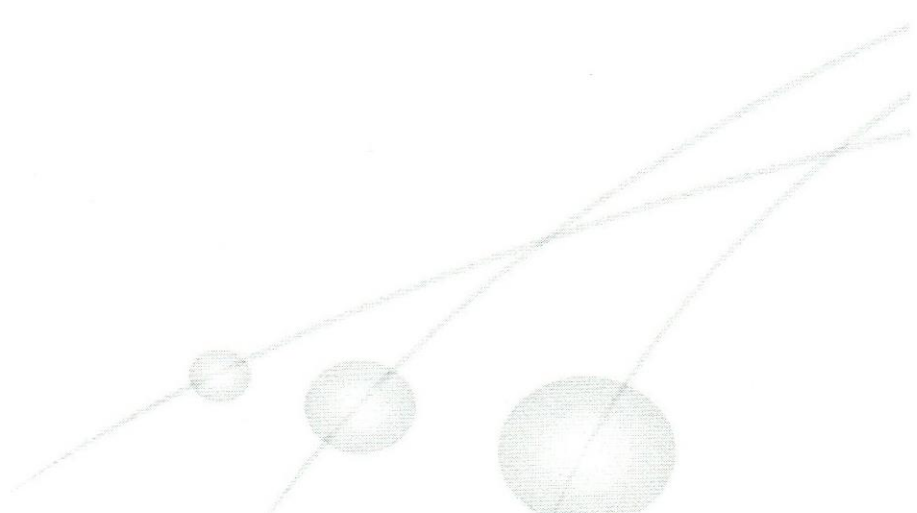
1. Añadir en el momento de retirar el espejo de la vagina en la zona de en que se observe mayor flujo vaginal, 2 gotas de KOH al 10%.
2. Agitar el espejo en forma rotatoria suave para que la solución se mezcle con la secreción vaginal.
3. Hacer la interpretación en 5 segundos y registrar los resultados.

Expresión de resultados:

La liberación de un olor característico a "pescado" se interpreta como un resultado positivo a la prueba de aminas.

Observación:

Todos los residuos biológicos infecciosos utilizados en las pruebas bioquímicas y microbiológicas deberán desecharse de acuerdo a lo estipulado por la Norma Oficial Mexicana.



3. Prueba de la ureasa.

Fundamento: La prueba de la ureasa es útil para determinar la hidrólisis de la urea dando a lugar dos moléculas de amoníaco por actividad de la enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica del género *Proteus* y de *Cryptococcus neoformans*. Las especies de *Candida* no tienen la capacidad de desdoblar la ureasa, a excepción de *C. kruseii* que es ureasa variable, sin embargo las levaduras de ambos géneros son muy parecidas, sobre todo cuando no se observa claramente la cápsula de *C. neoformans*. La utilidad de la prueba en el diagnóstico de *Candida* spp., es la distinción entre ambos géneros.

Objetivo: Establecer actividad hidrolítica en caldo urea de Christensen de muestras de aislados clínicos de *Candida* spp., para descartar la presencia de *C. neoformans*.

Definiciones.

***Cryptococcus neoformans*:** Es una levadura encapsulada que ocasiona micosis profundas en humanos y animales.

***Proteus*:** Género de bacterias Gram negativas, ureasa positivas, patógenos en el ser humano.

Ureasa: Es una enzima constitutiva que sintetizan bacterias independientemente esté presente o no la urea.

Urea: Es una diamida del ácido carbónico que al desdoblar por acción de la ureasa produce dos moléculas de amoníaco.

Reactivos:

Cloruro de sodio	NaCl
------------------	------

Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄
----------------------	---------------------------------

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
-----	-----------

Medio de cultivo.

Caldo urea de Christensen.

VF: 1000 mL

Ingredientes:	Cantidad
Peptona	1 g
Glucosa	1 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Urea	20 g
Rojo Fenol	0.012g

Preparación:

1. Colocar las sales en un matraz volumétrico que contenga 300 mL de Agua y fundirlas en horno de microondas.
2. Esterilizar durante 15 minutos en calor húmedo.
3. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
4. Distribuir en alícuotas en tubos de 10 mL y esterilizar en calor húmedo durante 15 minutos.

Condiciones de almacenamiento

Almacenarse a 2-4°C de temperatura hasta su uso.

Materiales:

Guantes de látex	4
Cajas de Petri	40

Equipos e instrumentos:

Mecheros de Fisher	Mecker
Campana de flujo vertical	Figursa

Procedimiento:

1. Con un asa estéril tomar una muestra colonial e inocular en un tubo que contenga 5 mL de caldo urea de Christensen.
2. Incubar a 37 °C durante 48 hrs.

Expresión de resultados:

La prueba se considera positiva cuando existe un cambio de coloración del medio, de rojo a púrpura o fúccia y que nos hidrólisis de la urea como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Prueba de la ureasa. La muestra positiva vira a una coloración fúccia como resultado de la hidrólisis de la urea.

IV. Pruebas microbiológicas de Identificación.

1. Examen por microscopía directa.

Fundamento: El aumento de imagen que proporcionan las lentes, ha permitido el descubrimiento de microorganismos desde hace varios siglos. Su aplicación mediante el uso del microscopio óptico forma parte en el campo de la microbiología para la identificación de estructuras celulares, bacterianas, parasitarias o fúngicas.

Objetivo: Análisis de muestras de exudado vaginal mediante microscopía óptica, para la identificación de estructuras fúngicas.

Definiciones.

Células clave: Células del epitelio vaginal con múltiples bacterias adheridas que no permiten diferenciar en forma clara el contorno celular.

Espéculo vaginal: Instrumento utilizado en exploraciones vaginales, cuyo objetivo es la separación de las paredes anterior y posterior de la vagina.

Hifas: Son formas filamentosas, tubulares con ramificaciones y que en conjunto forman micelios.

Levaduras: estructuras de pared refringente, ovales, nítidas, inmóviles.

Microbiota: Conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos) que habitan en una región dada con diversos tipos de interacción con el huésped e interespecífica.

Pseudohifas: Estructuras cilíndricas formada por cadenas de levaduras susceptibles de separación mecánica.

Bacilos: Microorganismos en forma de bastones, con o sin movimiento, largos o cortos.

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
g:	Gramo

Reactivos:

Hidróxido de potasio	KOH
Cloruro de Sodio	NaCl

Soluciones

Hidróxido de potasio al 10%	
100 mL	
Ingredientes:	Cantidad
Agua	100 mL
Hidróxido de potasio	10 g
Preparación:	
1. Pesar el Hidróxido de potasio.	
2. Disolver el KOH en agua destilada.	
3. Aforar en matraz volumétrico el KOH a 100 mL con el agua.	
4. Alicuotear en frascos de vidrio.	
Condiciones de almacenamiento	
La solución se debe de guardar en un frasco de vidrio estéril y etiquetado.	

Materiales:

Muestras de exudado vaginal en sol salina	N
Guantes de látex	4
Pipetas Pasteur	10
Portaobjetos de vidrio	10

Equipos e instrumentos:

Microscopio microbiológico	Carl Zeiss
----------------------------	------------

Procedimiento:

1. Depositar 2 gotas de exudado vaginal en un porta objetos y cubrir con un cubreobjetos para observar por microscopía directa.
2. En caso de observar opacidad en el material o presencia de abundantes células añadir 1 gota de KOH 10% para clarificar las estructuras levaduriformes y aplicar un

calentamiento gentil para esclarecer estas estructuras.

Expresión de resultados:

Los hallazgos pueden describirse como se muestra en la figura 3.

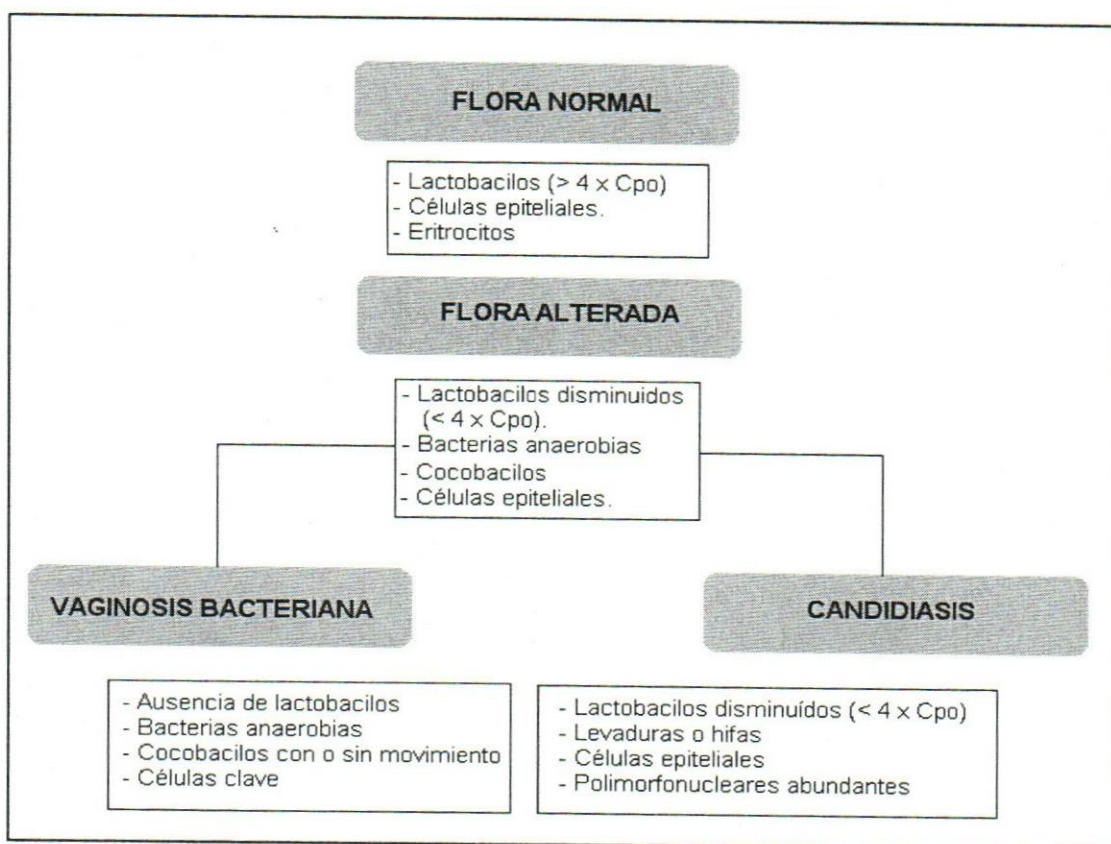


Figura 3. Posibles resultados en la observación por microscopía directa de exudado vaginal. (Fuente: Jawest *et al*, 2009).

2. Tinción de Gram.

Fundamento: La falta de contraste entre las estructuras celulares y el medio que los rodea hace con frecuencia difícil la identificación por medio de microscopía óptica en su estado natural, sin embargo es posible con el uso de la tinción de Gram, la cual divide a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Esta técnica se fundamenta en las diferencias de las paredes celulares entre microorganismos.

La pared celular en microorganismos Gram positivos, se constituye por una gruesa capa de peptidoglicano que le proporciona rigidez a la bacteria, y se une otra capa de ácidos teicoicos. Esta rigidez permite resistir a la acción de los decolorantes orgánicos (alcohol/acetona), los cuales deshidratan la pared, cerrando los poros y reteniendo el colorante (complejo cristal violeta-yodo); en cambio las Gram negativas que tienen una fina capa de peptidoglicano muy soluble, impiden la retención del colorante. Cabe mencionar que para esta técnica de tinción es necesaria la integridad de la pared celular, porque una pared rota hace forzosamente al microorganismo Gram negativo. Las levaduras tienen una gruesa pared celular que difiere en su constitución química con las bacterias. Debido a que la reacción de Gram obedece a la estructura física de la pared y no al componente químico, permite hacer la identificación de levaduras como Gram positivas.

Objetivo: Distinguir entre levaduras Gram positivas y Gram negativas, así como bacterias Gram positivas o

negativas en muestras de exudado vaginal.

Definiciones.

Pared celular: Membrana externa que rodea la membrana celular y su contenido de organelos.

Peptidoglicano: Heteropolímero también denominado mureína, que se conforma de secuencias alternantes de N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces β -1,4, que constituyen la pared celular de la mayor parte de bacterias.

Vaginosis: Situación clínica caracterizada por reemplazo de la microbiota habitual vaginal por bacterias anaerobias, sin que su presencia condicione una reacción inflamatoria local.

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
g:	Gramo

Soluciones

Nombre	Cantidad
Cristal violeta	1000 mL
Lugol	1000 mL
Alcohol/acetona	1000 mL
Safranina	500 mL
H ₂ O	500 mL

Las soluciones deben almacenarse en su frasco original, a temperatura ambiente con la tapa bien sellada.

Materiales:

Guantes de látex	4
------------------	---



Frotis fijados	1
Aceite de inmersión.	1

Equipos e instrumentos:

Tarja de acero para tinción	Teka
Mechero de Fisher	Mecker
Microscopio óptico	Carl Zeiss

Procedimiento:

1. Se utilizará el frotis fijado previamente (ver procedimiento en toma de muestras).
2. En una tarja de tinción, aplicar solución de cristal violeta sobre la superficie del portaobjeto, dejando en reposo durante un minuto y retirar el excedente con agua en forma gentil.
3. Añadir lugol, cubriendo todo el frotis durante un minuto y eliminar nuevamente el excedente.
4. Decolorar con etanol durante 20 segundos y lavar gentilmente con agua.
5. Agregar safranina durante un minuto y lavar nuevamente.

6. Secar a temperatura ambiente y observar en microscopio óptico con el objetivo directo de 40X y con aceite de inmersión en objetivo 100X.

Expresión de resultados:

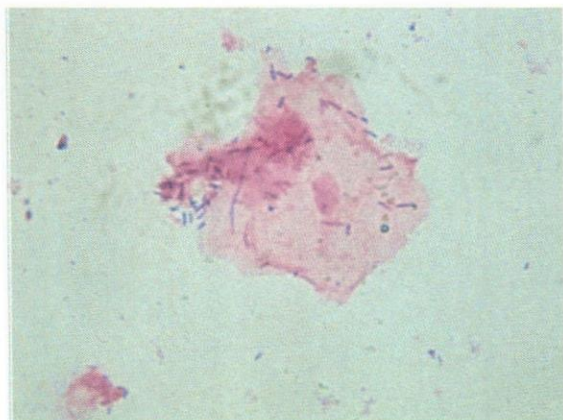
La observación al microscopio puede describirse como sigue (ver fig. 4):

Flora normal: Se observan bacterias con características de *Lactobacilos* Gram positivos y células epiteliales vaginales.

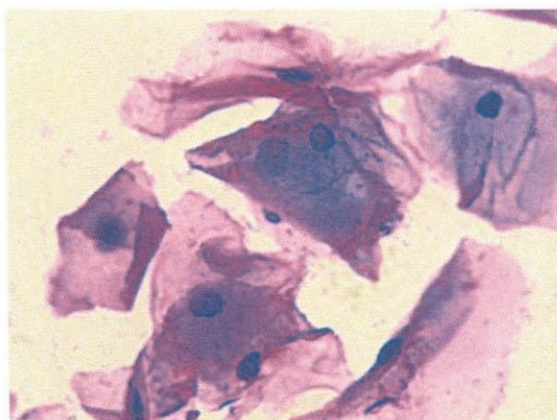
Flora alterada: Presencia de lactobacilos Gram positivos, disminuidos (<4 x cpo), cocobacilos y bacilos Gram negativos con morfotipo de anaerobios, con células epiteliales vaginales.

Vaginosis bacteriana: Ausencia de lactobacilos con presencia de cocobacilos y lactobacilos Gram negativos con morfotipo de anaerobios, asociados a células clave o guía.

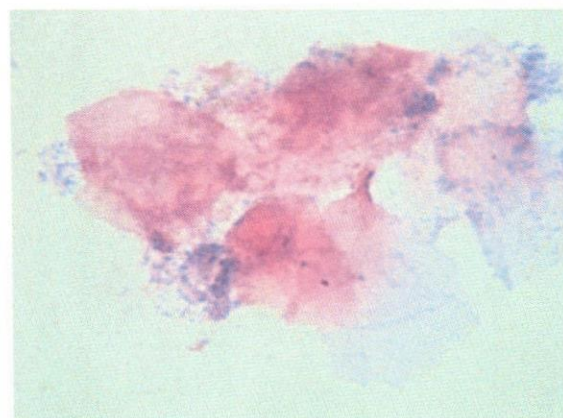
Candidiasis vaginal: Presencia de hifas o levaduras Gram positivas, lactobacilos disminuidos (<4 x cpo), células epiteliales vaginales.



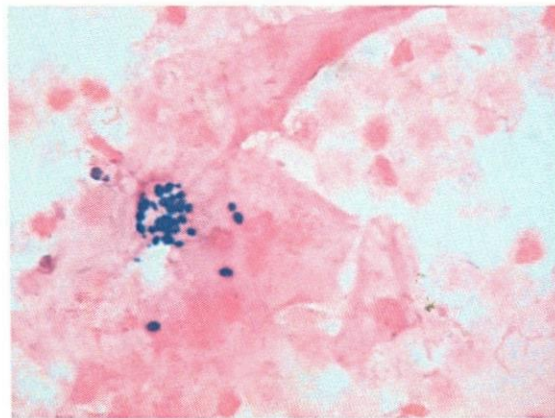
Flora Normal



Flora alterada



Vaginosis bacteriana



Candidiasis

Figura 4. Clasificación de la flora vaginal con la tinción de Gram. (Fotografías tomadas de Monjaraz *et al*, 2009).

3. Prueba del tubo germinal.

Fundamento: El tubo germinativo es una estructura cilíndrica que emerge de una levadura cuando las condiciones nutricionales así lo permiten. Esta característica es única en *C. albicans* y *C. dubliniensis* debido a que poseen el gen que confiere esta capacidad.

Objetivo: Identificar la presencia de tubo germinativo o filarmentación precoz en muestras de *Candida* spp., crecidas en suero humano para la discriminación de especies no *albicans*.

Definiciones.

Filamentación: Es la formación de filamentos o tubo germinativo a partir de una levadura.

Especies no *albicans*: Especies del género *Candida* que no corresponden a la especie *albicans*.

Suero sanguíneo: Líquido intersticial que se obtiene al sedimentar los elementos formes de la sangre.

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
g:	Gramo

Materiales:

Guantes de látex	4
Pipetas Pasteur	1
Tubos de ensayo	10

Equipos e instrumentos:

Asa de platino	Fisher
Incubadora microbiológica	Binder

Procedimiento:

1. Colocar en un tubo estéril 0.5 mL de suero humano.
2. Con un asa de platino, tomar una muestra de colonia e inocular en el tubo.
3. Incubar a 37°C durante 2 horas.
4. Posteriormente, tomar una muestra del tubo y observar al microscopio óptico.

Expresión de resultados:

La prueba se considera positiva cuando se observe la presencia de un tubo que nace de una célula levaduriforme sin un tabique de constricción en su base, que mide la mitad del ancho y 3 o 4 veces más del largo de la célula progenitora será indicativa de formación de tubo germinativo o filamentación precoz (figura 5).



Figura 5. Prueba del tubo germinativo. A, tubo germinativo. B, blastocnidio con pseudohifa. Tomado de Mendoza, 2005.

4. Aislamiento primario de *Candida* spp., en medio YPD.

Fundamento: El medio YPD (yeast, peptone, dextrose) es rico para el crecimiento de hongos. El extracto de levadura y la peptona aportan una fuente de carbono, vitaminas, minerales y otros nutrientes esenciales para el crecimiento. La dextrosa aporta una fuente de energía. Suele adicionarse a este medio, antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano como el cloramfenicol o la ampicilina.

Objetivo: Aislamiento de colonias en medio selectivo YPD para la identificación de *Candida* spp.

Definiciones.

Colonia: Conjunto de bacterias o levaduras que crecen a partir de una célula madre o unidad formadora de colonias (UFC) en un medio enriquecido.

***Candida* spp.:** Género de hongos patógenos, oportunistas en el ser humano pertenecientes a la clase de los deuteromicetos.

Medio selectivo: Es un medio de cultivo que permite el crecimiento de ciertos microorganismos inhibiendo el desarrollo de otros.

Símbolos y abreviaturas.

mL:	Mililitro
g:	Gramo
Dextrose	Dextrosa
Peptone	Peptona
Yeast	Extracto de levadura

cloramfenicol al 0.05%.

VF: 1000 mL

Ingredientes:	Cantidad
Agua	1000 mL
Extracto de levadura.	10 g
Peptona.	20 g
Agar microbiológico	20 g
Dextrosa	20 g
Cloramfenicol.	0.5 g

Preparación:

1. Colocar en un matraz volumétrico la levadura, peptona, el agar y la dextrosa, con 300 mL de agua y fundir en un horno de microondas.
2. Esterilizar durante 15 minutos en calor húmedo.
3. Dejar reposar 15 min y aforar a 1000 mL con agua estéril.
4. Agregar 0.5 g de cloramfenicol y mezclar suavemente cuando el calor de la solución permita manipular el matraz.
5. Vaciar 25 mL del medio cada caja en un área estéril.

Condiciones de almacenamiento

Los geles deben ser sellados de manera individual con cinta y almacenarse a 2-4°C de temperatura.

Materiales:

Cajas de Petri	40
----------------	----

Equipos e instrumentos:

Mecheros de Fisher	Mecker
Campana de flujo vertical	Figursa
Incubador	Figursa

Medio de cultivo.

Medio sólido YPD al 2% con

Procedimiento:

1. En condiciones de asepsia, tomar la muestra del exudado vaginal e inocular mediante estrías cruzadas.
2. Incubar a 37 °C durante 72 hrs.

Expresión de resultados:

Se interpretará como colonias sugestivas de *Candida* spp., aquellas que tengan las siguientes características:

Colonias blanquecinas, circulares con bordes bien definidos, de 2-4 mm de diámetro, planas o con ligero relieve, brillantes, de consistencia cremosa y

olor característico a levaduras. Ver figura 6.



Figura 6. Morfología colonial de *Candida* spp. (Monjaraz *et al*, 2009).

5. Aislamiento de *Candida* spp., en medios cromogénicos.

Fundamento: Los medios cromogénicos facilitan la identificación de especie en un género, con la formación colonial de coloración diferente en cada especie. *Candida* spp., hidroliza sustratos cromogénicos, utilizando enzimas que difieren en cada especie en presencia de un indicador colorimétrico, un ejemplo de ello es la β -N-acetilgalactosaminidasa de *C. albicans* que en el medio CHROMagar *Candida*® (CHROMagar, Microbiology, Francia), permite una coloración característica. El CHROMagar *Candida*® descrito por Odds y Bernaerts (1994), distingue las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*. El medio CandiSelect® (Bio-Rad) es otro método selectivo que permite la identificación de *C. albicans* y presuntivamente las especies de *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Su diagnóstico se basa en la actividad enzimática de la hexosaminidasa única en *C. albicans*. La identificación presuntiva de otras especies, se obtiene merced a un segundo sustrato que detecta la actividad enzimática de la fosfatasa.

Además de la pigmentación desarrollada, es factible observar determinadas características establecidas como consistencia, aspecto y otros datos de interés que permiten una adecuada diferenciación.

Objetivo: Determinar mediante el crecimiento de aislados clínicos de *Candida* spp., en medios cromogénicos las especies del género.

Definiciones.

Fosfatasa: Enzima del grupo de las estereasas que cataliza la eliminación de grupos fosfatos de ciertos sustratos, liberando una molécula del ion fosfato y reemplazando un grupo hidroxilo en la región en que se ubicaba esterificado el grupo fosfato.

β -N-acetilgalactosaminidasa: Una hexosaminidasa que hidroliza residuos N-acetil-D-galactosamina no-reductoras terminales en N-acetil-alfa-D-galactosaminidas.

Medio cromogénico: Es un medio selectivo que permite la identificación de especies bacterianas o fúngicas mediante la producción de un color específico.

Medios cromogénicos.

Medio	Cantidad
CHROMagar <i>Candida</i> ®	N
CandiSelect®	N
Condiciones de almacenamiento	
Almacenarse a 2-4°C de temperatura para que no se deshidrate el medio y protéjase de la luz utilizando bolsas oscuras.	

Materiales:

Guantes de látex	4
Aislados primarios	n

Equipos e instrumentos:

Mecheros de Fisher	Mecker
Campana de flujo vertical	Figursa

Procedimiento:

Esta prueba se realizará a partir de los aislados clínicos obtenidos con medios de aislamiento primario.

1. Realizar la siembra de cada aislado clínico con la punta de un palillo de madera estéril en forma ordenada.
2. Colocar las placas de cultivo en bolsas cerradas y oscuras para evitar su deshidratación y fotodaño.

3. Incubar a temperatura ambiente a 37-38 °C, durante 48 hrs, de manera que las levaduras expresen su color por completo.

Expresión de resultados:

La interpretación en CHROMagar *Candida*® y CandiSelect será de acuerdo a las características mostradas en las figura 7 y 8.

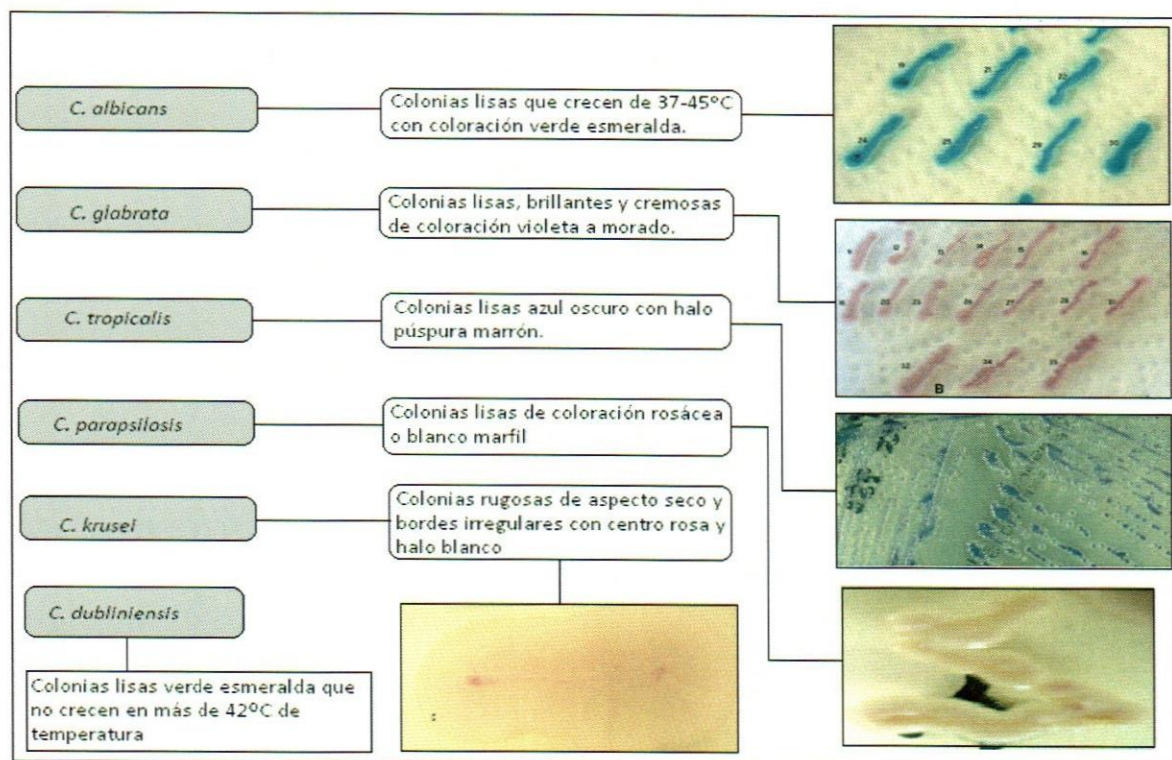


Figura 7. Morfología colonial de *Candida* spp., en CHROMagar *Candida*®. (Fotografías de Monjaraz et al, 2009).

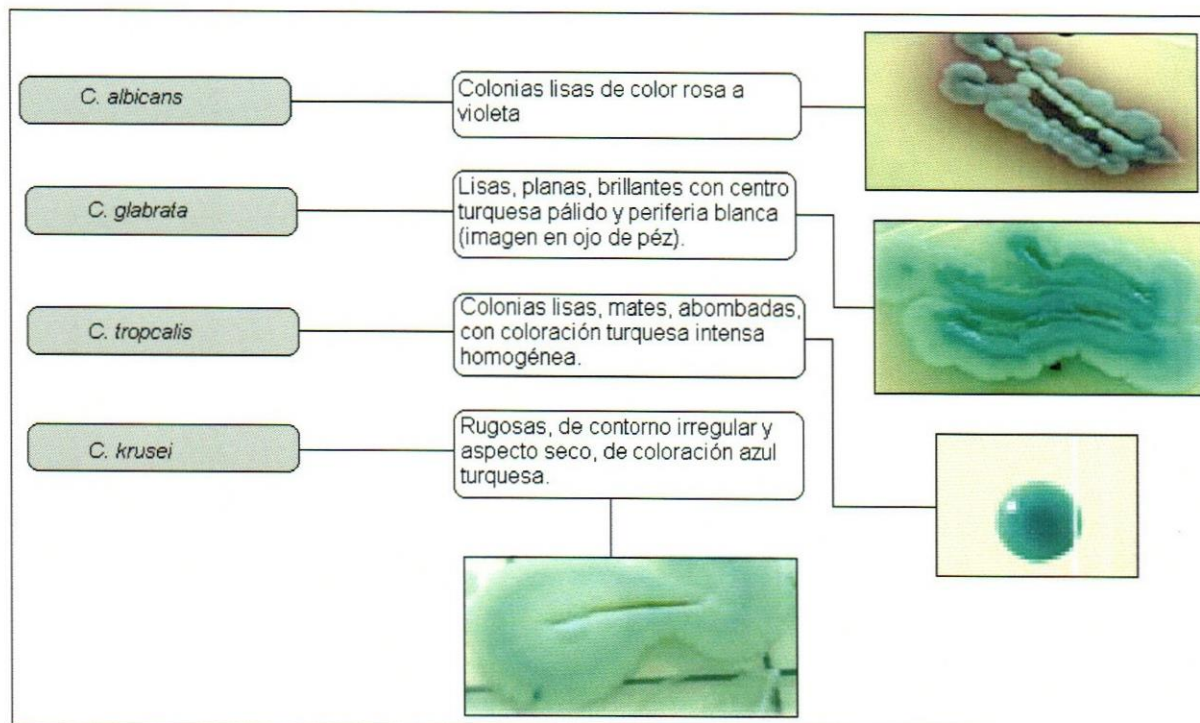


Figura 8. Morfología colonial de *Candida* spp., en CandiSelect®. (Fotografías de Monjaraz et al, 2009).

6. Crioconservación de cepas de *Candida spp.*

Fundamento: La crioconservación es una técnica utilizada para interrumpir el crecimiento de microorganismos al congelar el agua necesaria para su desarrollo. Este método garantiza la estabilidad genética celular al impedir generaciones sucesivas. Sin embargo, los solutos presentes en una suspensión celular interfieren en el proceso de congelación de este, debido a que disminuyen el punto de congelación. Añadiendo un crioprotector no iónico como el glicerol, es posible reducir la cantidad de hielo producido y el aumento de la concentración iónica, que dañan a las células a conservar.

Objetivo: Preservación de cepas de *Candida spp.*, mediante crioconservación con glicerol para prácticas ulteriores.

Definiciones.

Glicerol: Alcohol de características higroscópicas, viscoso. Transparente de múltiples usos industriales. Compuesto de tres carbonos, ocho hidrógenos y tres oxígenos.

Soluciones:
Glicerol.

Medio de cultivo.

Medio líquido YPD.	
VF: 250 mL	
Ingredientes:	Cantidad

Agua	250 mL
Extracto de levadura.	2.5 g
Peptona.	5 g
Dextrosa	5 g

Preparación:

1. Colocar en un matraz volumétrico la levadura, peptona y la dextrosa, con 300 mL de agua y fundir en un horno de microondas.
2. Hacer alícuotas de 10 mL en tubos de 50 mL.
3. Poner un tapón con torunda de algodón a cada uno de ellos.
4. Esterilizar durante 15 minutos en calor húmedo.

Condiciones de almacenamiento

Se recomienda hacer uso del medio al término de su elaboración.

Materiales:

Guantes de látex	4
Aislados primarios	n

Equipos e instrumentos:

Mecheros de Fisher	Mecker
Campana de flujo vertical	Figursa

Procedimiento:

Esta prueba se realizará a partir de los aislados clínicos obtenidos con medios de aislamiento primario.

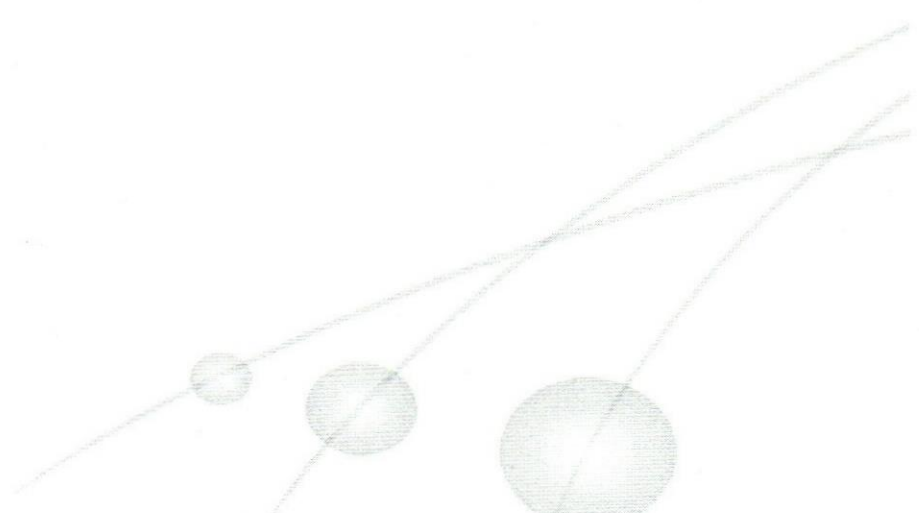
1. Realizar la siembra con un palillo estéril e insertar a un tubo de ensayo que contenga 10 mL de medio YPD y tapar con torunda de algodón estéril.
2. Incubar en agitación constante a 150 rpm y 37°C de temperatura durante 12 hrs.
3. Colectar las células mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min para obtener la pastilla.



4. Remover el sobrenadante, dejando de 100 μ l de medio residual.
5. Añadir 600 μ l de glicerol y vortexear suavemente por 3 s.
6. Almacenar a -70°C , para su conservación.

Expresión de resultados:

Los resultados corresponden a la conservación de los aislados clínicos.



V. Pruebas moleculares.

1. Extracción de ADN de *Candida* spp.

Fundamento: El ADN de una célula se localiza en el interior del núcleo celular, que para obtenerlo es necesario romper la pared celular, liberar al núcleo, extraer el DNA, separarlo de las proteínas y precipitarlo para extraerlo del medio líquido. Este procedimiento se fundamenta en que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. Con el uso de un detergente se lisa la pared celular, liberando el contenido en una disolución amortiguadora. Como esta solución además del ADN contiene otros elementos moleculares que incluye al ARN, se utilizará una enzima RNasa para eliminarlo y alcohol isoamílico para extraer al ADN del medio, precipitándolo al fondo del tubo. En este protocolo se hace uso del Aqua Pure Genomic DNA Kit. (Bio-rad) con técnica modificada

Objetivo: Utilizar el kit de extracción Aqua Pure para obtener ADN genómico en aislados clínicos de *Candida* spp.

Definiciones.

Pastilla: Pequeña fracción de una sustancia endurecida obtenida mediante centrifugación.

Sobrenadante: Es un contenido líquido que aparece en la parte superior del tubo y se obtiene en centrifugación de un medio líquido.

Vortexear: Se le denomina a la acción de agitar una sustancia mediante un agitador de Vórtex.

Símbolos y abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa:	Ribonucleasa
μL	Microlitro

mL	Mililitro
g:	Gramo
YPD	Yeast, peptone, dextrose.

Soluciones

Solución de lisis Genomic DNA
Solución de RNAasa A (4mg/ml)
Solución de precipitación proteica
Condiciones de almacenamiento
Las soluciones pueden almacenarse en un lugar libre de humedad a temperatura ambiente, tal como lo recomienda el fabricante.

Cultivo.

Medio líquido YPD.	
VF: 1000 mL	
Ingredientes:	Cantidad
Agua	250 mL
Extracto de levadura.	2.5 g
Peptona.	5 g
Dextrosa	5 g
Preparación:	
5. Colocar en un matraz volumétrico la levadura, peptona y la dextrosa, con 300 mL de agua y fundir en un horno de microondas.	
6. Hacer alícuotas de 10 mL en tubos de 50 mL	
7. Poner un tapón con torunda de algodón a cada uno de ellos	
8. Esterilizar durante 15 minutos en calor húmedo.	
Condiciones de almacenamiento	
Se recomienda hacer uso del medio al término de su elaboración.	

Materiales:

Tubos Eppendorf de 2.5 mL	50
Guantes de látex	4
Mechero de Fisher	1
Puntas para pipetas 1000 mL	100

Equipos e instrumentos:

Microcentrífuga	Bio-rad
Agitador Vórtex	
Micropipetas de 1-1000 mL	Biomex

Procedimiento:

Colección y manejo de muestras.

1. Inocular una muestra de colonia con un palillo estéril en el tubo con medio líquido YPD.
2. Cultivar a 37°C de temperatura en agitación constante a 150 rpm, durante 12 hrs.
3. Colectar las células mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min para obtener la pastilla.
4. Remover el sobrenadante, dejando de 10-20 µl de líquido residual. Si la pastilla es muy pequeña repetir dos veces más.
5. Vortexear el tubo en forma vigorosa para resuspender las levaduras en el sobrenadante residual. Esto facilitará sobre manera la lisis celular en el paso siguiente.
6. Agregar 300 µl de solución de lisis Genomic DNA a las células resuspendidas y pipetear en forma cuidadosa, levantando y bajando varias veces para lisar las células. Asegurarse de no separar el Genomic DNA. Usualmente no requiere de incubación, sin embargo si después de la combinación, se observan células agrupadas, incubar a 37°C hasta que la solución sea homogénea.

Tratamiento con RNAasa.

7. Agregar 1.5 µl de solución de RNAasa A (4mg/ml) al lisado celular.
8. Homogenizar las muestras por inversión de los tubos 25 veces e incubar a 37°C por 5 minutos. Cabe mencionar que la incubación puede llevarse a cabo durante 60 minutos como máximo.

Precipitación proteica.

9. Agregar 100 µl de solución de precipitación proteica al lisado celular.
10. Vortexear vigorosamente durante 20 segundos a alta velocidad para mezclar la solución en forma uniforme.
11. Centrifugar de 10,000 rpm durante 3 minutos. Las proteínas precipitadas se observan como una pastilla o residuos celulares. Si la pastilla no queda fija, repetir el paso 2 seguido de incubación en hielo por 5 minutos y repetir el paso 3.

Precipitación del ADN.

12. Retirar el sobrenadante que contiene el ADN en un tubo Eppendorf estéril que contenga 300 µl de isopropanol al 100% (2-propanol). Si el ADN obtenido es menor a 1 mg, agregar un transportador de ADN como el glucógeno (recomendación: 0.5 µl de glucógeno 20 mg/ml por 300 µl de isopropanol).
13. Mezclar las muestras por inversión cuidadosamente por 50 veces.
14. Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto; el ADN puede

- transportador de ADN como el glucógeno (recomendación: 0.5 μ l de glucógeno 20 mg/ml por 300 μ l de isopropanol).
13. Mezclar las muestras por inversión cuidadosamente por 50 veces.
 14. Centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto; el ADN puede observarse como una pequeña pastilla blanca.
 15. Desechar el sobrenadante y secar en una toalla absorbente.
 16. Agregar 300 μ l de etanol frío al 70% y centrifugar a 10,000 rpm durante un minuto. Desechar el sobrenadante.

17. Secar con una toalla absorbente por inversión y dejar secar a temperatura ambiente por 30 minutos.
18. Resuspender el ADN en 25 μ L de solución de hidratación.

Expresión de resultados:

La presencia de una pequeña y discreta pastilla en el fondo del tubo es un indicio de ADN (figura 9) el cual deberá corroborar su calidad mediante un gel de electroforesis y su concentración por medio de la relación de absorbancia a 280 y 260 nm por espectrofotometría, mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 50.$$

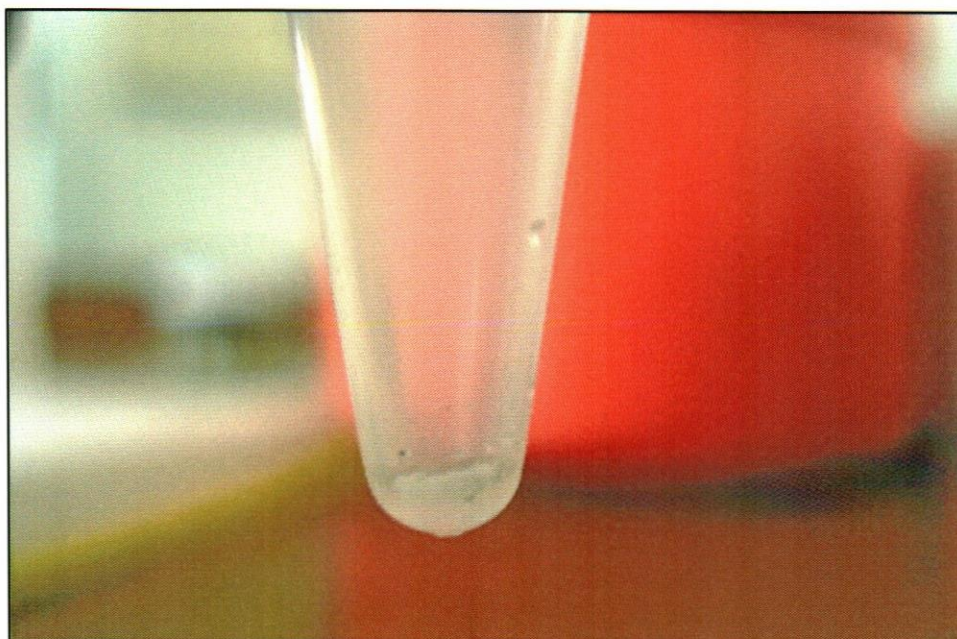


Figura 9. DNA de *Candida spp.* En el fondo del tubo Eppendorf se observa una pastilla muy discreta, la cual en ocasiones apenas resulta visible al ojo humano. (Figura tomada de Monjaraz et al, 2009).

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Fundamento: Esta técnica consiste en la repetición cíclica de tres procesos: a) Desnaturalización de dos cadenas de ADN a una temperatura elevada (95°C) para obtener cadenas monocatenarias; b) hibridación de oligonucleótidos (primers) que complementan a los fragmentos de ADN a amplificar y que requieren disminución de la temperatura (40-65°C); y c) elongación de la cadena a partir de los primers mediante el uso de una Taq polimerasa termoestable (temperatura óptima 72°C) para obtener una cadena bicatenaria nuevamente. Esta reacción permite la obtención de grandes cantidades de ADN a partir de cantidades insignificantes y su uso ha revolucionado substancialmente el campo de la investigación.

Objetivo: Identificar especies de *Candida* spp., mediante la amplificación de una secuencia nucleotídica del gen CaYST1 de *C. albicans*, para el diagnóstico temprano de candidiasis.

Definiciones.

Amplificación: Producción de copias adicionales de una secuencia cromosómica.

Desnaturalización: Es el proceso de separación de una cadena doble de ADN en dos cadenas independientes, generalmente por aplicación de altas temperaturas.

Hibridación: Es la unión del cebador o primer a la secuencia complementaria de la cadena molde del DNA para obtener por amplificación una cadena doble.

Oligonucleótidos: Secuencia corta de nucleótidos donde parte la ADN polimerasa para la síntesis de una nueva cadena de ADN.

Taq polimerasa: Enzima termoestable aislada de *Thermophilus aquaticus* que cataliza la síntesis de una nueva cadena de ADN a partir de una cadena molde.

Símbolos y abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
μL	Microlitro
μg	Microgramo
mL	Mililitro
dNTPs	Deoxinucleótidos

Reactivos

Oligonucleótidos
dNTPs Mix
Polimerasa
Buffer 10X
Agua libre de nucleasas (
ADN moldes.
Condiciones de almacenamiento
Deberán almacenarse a menos 70°C y para su manejo mantener en recipiente con hielo.

Características de oligonucleótidos.

INT1	5'- AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG-3'
INT2	5'- AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC- 3'
Temperatura óptima: 62°C	
Talla del fragmento a amplificar: 310 pb para <i>C. albicans</i> .	

Materiales:

Tubos Eppendorf de 2.5 mL	100
Tubos de Thin Layer	100
Guantes de látex	20
Puntas para pipetas 1-1000 μ L	200

Equipos e instrumentos:

Microcentrífuga	Bio-rad
Agitador Vortex-mixers	Lab Tech
Termociclador	Bio-rad
Micropipetas ajustables de 0 a 1000 μ L	Bio-rad

Procedimiento:

1. Tomar un tubo de Thin Layer para PCR de 500 μ L, colocarlo en hielo y agregar los siguientes reactivos con un volumen final de 20 μ L en el orden siguiente:

Agua bidestilada estéril	13.9 μ L
Buffer 10X estéril (promega)	2 μ L
dNTPs Mix (Promega)	2 μ L
Oligonucleótido INT1	1 μ L
Oligonucleótido INT2	1 μ L
Polimerasa (TaqKara)	0.1 μ L
DNA molde (<i>Candida spp</i>)	500 ng

2. Programar el termociclador a los siguientes parámetros:

Paso 1	95°C	3 min
Paso 2	94°C	60 s
Paso 3	55°C	30 s
Paso 4	62°C	45 s
Paso 5	Repetir 40 veces pasos 2, 3 y 4	
Paso 6	72°C	5 min

3. Resuspender correctamente todos los componentes de la mezcla de PCR, colocar los tubos en el termociclador y correr el programa.
4. Aplicar a 10 μ L de esta solución resultante 5 μ L de buffer de carga, vortexear y correrlo en un gel de agarosa al 1.5 % para visualizar el gel en luz ultravioleta, previa sumersión en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL).

Expresión de resultados:

Los resultados de la amplificación podrán evaluarse en un gel de agarosa teñida con bromuro de etidio donde se observaran bandas de 100-350 pb sugestivos de especies de *Candida*, como se muestra en la figura 10.

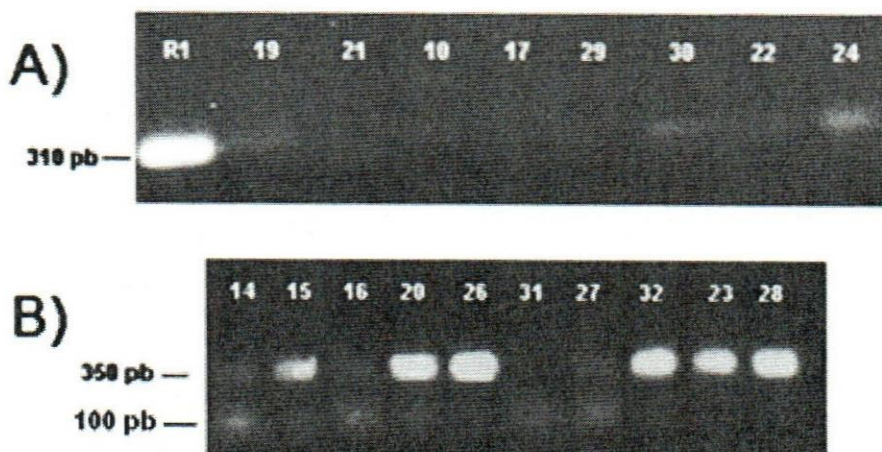


Figura 10. Electroferograma de producto de amplificación de ADN genómico de aislados de *Candida* spp., teñidos con bromuro de etidio. A) Amplicones de 310 pb en *C. albicans*, B) Amplicones de 100 y 350 pb en *C. glabrata*. Otras especies *no albicans* amplifican bandas de 100-350 pb.

3. Electroforesis en gel de agarosa.

Fundamento: La electroforesis en gel de agarosa es una técnica ampliamente utilizada para la separación de fragmentos de ácidos nucleicos o diversas moléculas. Se comporta como un tamiz o filtro molecular que permite la separación de moléculas cargadas en razón de su tamaño y forma al migrar sobre un campo eléctrico.

Objetivo: Determinar los tamaños moleculares mediante electroforesis en gel de agarosa de material nucleico de *Candida spp.*

Definiciones.

Ácidos nucleicos: Son moléculas de alto peso molecular cuyos monómeros son los nucleótidos, donde la información genética se almacena, transcribe y se replica.

Agarosa: Producto natural extraído de algas marinas del genero *Gellidium* y *Gracillaria*, que forma una matriz inerte, no tóxica, termorreversible en agua y utilizada como herramienta en biología molecular, bioquímica y biología celular.

Campo eléctrico: Es un campo de fuerza que se crea por la atracción y repulsión de cargas eléctricas y se mide en voltios por metro (V/m).

Símbolos y abreviaturas.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
μL	Microlitro
mL	Mililitro

Soluciones

Solución de agarosa al 2%	
100 mL	
Ingredientes:	Cantidad
Agua	270 mL
TAE 10X	30 mL
Agarosa	3 g
Preparación:	
1. Pesar 3 g de agarosa y colocarla en un frasco Erlenmeyer de 250 mL.	
2. Agregar 270 mL de agua destilada estéril y 30 mL de TAE 10X.	
3. Agitar la solución y llevar a ebullición hasta fundir la agarosa.	
4. Dejar reposar hasta enfriar a 50°C aproximados en baño de agua para su uso.	

TAE 10X	
Tris base	24.2 g
Ácido acético glacial	5.71 mL
EDTA 0.5 M	10 mL
Agua desionizada estéril	-----
Preparación:	
1. En un matraz Erlenmeyer agregar el Tris base, ácido acético glacial y el EDTA.	
2. Aforar a 500 mL con agua destilada.	
3. Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.	

Condiciones de almacenamiento	
Etiquetar y almacenar a 2-4°C.	

Buffer de carga

Azul de bromofenol	270 mL
Ficol 400	30 mL
EDTA	0.2 M
Agua desionizada estéril	10 mL
Preparación:	
1. Agregar los reactivos en un matraz Erlenmeyer estéril y mezclar suavemente. 2. Distribuir en alícuotas de 2 mL en tubos Eppendorf.	
Condiciones de almacenamiento	
Etiquetar y almacenar a -70°C.	

Materiales:

Tubos Eppendorf de 2.5 mL	100
Probetas de 100, 200 y 500 mL.	2
Matraz Erlenmeyer 250 mL	4
Guantes de látex	20
Puntas para pipetas 1-1000 µL	200

Equipos e instrumentos:

Microcentrifuga	Bio-rad
Agitador Vortex-mixers	Lab Tech
Cámara y equipo de electroforesis	Bio-rad
Balanza analítica	FACT
Horno de microondas	LG
Fuente de poder para electroforesis	Labnet
Transiluminador UV	Biotech
Micropipetas ajustables de 0 a 1000 µL	Bio-rad

Procedimiento:

Preparación del gel.

1. Verter la solución de agarosa en el molde indicado, sellado en los extremos y con el peine instalado.

2. Dejar polimerizar durante 20 minutos aproximadamente y retirar los sellos y el peine cuidando de no romper los pocillos.
3. Llenar la cubeta de electroforesis con el tampón TAE 1X, hasta cubrir todo el gel.

Preparación de las muestras.

1. En un tubo realizar una dilución con 3 µl de ADN problema y 7 µl de buffer de carga, centrifugando a 10,000 rpm durante 5 s.
2. Cargar la pipeta con el volumen completo de cada tubo Eppendorf y depositar cuidadosamente en los pocillos del gel en forma ordenada.
3. Llenar los pocillos de los extremos con 10 µl de estándares de peso molecular.
4. Aplicar a corriente continua y correr el gel a 150 V (10 v/cm).
5. Al término de la electroforesis, sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio por 15 minutos y visualizar con un transiluminador de luz ultravioleta fotodocumentando los resultados.

Expresión de resultados:

La presencia de bandas de 100-350 pb serán indicativos de positividad a *Candida spp* como se mostró en la figura 9.

III. Referencias.

1. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 3rd edit. New York, USA; 2001.
2. Ausubel F, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in molecular biology. 4a edición. New York, USA; 1999.
3. Bucemi L, Arechavala A, Negroni R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis en pacientes del Hospital de enfermedades infecciosas J. Muñiz. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 1277-181.
4. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. Annals Clin Microbiol and Antimic 2003; 2:8.
5. CandiSelect TM 4. Bio-RAAd. Gelosa/ Medio de aislamiento selectivo de levaduras, de identificación directa de *Candida albicans* y presuntiva de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*. 63746.
6. Castro C, Martín E. Diagnóstico de la Infección fúngica por levaduras del Género *Candida*: *C. dubliniensis*. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_mico/pdf/Cdublinien.pdf
7. Brooks FG, Butel JS, Jawetz JL. Microbiología Médica de Jawest, Melnick y Adalberg. 18^a edición, Edit. Manual moderno, 2005.
8. Fernandez A, Fernández M. El pH vaginal y su importancia clínica. Ginecol Obstet Clin 2004; 5:75-80.
9. Casanova G, Reyna J, Ortiz FJ. La ecología vulvovaginal y el papel de los *lactobacillus*, en: Manual para el manejo de las infecciones vulvovaginales. Janssen Cilag. 1^a Ed, México. 2007.
10. Suarez Ll, Perurena MR. Identificación de levaduras de exudados vaginales: Características clínicas asociadas a candidiasis. Rev Cubana Med Trop 2004; 56.
11. Giraldo P, Nowaskondki A, Gómez F. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Obstet gynecol 2000; 95: 413-416.
12. Díaz R, Gamazo C, López I. Manual práctico de Microbiología. 3^a ed. Barcelona, España. Masson S.A; 1996.
13. Alvarez P. Asesorías durante la dirección del proyecto de tesis "Estudio epidemiológico-molecular de la prevalencia de *Candida* spp., en mujeres de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Universidad Politécnica de Chiapas, 2007.
14. Ausubel F, Brent R, Kingston RE. Short Protocols in molecular biology. 4^a edición. New York, USA; 1999.
15. Baquero C, Montero M, Sentandreu R, Eulogio V. Identification of *Candida albicans* by polimerase chain reaction amplification of CaYST1 gene intrón fragment. Rev Iberoam micol 2002; 19:80-83.



16. Aqua Pure Genomic DNA Kit. Manual de usuario. Catálogo # 732-6340, Biorad Laboratories.
17. Pérez M, Hartung de C, Roselló A. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. Rev. Soc Ven Microbiol 2003; 23.
18. Linares MJ, Solís F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, Revista Iberoam de Micol 2001; 11.1-11.18.

