



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE
LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* AISLADAS DE
PACIENTES.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA) CON OPCIÓN EN:
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

QFB JOAQUIN EDUARDO CAMACHO PROO

ASESOR (ES) DE TESIS:

M. en C.. ALEJANDRA PAULA ESPINOSA TEXIS

PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE 2017



Puebla, Pue. a 18 de enero 2018.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Joaquín Eduardo Camacho Proo**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Identificación y caracterización fenotípica de levaduras del género *Candida* obtenidas de pacientes"

A nuestro juicio, el alumno **Joaquín Eduardo Camacho Proo** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

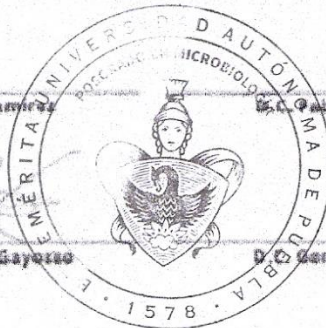
Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. María Lilia Cedillo Ramírez

D.C. Patricia Arvelino Flores

D.C. Patricia Manzano Gayosso

D.C. Germán Larriba Calle





Puebla, Pue. a 18 de enero 2018.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Joaquín Eduardo Camacho Proo**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Identificación y caracterización fenotípica de levaduras del género *Candida* obtenidas de pacientes"

A nuestro juicio, el alumno **Joaquín Eduardo Camacho Proo** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

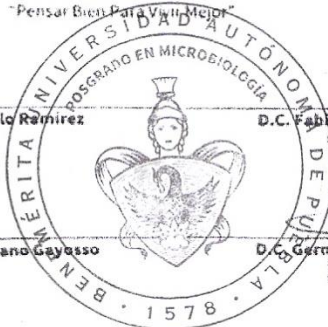
Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. María Lilia Cedillo Ramírez

D.C. Fabiola Avelino Flores

D.C. Patricia Manzano Gayosso

D.C. Germán Larriba Calle



24-01-2018

Escuela de Ciencias Biológicas y Químicas
Instituto de Ciencias Exactas y Naturales

Ciudad de Puebla, Pue. a 18 de enero de 2018.
CICM-ICUAP
posgrado@icm.uap.mx



Puebla, Pue. a 18 de enero 2018.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Joaquín Eduardo Camacho Proo**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Identificación y caracterización fenotípica de levaduras del género *Candida* obtenidas de pacientes”


A nuestro juicio, el alumno **Joaquín Eduardo Camacho Proo** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. María Lilia Cedillo Ramírez


D.C. Fabiola Avelino Flores


D.C. Patricia Manzano Gayosso


D.C. Germán Larriba Calle

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Esta tesis fue realizada con el apoyo de una Beca Nacional otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de agosto de 2015 a julio de 2017.”



La conclusión de esta tesis fue posible gracias a una Beca proporcionada por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por parte del proyecto titulado Epidemiología, patogenicidad y virulencia de los hongos dimórficos *Candida* y *Sporothrix* con clave ESTA-NAT1-I.



AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP. En especial al laboratorio de Micología Médica, por todas las facilidades para la realización de este proyecto.

A la M. C. Alejandra Paula Espinosa Taxis por permitirme ser su alumno por su tiempo dedicado a la elaboración de este proyecto, por todos sus consejos, por su comprensión, por su paciencia y por incentivar-me a ser mejor profesionalista cada día.

A la M. C. María Isabel García Abúndis por todo el apoyo a este trabajo, por sus enseñanzas en el laboratorio de micología del Hospital Universitario de Puebla y por su confianza.

Al comité revisor de ésta tesis, por su paciencia, sus consejos y su atención en la revisión de este trabajo.

A todos mis profesores del Posgrado por sus enseñanzas y consejos.

A mi familia y amigos que de igual manera me alientan a ser mejor persona.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todas las personas han estado junto a mí durante de todo este proceso de aprendizaje, Familia, amigos, a mi novia, compañeros, profesores

Índice

1. Resumen
2. Introducción
 - 2.1. Descripción del género *Candida*
 - 2.2. Diagnóstico
 - 2.2.1. Identificación por CHROMagar *Candida*®
 - 2.2.2. Tubo germinal
 - 2.3. Tratamiento y resistencia a antifúngicos
 - 2.4. Formación de biopelícula
 - 2.5. Switching fenotípico
3. Antecedentes
4. Justificación
5. Objetivos
 - 5.1. Objetivo general
 - 5.2. Objetivos particulares
6. Diagrama de trabajo
7. Metodología
 - 7.1. Aislamiento de muestras
 - 7.2. Crecimiento en medios de cultivo
 - 7.3. Producción de tubos germinales
 - 7.4. Identificación por CHROMagar® *Candida*
 - 7.5. Formación de biopelícula
 - 7.6. Inducción del switching fenotípico.
 - 7.7. Identificación por PCR
 - 7.8. Resistencia a antifúngicos
8. Resultados

- 8.1. Descripción de aislados clínicos
- 8.2. Cepas control
- 8.3. Identificación de los aislados
 - 8.3.1. Métodos convencionales
 - 8.3.1.1. Siembra en agar Dextrosa-Sabouraud y Mycosel
 - 8.3.1.2. Prueba de producción de tubo germinal
 - 8.3.1.3. Siembra en CHROMagar Candida®
 - 8.3.2. Métodos moleculares
 - 8.3.2.1. PCR especie-específica
 - 8.3.2.2. Descripción de “primers”.
 - 8.3.2.3. Identificación de los aislados
- 8.4. Pruebas de resistencia a los antifúngicos
- 8.5. Producción y cuantificación de biopelícula
- 8.6. Producción de Switching fenotípico
- 9. Discusión
- 10. Conclusiones
- 11. Perspectivas
- 12. Bibliografía
- 13. Anexos

Índice de tablas

Tabla 1. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida spp.*

Tabla 2. Cepas control

Tabla 3. Identificación de muestras aisladas por el método de siembra en CHROMagar.

Tabla 4. Descripción de “primers” utilizados en la PCR

Tabla 5. Número de muestras identificadas en CHROM agar comparado con las identificadas por PCR

Tabla 6. Resultados del perfil de resistencia a antifúngicos de las cepas resistentes.

Tabla 7. Resultados de la prueba de Switching fenotípico.

Índice de figuras

Figura 1. Gráfica de comparación porcentual de las cepas aisladas de diferentes sitios anatómicos

Figura 2. Prueba positiva para tubo germinal o filamentación. A y B Levaduras de *Candida albicans*.

Figura 3. *Candida albicans* (verde) y *C. glabrata* (crema) en CHROMagar.

Figura 4. *C. tropicalis* en CHROMagar.

Figura 5. Levaduras de *Candida sp.*, en CHROMagar a las 48 horas de crecimiento.

Figura 6. Gel de agarosa, amplificación de ITS1 y 2.

Figura 7. Comparación entre aislados resistentes y sensibles.

Figura 8. Absorbancia promedio resultado de la cuantificación de biopelícula.

Figura 9. Formación de biopelícula *Candida albicans*. 48 horas 100x.

Figura 10. Biopelícula de *C. albicans* observada a las 48 horas teñida con cristal violeta.

Figura 11. Switching fenotípico (día 7), *C. tropicalis* en medio Lee más floxina B y N-acetilglucosamina.

Figura 12. Switching fenotípico (día 15) *C. tropicalis* en medio Lee más floxina B y N-acetilglucosamina.

Figura 13. Switching fenotípico, levaduras de *C. tropicalis* objetivo 40x.

Figura 14. Switching fenotípico, levaduras de *C. tropicalis* objetivo 100x.

1. Resumen

En años recientes el aislamiento de especies de *Candida* no-*albicans* ha aumentado, la incidencia de estas especies está en función de su distribución geográfica y el grupo de pacientes en estudio.

Con la finalidad de conocer la frecuencia de levaduras de *Candida* no-*albicans*, se tomaron 74 muestras de diferentes sitios anatómicos (uñas, orina, vagina, y faringe entre otros) de pacientes con diagnóstico de candidosis. Se realizaron exámenes directos y cultivos en agar glucosa Sabouraud. Los cultivos fueron identificados y caracterizados mediante formación de tubos germinales, el crecimiento en CHROMagar, la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 del RNA ribosomal, y la sensibilidad a antifúngicos convencionales (anfotericina B, ketoconazol y fluconazol, clotrimazol).

En este estudio se identificaron 6 muestras de *Candida tropicalis*, 47 de *Candida albicans*, 9 de *Candida glabrata* y 12 muestras que no se pudo identificar la especie.

Veintiseis aislados de *C. albicans* formaron tubos germinales, en *C. tropicalis*, *C. glabrata* no se observaron estas estructuras. Sólo 8 cepas de los 74 aislados no formaron biopelículas.

Ocho muestras de *C. albicans* mostraron resistencia a antifúngicos convencionales, 4 de *C. tropicalis* y 1 de *C. glabrata* también presentaron resistencia. Sólo 5 cepas de *C. tropicalis* fueron positivas para la prueba de switching fenotípico.

La identificación adecuada de la especie de *Candida* aislada a partir de las muestras clínicas es de suma importancia, con el fin de corroborar el diagnóstico clínico, obtener un diagnóstico micológico preciso e instaurar un tratamiento antifúngico adecuado.

2. Introducción

Las micosis oportunistas son cada vez más frecuentes en la práctica clínica, afectando especialmente a sujetos con grados variables de inmunocompromiso, como lo son pacientes con infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o enfermedades hematológicas malignas entre otras. Además, se presentan en forma secundaria a tratamientos agresivos como cirugía mayor, terapia anti retroviral, quimioterapia, y tratamientos antimicrobianos de amplio espectro (Ostrosky – Zeichner et al., 2002; Adigüzel et. al., 2010; Nakayama et al., 2010).

Las infecciones producidas por hongos, principalmente por especies del género *Candida* spp., se han transformado en un problema creciente en servicios de salud, pues su incidencia se ha incrementado un 40% entre los años 1980 y 1990. Estas infecciones ocupan el cuarto lugar en prevalencia, por lo que son de gran importancia médica (Ostrosky et al., 2006). La infección causada por cualquiera de las especies de este género se denomina candidosis y sus manifestaciones clínicas son extremadamente variables. Se han identificado más de 200 especies de este género; sin embargo, sólo doce son de interés médico, siendo *Candida albicans* la de mayor incidencia. Sin embargo, en México en los últimos 15 años se reportan un mayor número de infecciones causadas por las especies *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Chai et al., 2010; Negri et al., 2009).

2.1. Descripción del género *Candida*

Dentro de la División *Ascomycota*, orden *Saccharomycetales* se encuentra el género *Candida*, caracterizado como hongo levaduriforme o levaduras. Las levaduras del género *Candida* se caracterizan por presentar células globosas, ovoides, cilíndricas o elongadas de 2.5 x 4 x 6 micras que se producen por gemación, muchas de las especies forman pseudomicelio.

Las células del pseudomicelio se originan también por gemación y se distinguen del micelio verdadero porque este último no está constreñido a nivel de los septos que delimitan las células de *Candida* (Perea-Ramos et al., 2000).

Candida albicans es el patógeno por excelencia del género, pues corresponde a la especie más aislada en muestras clínicas señalando que esta especie se encuentra como comensal en personas aparentemente sanas (Odds et al., 1998). A pesar de que *C. albicans* sigue

siendo la especie más aislada en pacientes, se observan variaciones considerables, en América del Norte hay un claro predominio de *C. glabrata*, (Colombo *et al.*, 2003) en cambio en América del Sur se encuentra principalmente *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Hajjeh *et al.*, 2004). También se han encontrado otras 13 especies ocasionando éste tipo de infecciones, muchas de las cuales han sido consideradas re-emergentes, entre ellas *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *C. kefyr* y *C. dubliniensis* (Pfaller, 2012; Pfaller *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2003) Sin importar que la frecuencia de éstas últimas es baja, su importancia radica en el grado de resistencia que presentan a muchos de los antifúngicos que se utilizan como terapia en los servicios de salud (Silva *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2002).

2.2. Diagnóstico

No existe estándar de oro para el diagnóstico de *Candida* en México pero las herramientas o técnicas de diagnóstico más utilizadas son las siguientes (Castañón-Olivares, 2015):

- Examen directo en fresco. Orina, líquido cefalorraquídeo, materia fecal o agregando KOH al 15% en muestras de esputo, lavado/cepillado bronquial y/o macerados de fragmentos de tejido.
- Frotis de cualquiera de los productos biológicos mencionados, teñidos con Gram.
- Cultivo en agar dextrosa Sabouraud con y sin cicloheximida.
- La PCR en sangre reduce el tiempo de diagnóstico con una sensibilidad de 95% y especificidad de 92%.
- Utilización de medios de cultivo cromogénicos (agar BIGGY/Nickerson, agar Pagano-Levine, CHROMagar *Candida*®, CANDI-SELECT®, etc.).
- Formación de tubo germinativo (filamentación) en levaduras cultivadas en suero humano a 37°C.
- Asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados (auxanograma: manuales y automatizados).
- Fermentación de carbohidratos (zimograma).

- Serotipificación.

2.2.1. Identificación por CHROMagar Candida®

El medio de cultivo CHROMagar® *Candida* es de gran utilidad para el estudio de la morfología y coloración de las colonias obtenidas, este es un medio diferencial que facilita el aislamiento y la identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*; (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) por otro lado facilita el reconocimiento de mezclas de levaduras en aislamientos primarios. Estos hallazgos se basan en el contraste de color de las colonias producido por las reacciones enzimáticas específicas con el sustrato cromogénico. (López-Martínez *et al.*, 1995).

Este medio es una mezcla cromógena patentada y está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de diferentes colores al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con un mínimo de pruebas de confirmación.

2.2.2. Tubo germinal

La formación de tubo germinales es un criterio morfológico para la identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* pero no es posible diferenciar entre las dos especies a través de este método. (López-Martínez *et al.*, 1995).

Esta estructura es el estado inicial de la formación de la hifa que consiste en la extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, el ancho del tubo es la mitad de la célula madre y su longitud es tres veces mayor (López-Martínez *et al.*, 1995).

C. albicans puede exhibir una forma de célula de levadura típica, reproduciéndose por gemación, o una formación de tubo germinal que se extiende desde la levadura. La formación del tubo germinal representa una etapa esencial para la virulencia. Se ha demostrado que la formación del tubo germinal es una característica importante en la virulencia de *C. albicans* en modelos animales de infecciones sistémicas y de la mucosa (Munin *et al.*, 2007)

Las especies *C. albicans*, *C. dubliniensis* y algunas otras son capaces de formar esta estructura; por otro lado *C. tropicalis* puede producir un proceso similar pero con una zona

de constricción adyacente a la célula madre, que en este caso sería la formación de pseudomicelio. (López-Martínez *et al.*, 1995).

La capacidad de *Candida albicans* para alterar sus células desde blastocondias (fase de levadura) hasta hifas tabicadas continuas (fase micelial) es de interés por varias razones. Primero, la conversión morfológica constituye un modelo experimental útil de cambio del desarrollo en un eucariota relativamente simple. En segundo lugar, los elementos de hifas cortas (tubos germinales) pueden ser importantes en la adherencia de los organismos al epitelio del huésped. Finalmente, porque los organismos de fase micelial se han encontrado en tejidos infectados (Ponton, 1986).

2.2. Tratamiento y resistencia a antifúngicos

Algunos antifúngicos comúnmente utilizados en el tratamiento de micosis por *Candida* son Anfotericina B, Miconazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina, micafungina y nicomizina z, 5-FC (López-Martínez *et al.*, 1995).

En los últimos años se aísla cada vez con mayor frecuencia cepas de levaduras resistentes o con susceptibilidad disminuida o a los antifúngicos (Vélez-García-Nieto *et al.*, 1999).

La introducción de nuevos agentes antifúngicos facilitó un abordaje más agresivo en la profilaxis y tratamiento de infecciones fúngicas en la década pasada pero favoreció la emergencia de organismos resistentes. La presión de selección debido a la continua exposición a azoles parece tener un rol esencial en el desarrollo de resistencia en *Candida* spp., (Vélez-García-Nieto *et al.*, 1999).

A diferencia de los agentes antibacterianos los mecanismos de resistencia a los antifúngicos son poco conocidos, sin embargo tiene importantes consecuencias en la prevención y el tratamiento. Se han encontrado diferencias entre los perfiles de resistencia no solo en las diferentes especies de hongos, sino también entre los distintos aislamientos de la misma especie (Vélez-García-Nieto *et al.*, 1999).

La resistencia a antifúngicos puede ser clínica o in vitro siendo la primera consecuencia fundamental del bajo nivel del fármaco en sangre o al severo grado de inmunosupresión del paciente. La resistencia in vitro puede ser primaria, donde la levadura es naturalmente

resistente, por ejemplo la resistencia intrínseca que presenta *C. krusei* frente a fluconazol. También puede ser secundaria, donde cepas susceptibles se transforman en organismos resistentes debido al contacto previo con el antimicótico o a cambios a nivel molecular del hongo. Este último tipo de resistencia, inusual en el pasado, es hoy el más frecuente y se observa principalmente en cepas de *C. glabrata.*, (Vélez-García-Nieto *et al.*, 1999).

2.3. Formación de biopelícula

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos embebida dentro de una matriz exopolimérica (polisacáridos, proteínas y DNA) adherida a una superficie. (Alem *et al.*, 2006).

La capacidad de formación de biopelículas puede conferir a las especies de *Candida* una ventaja ecológica, ayudando a la supervivencia como comensales y patógenos de los humanos al permitirles evadir los mecanismos inmunes del huésped, resistir el tratamiento antifúngico y resistir la presión competitiva de otros microorganismos. La formación de biopelículas en especies de *Candida*, además de ser posiblemente un factor clave para la supervivencia de estas especies, también puede ser responsable de que estén particularmente bien adaptadas a la colonización de tejidos y dispositivos utilizados en la práctica clínica (Silva *et al.* 2009).

La composición química de la biopelícula que forma *C. tropicalis* en concentración porcentual es de un 27% de hexosamina, 3.3% de carbohidratos incluyendo un 0.5% de glucosa, 3.3% de proteínas 0.2% de fósforo y 1.6% de ácido úrico (Alem *et al.*, 2006).

2.4. Switching fenotípico

Entre los factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de *Candida* se encuentra el switching fenotípico que ofrece variabilidad dentro de las poblaciones colonizadoras con el fin de adaptarse a los retos en diferentes entornos (Soll, 2009). El Switching fenotípico representa un estado epigenético alternativo que ocurre en una pequeña fracción de la población y es aleatorio y reversible. Este evento se manifiesta como una morfología colonial alterada, que se produce a un ritmo que es mayor que la tasa de

mutación somática. El switching fenotípico se describió originalmente en cepas de *C. albicans*, pero también se sabe que existe en otras especies de *Candida*, incluida *C. tropicalis*. Se ha demostrado que el cambio regula una serie de características fenotípicas implicadas en la patogénesis de *C. albicans*, mientras que en *C. tropicalis* se ha demostrado que afecta la formación de biopelículas y regula un críptico programa de interacción sexual (Xie et al 2012). En general el switching fenotípico se define como el cambio reversible manifestado como alteración de la morfología de colonias a una tasa más alta que la tasa de mutación somática (Soll, 1992). El switching fenotípico se han estudiado principalmente en *C. albicans* (Slutsky et al, 1985;.. Soll et al., 1993), pero también se sabe que existe en otras especies de *Candida*, tales como *C. tropicalis*, (Soll et al., 1988) *C. parapsilosis* (Lott et al., 1993), *C. lusitaniae* (Yoon et al., 1999) y *C. glabrata* (Lachke et al., 2000, 2002).

3. Antecedentes.

En 1998 Giusiano G.E. y Mangiaterra M.L. evalúan el crecimiento de 546 cepas de levaduras del género *Candida* (aisladas de pacientes) en CHROMagar *Candida*. calificando a este medio como un método para la rápida diferenciación y como medio para la identificación presuntiva de levaduras del género *Candida*.

Vazquez Rechy en 2007 aísla de pacientes con pie diabético *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermonii* y *parapsilosis*.

En 2009 Estrada-Barraza *et al.*, identificaron especies como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* en aislamientos clínicos comparando la eficacia de la siembra en CHROMagar® *Candida* y la técnica molecular de PCR.

Manzanno-Gayosso *et al.*, en 2011 describen la presencia de *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. guilliermondii* en uñas de pacientes con onicomycosis en México.

En 2011 Villarroel-Rodríguez *et al.*, identifican diferentes especies de *Candida*, tales como *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* en exudados vaginales de pacientes en el Hospital Materno Germán Urquidí. Bolivia

Chandra *et al.*, en 2012 incluyeron la formación de biopelículas como factores de virulencia del género *Candida*, indicando además su participación en la resistencia a los antifúngicos convencionales.

En 2012 Cuevas-Barrera *et al.*, observó la formación de switching en *Candida tropicalis*.

En 2015 Muadcheingka y Tantivitayakul identifican *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* y *C. guilliermondii* en cavidad oral de pacientes relacionando su presencia con la alta capacidad de formación de biopelícula de algunas especies.

En 2015 Saludes *et al.*, aíslan especies de *Candida* en líquido ascítico de pacientes cirróticos

En 2015 Klingspor *et al.*, determinaron que de las especies de *Candida* presentes en pacientes quirúrgicos, las especies *C. krusei* y *C. glabrata* presentan una tasa de mortalidad más alta que otras especies.

Flores-González J.C. *et al.*, en 2015 reporta el primer caso de candidosis invasora por *Candida fabianii* detectado por técnicas moleculares en un paciente pediátrico.

En 2015 Fernandes *et al.*, demostraron que la producción de biopelícula de *Candida tropicalis* es altamente resistente a agentes antifúngicos como fluconazol y anfotericina B.

4. Justificación

Candida es un hongo oportunista que se presenta con alta frecuencia, su incidencia está asociada a la resistencia a antifúngicos convencionales y se ha convertido en un problema de salud pública. En los últimos años ha habido una emergencia de especies de *Candida* no *albicans* que antes eran poco comunes como *C. glabrata*, *guilliermondii*, *tropicalis* y *krusei* por lo que se necesitan realizar estudios que indiquen la importancia de estas especies en los entornos intra y extrahospitalario.

La caracterización fenotípica y genotípica de aislados procedentes de pacientes afectados por levaduras del género *Candida* nos podrá permitir contribuir al mejor entendimiento de este género de microorganismos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

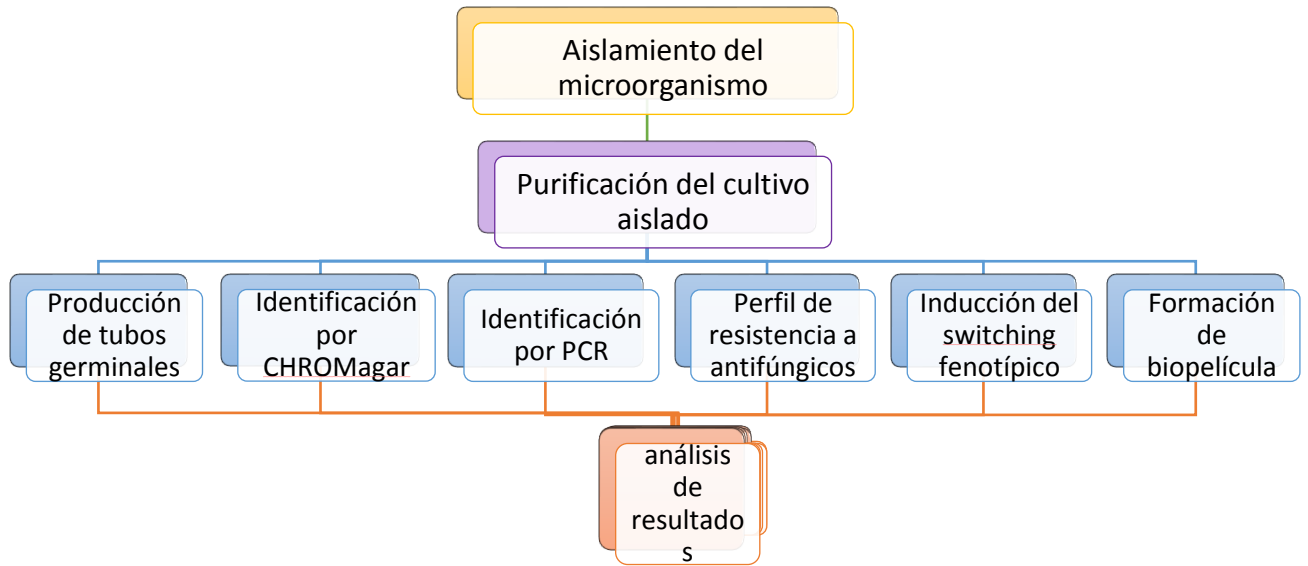
Identificar y caracterizar fenotípica y genotípicamente las especies del género *Candida* obtenidas de pacientes.

5.2. Objetivos particulares

Identificar y caracterizar las especies del género *Candida* obtenidas de pacientes por métodos convencionales. CHROMagar® *Candida*, perfil de resistencia a antifúngicos, producción de tubos germinales, inducción de switching fenotípico y formación de biopelícula.

Identificar las especies de *Candida* obtenidas de pacientes por la técnica de PCR.

6. Diagrama de trabajo



7. Metodología

7.1 Aislamiento de muestras

Se tomaron muestras de pacientes con candidosis desde noviembre del 2015 a marzo de 2017. Por una parte se realizó un examen en fresco para observar al microscopio las estructuras parasitarias (levaduras y/o micelio).

Por otra parte se sembró por triplicado en agar Dextrosa-Sabouraud, y se incubó a 37°C durante una semana.

7.2. Crecimiento en medio de cultivo:

Para la realización del cultivo la muestra se colocó en un medio agar glucosa Sabouraud por 7 días a una temperatura de 25 a 30° C. este cultivo se purificó para lo cual se inocularon 4 tubos conteniendo medio Sabouraud líquido, se agregaron 1, 2, 3 y 4 gotas de HCL a cada tubo respectivamente y se incubaran a 37°C por 24 horas.

7.3. Producción de tubos germinales

Para la detección se sembró una asada del cultivo en estudio en 0.5 mL de suero fresco de humano o de conejo se incubó a 37°C por 3 horas y se hizo la lectura al microscopio óptico con el objetivo 40x.

7.4. Identificación por CHROMagar® *Candida*

Una vez purificadas las cepas, se tomó una colonia aislada y se sembró en placas con el medio cromógeno CHROMagar® *Candida*, esta placas se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C, después de este tiempo se revisaron los cultivos diferenciando el color de las colonias y se comparó con lo descrito por los insertos de la marca comercial.

7.5. Formación de biopelícula

Se estandarizaron suspensiones de levaduras (una por cada cepa identificada) a una concentración de 1×10^7 cel/mL en caldo Dextrosa-Sabouraud, y a partir de este se colocó 200 μ L de cada suspensión por triplicado en placas de poliestireno de 96 pocillos. Posteriormente se incubaron a 30° C en movimiento a 90 RPM en una cámara húmeda (recipiente con algodón húmedo tapado) por 48 horas agregando medio estéril a las 24 hrs la cantidad que se haya evaporado hasta obtener un volumen final de 200 μ L.

Transcurrido el tiempo se agregó a cada pocillo 40 μ L de una solución de Cristal violeta al 0.5% sobre el cultivo muy cuidadosamente y se dejó reposar de 15 a 30 minutos posteriormente se centrifugaron las muestras y se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió la biopelícula, para hacer la lectura al espectrofotómetro a 595 nm.

7.6. Inducción del “switching” fenotípico.

Para la determinación de la capacidad de realizar “switching” se partió de cultivos de 24 horas en caldo Sabouraud, a los cuales se le ajustó una concentración de 1×10^6 células; se realizó 3 diluciones seriadas 1:10 de un tubo madre o inicial. De la tercera suspensión obtenida se inocularon por duplicado 50 μ L por la técnica de extendido en superficie en placas Petri con medio Lee con glucosa y Phloxine B (Xie *et al.*, 2012) y medio Lee con N-acetilglucosamina (GluNAc) y Phloxine B respectivamente. Por último se incubaron las placas a 25 °C por 7-15 días para su revisión.

7.7. Identificación por PCR

La identificación por PCR se realizó efectuando la extracción de DNA de los aislados de *Candida* por el método de nitrógeno líquido-fenol-cloroformo. (Hernández; adecuación por Espinosa *et al.*, 2011) empezando por cultivar en medio líquido (caldo YPD) al hongo por 24h a 37°C. Posteriormente se inocularon placas de YPD colocando 1 mL del cultivo previamente crecido en caldo, distribuyendo las levaduras por toda la placa, se incubó a 37°C por 24-48 horas. Se retiró y se secó la masa fúngica colocándola entre dos o más hojas de papel filtro previamente estéril. En un tubo de 2 ml se adicionaron 600 μ L de buffer de lisis. Se adicionó proteinasa K a una concentración final de 200 mg/mL (stock: 20 mg/ml).

En un mortero estéril, se colocó nitrógeno líquido y se adicionó la masa fúngica, se maceró perfectamente hasta obtener un polvo blanquecino y seco. Se adicionó periódicamente nitrógeno evitando que se humedezca el polvo fúngico. Se colocó el polvo en los tubos previamente preparados con la mezcla de buffer de lisis y proteinasa K agitando firmemente hasta obtener una mezcla homogénea. Se Incubó la mezcla a 65°C en un baño de agua por 1 hora posteriormente se añadió 800 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó hasta obtener una muestra de aspecto lechoso. La muestra se centrifugó a 12000 rpm/15 min. Se observaron fases, transfiriendo la fase superior a un nuevo tubo eppendorff, al cual se añadió 0.1 V de acetato de sodio 3M y 2 V de etanol al 100% (frío) y se agitó el tubo por inversión suave hasta visualizar hebras de DNA. Se dejó en incubación a -20°C por 24 h.

Posteriormente se centrifugó la muestra a 12 000 rpm/5 min, para formar el precipitado en el fondo del tubo. Se adicionó 1 mL de etanol al 70% (frío). Agitar por inversión suave y centrifugar a 10 000 rpm/5 min repitiendo 2 veces este paso, se decantó el etanol al 70% y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente.

Se resuspendió en agua destilada estéril y se adicionó RNAsa (1ml de una solución de 100mg/ml) para incubar a 37°C por 1 hora, se guardó el DNA a -20°C.

Posteriormente se realizó PCR especie-específica basada en la detección de regiones conservadas ITS1 e ITS2 del rRNA, mediante los “primers” descritos por Lou y Mitchel en 2002; CAL1, CAL2, CGL1, CGL2, CPA1a, CPA3b, CPA2, CTR1, CTR2.

7.8 Resistencia a antifúngicos

Se realizó el perfil de resistencia de las cepas aisladas de paciente por el método de difusión en disco M44-A (Cantón et al., 2007) con algunas modificaciones y se emplearon los antifúngicos siguientes: Fluconazol 25 mg/disco, Ketoconazol 10mg/disco , Clotrimazol 10mg/disco, y Anfotericina B 100unidades/disco.

Se tomaron como referencia para los cuatro antifúngicos los puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida spp.*, reportados para fluconazol reportados en los métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos: documentos M44-A (Cantón et al., 2007).

Tabla 1. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida spp.*

Antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)			CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
		R	S-DD	S	R	S-DD	S
Fluconazol	25 μg	≤ 14	15 - 18	≥ 19	≥ 64	16 - 32	≤ 8

8. Resultados

8.1. Descripción de aislados clínicos

Se obtuvieron 74 aislados clínicos con diagnóstico positivo para *Candida* provenientes del Hospital Universitario de Puebla, de la Facultad de Estomatología de la BUAP, y algunos aislados clínicos provenientes de la UNAM desde noviembre del 2015 a marzo de 2017 estos aislados fueron de diferentes sitios anatómicos y de las 74 muestras positivas evaluadas encontramos levaduras del género *Candida* en 37 muestras de lecho ungueal, 14 en boca, 11 en exudado vaginal, 7 en exudado faríngeo, 4 en espacio interdental y 1 en hemocultivo estos resultados están descritos en la siguiente grafica siendo los más abundantes los de lecho ungueal.

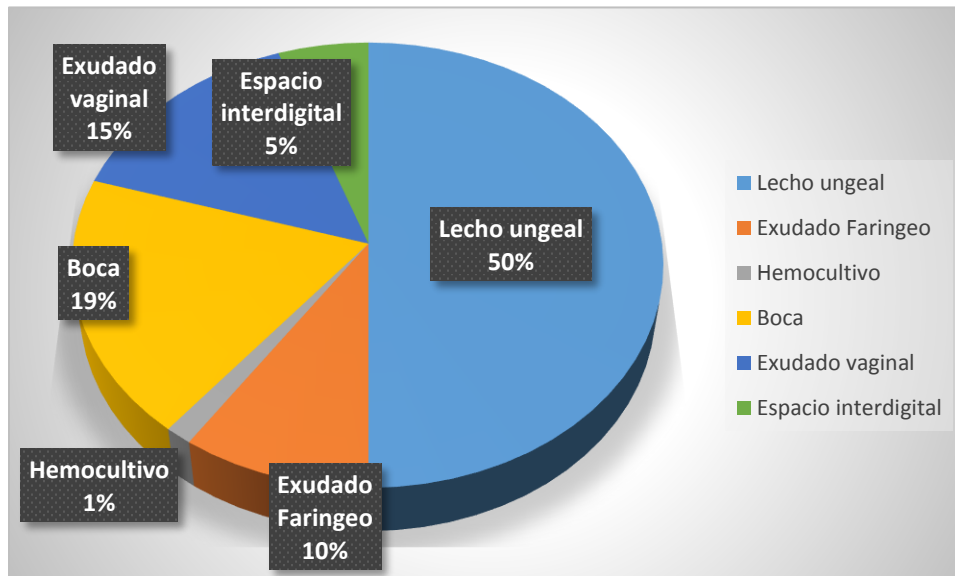


Figura 1. Grafica de comparación porcentual de las cepas aisladas de diferentes sitios anatómicos

De los resultados mostrados anteriormente cabe mencionar que todos los pacientes de los cuales obtuvimos la muestra de lecho ungueal, exudado vaginal y boca presentaron signos y síntomas de candidosis.

8.2. Cepas control

Se utilizaron cepas control para las especies de *Candida albicans*, *glabrata* y *tropicalis* y poder comparar los resultados con las muestras clínicas.

Tabla 2. Cepas control

Especie	Registro
<i>C. albicans</i>	CAF2
<i>C. glabrata</i>	MYA34-04
<i>C. tropicalis</i>	ATTC2001

8.3. Identificación de los aislados

8.3.1. Métodos convencionales

8.3.1.1. Siembra en agar Sabouraud y Mycosel

Se realizó la siembra de las 74 muestras de las cuales 9 no crecieron en agar mycosel, todas las cepas aisladas dieron un crecimiento clásico de las especies del género *Candida* mostrándose colonias cremosas claras y globosas.

8.3.1.2. Prueba de producción de tubo germinal

Sólo 26 aislados dieron positivos para la prueba de filamentación observándose el tubo germinal a las 2 horas de realizarse la prueba. Los resultados se muestran en la tabla general (véase anexo). La figura 2 nos muestra la formación del tubo germinal de algunas de las cepas aisladas de *Candida albicans*.

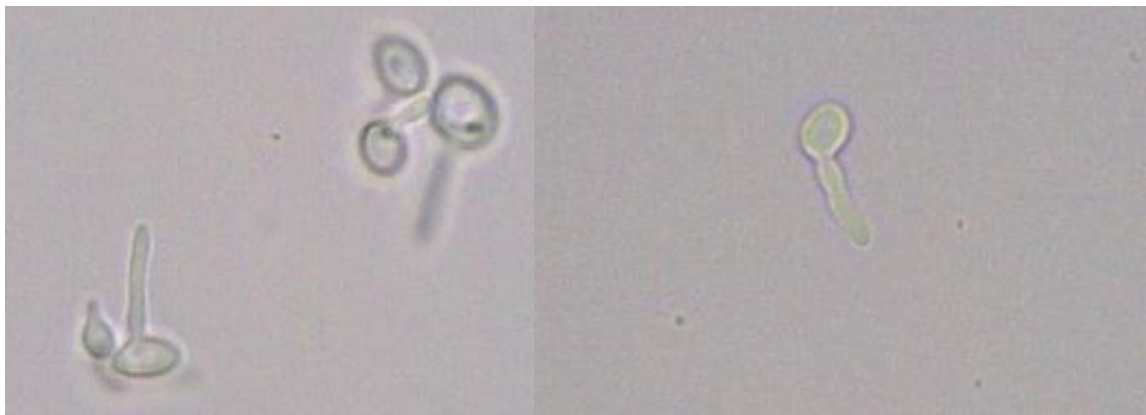


Figura 2. Prueba positiva para tubo germinal o filamentación. A y B Levaduras de *Candida albicans*

8.3.1.3. Siembra en CHROMagar Candida®

Se obtuvieron los siguientes resultados conforme a lo establecido por la marca y se reportan en la tabla 1. Todas las colonias aisladas mostraron un crecimiento característico de colonias de *Candida*, colonias con aspecto cremoso y globoso cambiando el color dependiendo de la especie identificada en este medio.

Tabla 3. Identificación de muestras aisladas por el método de siembra en CHROMagar.

Muestras identificadas		
Coloración de colonia en CHROMagar	Identificación	Cantidad de aislados
AZUL metálico	<i>C. tropicalis</i>	6
VERDE	<i>C. albicans</i>	23
ROSADA*	<i>C. glabrata</i>	45
	Total	74

Cabe mencionar que las colonias rosadas tuvieron un cambio de coloración de las 24 h., a las 48 h. de siembra dando una coloración de cremosa rosada a marrón.

En las figuras 3 y 4 se muestra el crecimiento de las especies encontradas en CHROMagar observándose el crecimiento característico en color verde para *Candida albicans*, azul para *C. tropicalis*. Así como en la figura 5 se muestra el crecimiento de otras especies del género sobre CHROMagar.

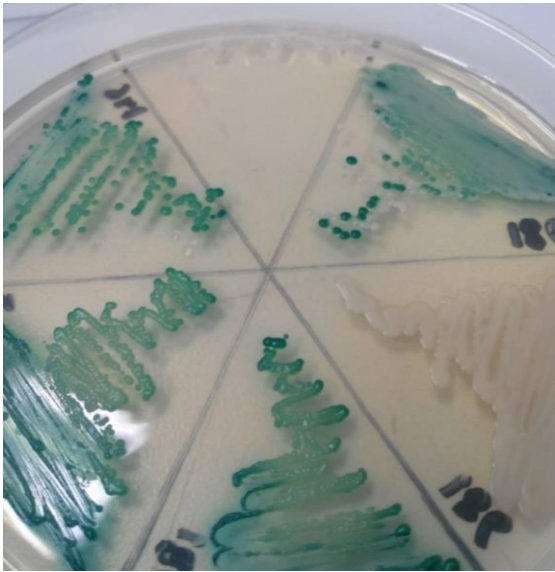


Figura 3. *Candida albicans* (verde) y *C. glabrata* en CHROMagar

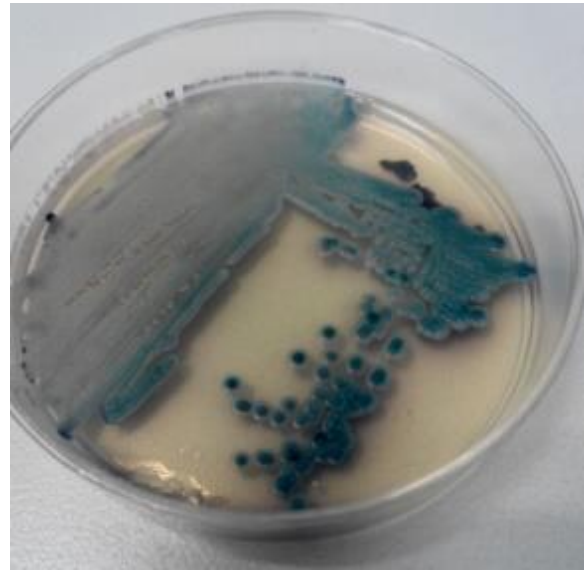


Figura 4. *C. tropicalis* en CHROMagar



Figura 5. Levaduras de *Candida sp.*, en CHROMagar a las 48 horas de crecimiento

8.3.2. Métodos moleculares

8.3.2.1. PCR especie-específica

Para realizar la PCR se hizo la extracción de DNA de las cepas aisladas comprobando la presencia de éste por electroforesis en gel de agarosa.

8.3.2.2. Descripción de primers.

Se utilizaron primers específicos para las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Los primers se describen en la siguiente tabla así como el tamaño de amplicon que obtuvimos para las diferentes especies.

Tabla 4. Descripción de primers utilizados en la PCR

Nombre	Secuencia de nucleótidos	GenBank	Tamaño
CALB1 CALB2	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	L47111, L28817	≈273
CGL1 CGL2	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA	AB032177, AF167993	≈423
CPA1 ^c CPA3 ^f CPA2	TTG GTA GGC CTT CTA TAT GGG GCC AGA GAT TAA ACT CAA CCA A CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC	AF287909, L47109	≈320 ≈300
CTR1 CTR2	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	AF287910, AF268095	≈357

8.3.2.3. Identificación de los aislados

Para la visualización de los amplificados se hizo electroforesis en gel de agarosa a 1.5%. Una vez realizadas las PCR de los aislados se obtuvieron los siguientes resultados comparados con la identificación por siembra en CHROMagar.

Tabla 5. Número de muestras identificadas en CHROM agar comparado con las identificadas por PCR

Especie	Identificación por CHROM agar	Identificación PCR
<i>C. albicans</i>	23	47
<i>C. glabrata</i>	45	9
<i>C. tropicalis</i>	6	6
<i>C. spp</i>	--	12

De estos resultados podemos observar que 12 muestras no pudieron ser identificadas por amplificación de ITS con los primers anteriormente mencionados lo que probablemente tendríamos que probar con primers específicos para otras especies del género.

Todas las cepas de *Candida albicans* identificadas en CHROMagar fueron confirmadas con el método de la PCR, así como las cepas de *Candida tropicalis*.

De las 46 muestras identificadas como *C. glabrata* en CHROMagar sólo 9 pudieron ser confirmadas por PCR y 24 cepas identificadas como *C. glabrata* fueron confirmadas como *C. albicans* por métodos moleculares, lo que puede significar que estas cepas carecen de las enzimas que nos dan un cambio de coloración clásico para la identificación en CHROMagar y que han sufrido cambios genéticos.

En la figura 6 se muestra un gel de agarosa donde se observan las bandas obtenidas para las especies del género *Candida* identificadas por el método de PCR especie-específica, las bandas que se observan son producto de la PCR realizada a partir de muestras aleatorias de las especies previamente identificadas.

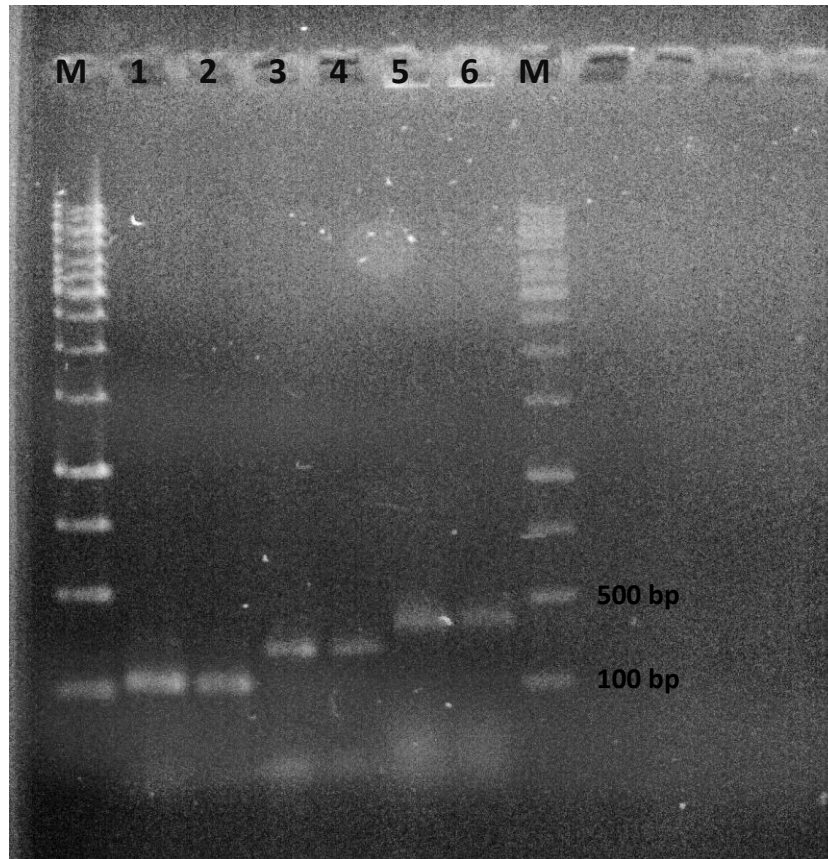


Figura 6. Gel de agarosa, amplificación de ITS1y 2 en *C. albicans* (1,2), *C. tropicalis* (3,4) y *C. glabrata* (5,6), M= marcador de peso molecular

8.4. Pruebas de resistencia a los antifúngicos

Se realizó el perfil de resistencia o sensibilidad a antifúngicos de las cepas identificadas y se obtuvieron los siguientes resultados descritos en la siguiente gráfica.

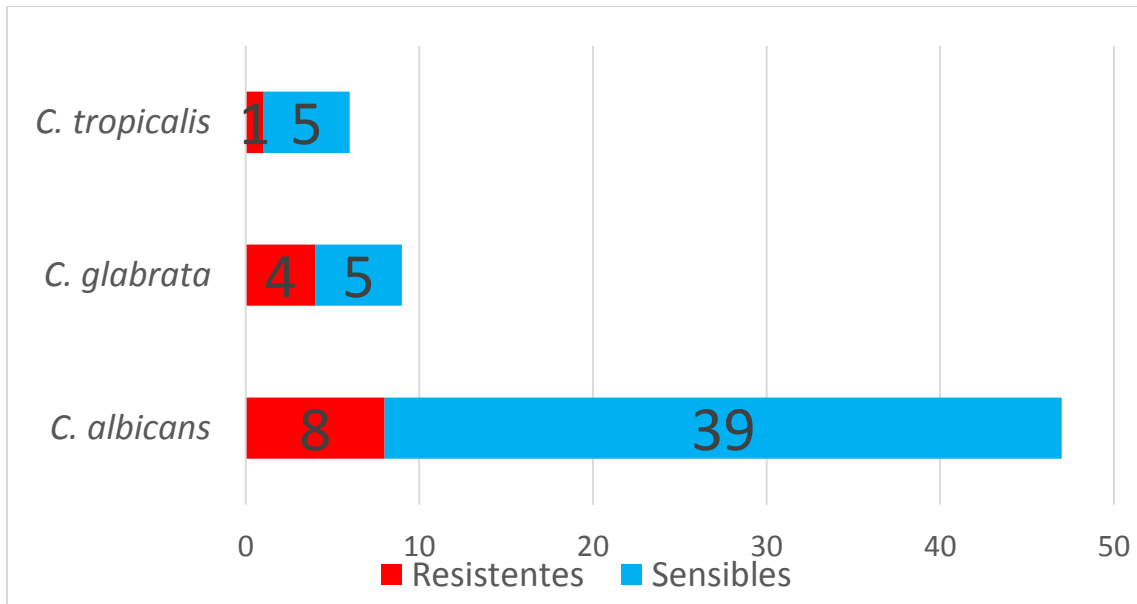


Figura 7. Comparación entre aislados resistentes y sensibles

De las cepas resistentes se describe en la siguiente tabla el número de cepa identificada, a que antifúngico presentó resistencia o sensibilidad, así como su origen clínico. Cabe destacar que por falta de material no se realizó esta prueba con anfotericina B para todas las cepas.

Tabla 6. Resultados del perfil de resistencia a antifúngicos de las cepas resistentes. CC: clotrimazol, KT ketoconazol, FL fluconazol Amp B: anfotericina B. R= resistente, -= Sensible, ND= no determinado.

Cepa	Origen	Especie	CC	KT	FL	Amp B
44	Boca	<i>C. albicans</i>	-	R	R	R
43	Boca	<i>C. albicans</i>	-	-	-	R
46	Boca	<i>C. albicans</i>	-	-	-	R
50	Boca	<i>C. albicans</i>	-	-	-	R

56	Boca	<i>C. albicans</i>	R	-	-	ND
25	Lecho ungueal	<i>C. albicans</i>	R	-	R	ND
2	Lecho ungueal	<i>C. albicans</i>	R	-	-	ND
69	Lecho ungueal	<i>C. albicans</i>	R	-	-	ND
19	Exudado vaginal	<i>C. glabrata</i>	R	-	-	ND
20	Exudado vaginal	<i>C. glabrata</i>	R	-	-	ND
17	Exudado vaginal	<i>C. glabrata</i>	R	R	R	ND
36	Exudado vaginal	<i>C. glabrata</i>	R	R	R	ND
71	Lecho ungueal	<i>C. tropicalis</i>	R	R	R	ND

8.5. Producción y cuantificación de biopelícula

Se realizó el experimento de cuantificación de biopelícula por triplicado para cada cepa, En la figura 8 se compara la absorbancia promedio de biopelícula producida por las especies identificadas *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. De igual manera en la figura 9 se muestra la visualización de la biopelícula producida por *C. albicans* a las 48 horas de haberse iniciado el experimento, en la figura 10 se observa la biopelícula de *C. glabrata* formada a las mismas horas . Cabe mencionar que las cepas aisladas nombradas con los números 1, 2, 34, 45, 49, 54, 63 de *C. albicans* no formaron biopelícula así como la cepa número 12 identificada como *C. glabrata*. (Los promedios de producción de biopelícula por cepa se muestran en el anexo).

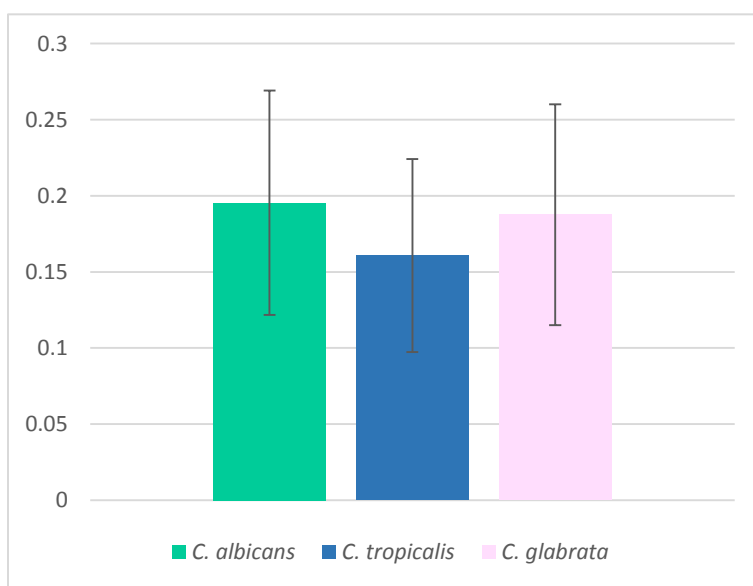


Figura 8. Absorbancia promedio resultado de la cuantificación de biopelícula producida por las tres especies identificadas, *C. albicans* con valor de absorbancia promedio de 0.19539083; *C. glabrata*, 0.187541667 y *C. tropicalis*, 0.16072222.

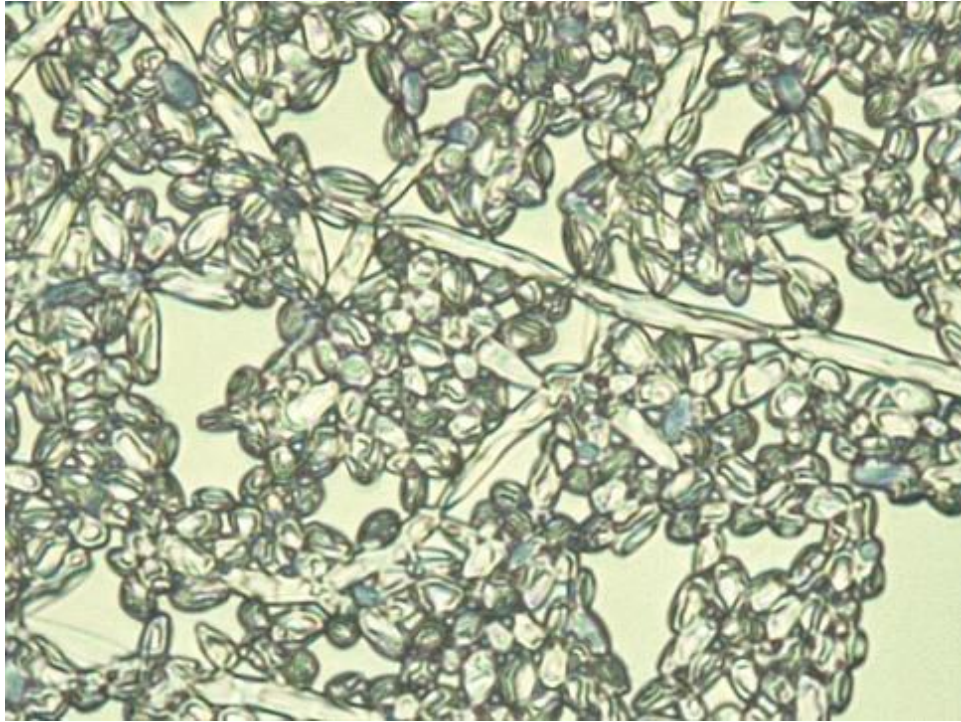


Figura 9. Formación de biopelícula *Candida albicans*. 48 horas 100x.

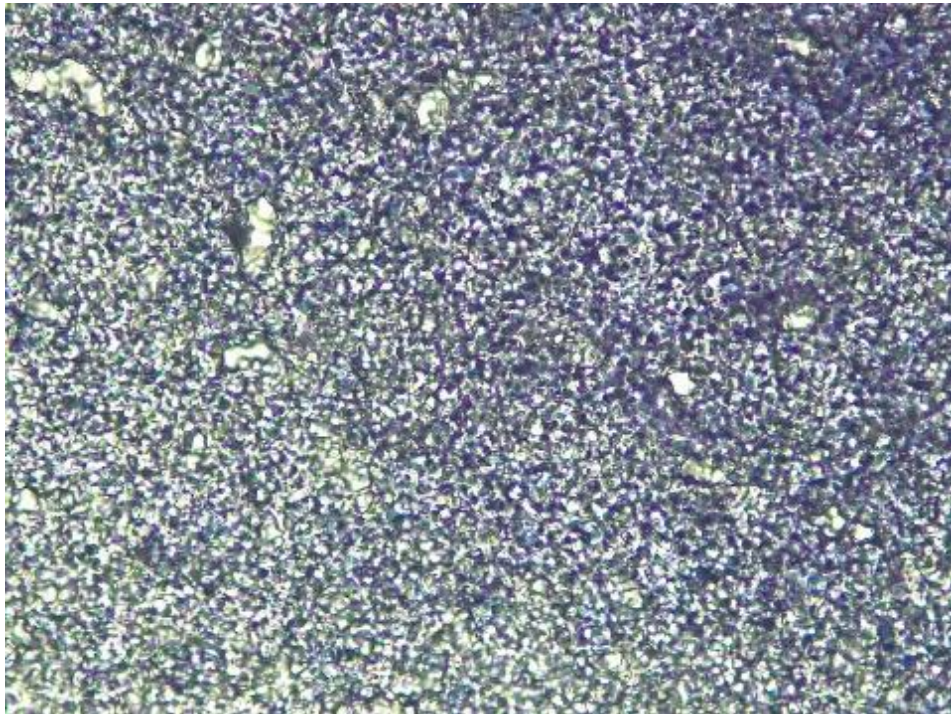


Figura 10. Biopelícula de *C. albicans* observada a las 48 horas teñida con cristal violeta.

8.6. Producción de Switching fenotípico

Para esta prueba se realizó la determinación para los aislados confirmados como *Candida tropicalis*, ya que con la metodología presentada ésta estandarizada para esta especie. De las 6 especies identificadas como *C. tropicalis* sólo la cepa número 7 no se obtuvo los resultados esperados para esta prueba, en cambio las demás presentaron la morfología tanto colonial como microscópica característica de este fenómeno. La tabla 5 presenta los resultados de este experimento mostrando si hubo crecimiento en el medio y si presentó Switching Fenotípico. En la figuras 11 y 12 se observan las colonias “White to opaque” (Blanco-opaco) en medio Lee con glucosamina de diferentes cepas aisladas a diferente tiempo de incubación, se realizó un examen directo de las colonias características de este fenómeno y se observaron con objetivo 40x confirmando el cambio en las células para las cepas aisladas Figura 13 y 14.

Tabla 7. Resultados de la prueba de Switching fenotípico.

Cepa	Medio Lee + PhB + Glucosa Crecimiento/Switching	Medio Lee + PhB + N- Acetilglucosamina Crecimiento/Switching
MYA	+/-	+/+
7	+/-	+/-
10	+/-	+/+
26	+/-	+/+
32	+/-	+/+
70	+/-	+/+
71	+/-	+/+



Figura 11. Switching fenotípico (día 7), *C. tropicalis* en medio Lee más floxina B y N-acetilglucosamina.



Figura 12. Switching fenotípico (día 15) *C. tropicalis* en medio Lee más floxina B y N-acetilglucosamina.

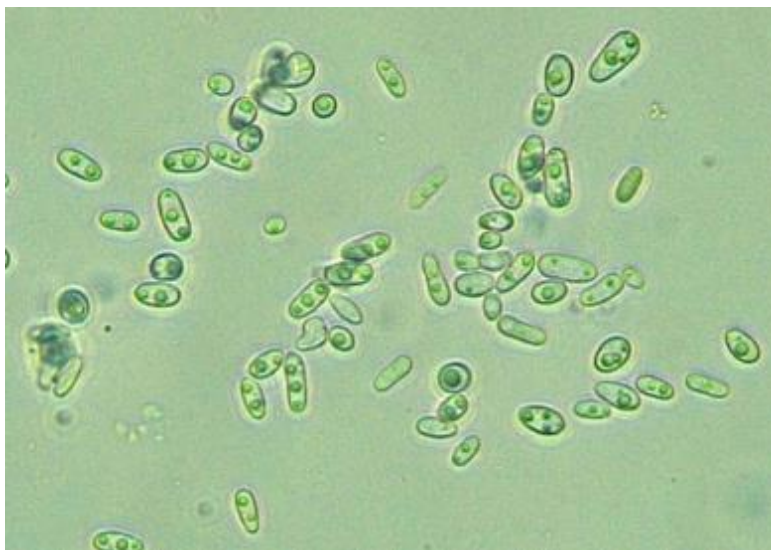


Figura 13. Switching fenotípico, levaduras de *C. tropicalis* objetivo 40x.

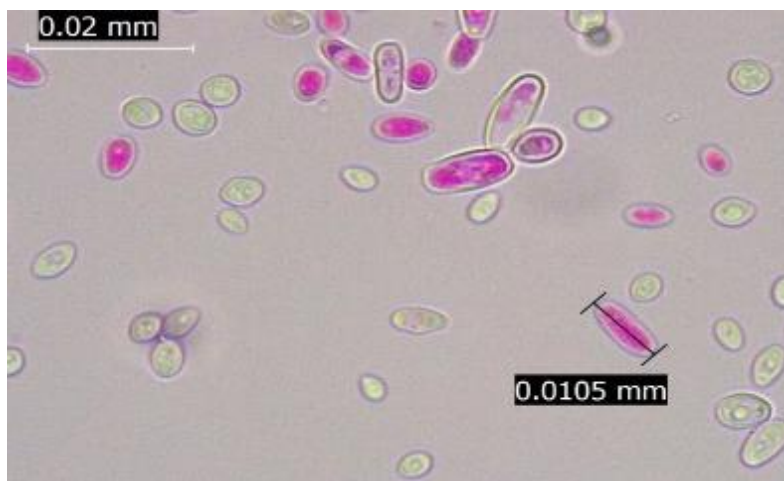


Figura 14. Switching fenotípico, levaduras de *C. tropicalis* objetivo 100x.

9. Discusión

En este trabajo se realizó una comparación de métodos de identificación para levaduras tanto convencionales como moleculares de igual manera se realizó la caracterización de estos aislados dependiendo su capacidad para producir biopelícula, Switching fenotípico y su perfil de resistencia a antifúngicos.

Los resultados obtenidos de los aislamientos provenientes de pacientes con candidosis nos muestran que cualquier tejido puede ser afectado por *Candida*, por lo que existe una gran diversidad de cuadros clínicos, asociados directamente al estado inmunológico del paciente (Pineda-Murillo2015).

En 2009, Fuenmayor realizó un estudio analizando el grado de concordancia entre el diagnóstico clínico y el de laboratorio, apoyado en estudios microbiológicos y demostró que los datos clínicos sólo orientan hacia el diagnóstico clínico presuntivo de una infección, siendo necesario el uso de técnicas microbiológicas para un buen diagnóstico.

Para dar buen diagnóstico las herramientas microbiológicas de identificación pueden ser útiles tal es el caso de los métodos convencionales de identificación como la prueba de producción de tubo germinal pues con los resultados obtenidos pudimos diferenciar presuntivamente 24 aislados de *Candida albicans* de los aislados de especies diferentes a *C. albicans*, las cuales no son productoras de tubo germinal (a excepción de *Candida dubliniensis* que también forma tubo germinal tomando en cuenta los resultados reportados por Makenzie en 1962).

Sin embargo, esta prueba tiene como desventaja que entre un 5 a 10% de los aislamientos de *C. albicans* no producen tubo germinal (Duarte, 2009), habiendo una concordancia con nuestros resultados obtenidos para la identificación por CHROMagar posteriormente realizada ya que hubo aislados que presentaron formación de tubo germinativo pero no una coloración característica resultante de la siembra de la cepa en el medio cromógeno.

No habiendo una concordancia en los resultados de identificación y la producción de tubos germinales podemos comparar nuestros resultados con lo reportado por Duarte en 2009, que menciona que la proporción de células capaces de formar el tubo germinal disminuye progresivamente al aumentar la concentración celular por encima de 10^7 células por mL, con lo cual se pueden obtener resultados falsos negativos, esto debido a que no hubo un inóculo estándar para esta prueba.

Además el mismo autor menciona que existen resultados falsos positivos con las especies de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, debido a la formación de estructuras semejantes a la del tubo germinal.

Posteriormente a la identificación presuntiva por siembra en CHROMagar y la identificación por PCR nuestros resultados muestran que hay una variación de porcentaje de identificación bastante grande, habiendo un porcentaje de 49% de cepas que fueron identificadas en CHROMagar como *C. glabrata* las cuales posteriormente fueron confirmadas como *C. albicans* y 12 cepas no se pudieron identificar por el método de PCR clasificándolas sólo como *Candida spp.* Es decir que se obtuvo un rango de sensibilidad del método de CHROMagar del 67% en este trabajo no se comparó el método de la PCR con otros métodos de identificación por lo que su porcentaje de sensibilidad no pudo determinarse aunque Lou y Mitchel en 2002 mostraron que los primers que amplifican las regiones ITS1 y 2 de *Candida albicans* tienen una sensibilidad del 100%. Estos resultados nos muestran que *C. albicans* sigue siendo la especie mayormente infectante en los pacientes, seguido de *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Estrada-Barraza et al en 2011 reportó que en México de las enfermedades causadas por levaduras del genero *Candida* la más frecuente es *C. albicans*, seguido de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*.

A pesar de que algunos autores mencionan que la especificidad del medio CHROMagar es muy alta e incluso la misma marca menciona que su especificidad es de 99% Se han encontrado estudios donde la especificidad del medio no ha sido lo suficientemente confiable.

Estrada-Barraza en 2011 realizó un estudio con 79 muestras clínicas obteniendo una especificidad del medio comercial CHROMagar del 92%. Contrario a este caso Liguori et al en 2010, informó que la especificidad para la identificación de *C. albicans* por CHROMagar es de alrededor del 75%. De igual manera Oddset al. en el año 2000 obtuvo variación en la identificación de aislamientos ya que 9 de 48 aislados de *C. albicans* dieron colonias rosadas en lugar de colonias verdes características de la especie, en este caso la variación en la temperatura de incubación fue un punto importante para la obtención de los resultados. En nuestro trabajo a pesar de repetir el experimento por duplicado no hubo cambios de color a verde en las 24 cepas confirmadas como *C. albicans* (antes *C. glabrata* por la siembra en CHROMagar) y al comparar el porcentaje de sensibilidad con el método de PCR se propone hacer secuenciación genómica de estas cepas para comprobar si realmente son de la

misma especie o han sufrido cambios en el genoma los cuales interfieren con la producción de alguna enzima involucrada en el proceso de cambio de coloración en el medio cromógeno.

En nuestro trabajo hubo una concordancia del 100% en los aislamientos de *C. tropicalis* identificados en CHROMagar y confirmados por PCR y aunque Metin et al. en 2012 encontraron que de 22 aislamientos de *C. tropicalis*, sólo 1 formó colonias de color crema en todas las condiciones de incubación, este hallazgo raro no debe verse como una desventaja del medio en la identificación de *C. tropicalis*, según el autor. Nuestros resultados revelan que el ensayo de la PCR es específico para *C. tropicalis* así como la siembra en CHROMagar. Al respecto, Luo y Mitchell proponen el uso de los cebadores CTR1 y CTR2 para la identificación de *C. tropicalis*, ellos probaron en un ensayo de PCR múltiple 35 aislamientos previamente identificados con un 100% de sensibilidad y especificidad.

En ese mismo estudio realizado por Metin et al., se observó que *C. glabrata* formó colores uniformes que varían del crema al rosado pero no aseguraron ninguna relación sobre esta especie y el uso de CHROMagar ya que no incluyeron otras especies del género. De igual manera ya que en nuestro estudio no se encontraron especies diferentes a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* tanto por métodos moleculares como convencionales decidimos tampoco asegurar ninguna relación entre *C. glabrata* y CHROM agar debido a que algunas publicaciones indicaron que *C. glabrata* podría diferenciarse de otras especies de *Candida* en CHROMagar en vista de sus colonias rosadas, pero otros documentos que estudian muchas más especies del género informaron que *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae* también forman un color rosado. Es decir que las colonias rosadas nunca deben interpretarse como presuntos aislamientos de *C. glabrata*, independientemente de la temperatura de incubación, ya que otras levaduras también forman colonias rosadas o rosa oscuro en el medio. (Houang et al, 1997; Willinger et al, 1999; Odds et al, 2000; Pfaller et al, 2006).

Los patrones obtenidos de la PCR son consistentes, usando los cebadores que amplifican los genes ITS1 e ITS2 se muestran resultados confiables, rápidos y repetibles, además es una metodología simple para la identificación de estas especies de *Candida*, sin embargo, hay que señalar que la prueba de identificación por PCR a pesar de ser un método rápido y eficaz en la identificación de especies se limita si no existen los suficientes cebadores para otras especies de *Candida* generalmente encontradas y si no es validada su eficacia, por lo que se sugiere validarla realizando ensayos con enzimas de restricción, pruebas con

marcadores enzimáticos o radioactivos o la secuenciación de los fragmentos del ADN debiendo considerar en la validación de los métodos otras alternativas como la PCR cuantitativa, la PCR Microsatelite (MSP-PCR), el fragmento amplificado de longitud de polimorfismo (AFLP)²³ y la PCR multiplex-tándem según Estrada-Barraza.

La identificación adecuada de la especie de *Candida* aislada a partir de las muestras clínicas es de suma importancia, con el fin de corroborar el diagnóstico clínico, obtener un diagnóstico micológico preciso e instaurar un tratamiento antifúngico adecuado.

El tratamiento antifúngico a base de azoles ha sido bastante estudiado, y en este trabajo realizamos perfiles de resistencia con el fin de estudiar el comportamiento de las especies identificadas frente al posible tratamiento contra la candidosis.

De las muestras identificadas como *Candida albicans* sólo 8 cepas (17%) fueron resistentes a uno o más azoles y sólo una resistente a la anfotericina B, de las 9 cepas identificadas como *C. glabrata* 4 (44%) fueron resistentes a azoles y de *C. tropicalis* sólo 1 cepa (16%) fue resistente a los distintos azoles.

En 2013 Ortigoza-Medrano y colaboradores realizó un estudio para evaluar la susceptibilidad in vitro de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente de nuestro país donde encontraron resultados similares a los nuestros. Habiendo un porcentaje de resistencia a diferentes azoles para *C. albicans* 6% de aislados fueron resistentes a fluconazol y anfotericina B y un 15% resistentes a ketoconazol, para *C. tropicalis* sólo un 3% fueron resistentes a ketoconazol, para *C. glabrata* 9% fueron resistentes a fluconazol y 24% resistentes a ketoconazol.

De igual manera en 2015 Meng et al., analizó diferentes especies de *Candida* frente a antifúngicos convencionales encontrando un porcentaje de resistencia a fluconazol para *C. tropicalis* de 11% en el mismo estudio encontró que el 9% de aislados de *C. glabrata* fueron resistentes a los azoles resultados similares obtuvo Pfaller et al., en 2010 y en 2011 encontrando resistencia de un 20% de aislados de *C. glabrata* frente a fluconazol.

Habiendo encontrado estos resultados de resistencia a antifúngicos Marr et al, en 1998 demostró que la resistencia a fluconazol en *C. albicans* es transitoria en pacientes con tratamiento antifúngico, y la susceptibilidad al antifúngico vuelve cuando se suspende el medicamento.

A pesar de que los resultados de resistencia in vitro son útiles para estudiar el comportamiento de las especies no siempre se correlacionan totalmente con las observaciones clínicas, los datos que obtuvimos en este trabajo muestran la existencia de resistencia a antifúngicos convencionales lo cual resalta la importancia de realizar estudios de susceptibilidad en pacientes con candidosis independientemente del tejido al cual este afectando este género de levaduras.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de formación de biopelícula de diferentes aislados clínicos de especies de *Candida* y los resultados mostraron que todas las especies estudiadas (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*) formaron biopelículas sobre superficies de poliestireno bajo las condiciones ensayadas, aunque en diferentes grados. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los de otros autores, que informaron que la formación de biopelículas por especies de *Candida* ocurre en varias superficies abióticas, incluido el poliestireno (Ramageet al., 2006; Parahitayawa et al., 2006).

Con respecto a la cuantificación de la biopelícula en 2003 Li et al., cuantificaron la biopelícula producida por 115 cepas de *Candida spp.*, obteniendo un promedio en absorbancias de 0.189 (± 0.301 DS) resultado equiparable con los nuestros para las tres especies identificadas con promedios de 0.195 (± 0.0737 DS) para *C. albicans*, 0.161 (± 0.0634 DS) para *C. tropicalis* y 0.187 (± 0.072 DS) para *C. glabrata*, siendo *C. albicans* la que mayormente produjo biopelícula seguido por *C. glabrata* y luego *C. tropicalis*. Caso contrario a lo reportado por Shin et al., en 2002 quienes informaron que la biopelícula se produjo en mayor cantidad en aislamientos de *C. tropicalis*, seguido de *C. glabrata*.

En nuestro trabajo se observó que la capacidad de formación de biopelículas de todas las cepas estudiadas fue variada independientemente de la especie y el sitio de aislamiento (véase anexo). Estas observaciones corroboran informes anteriores de *C. albicans*, cuyo crecimiento y atributos de virulencia, junto con la formación de biopelículas han demostrado ser altamente dependientes de la cepa (Ramageet al., 2006, Hawser et al. 1994). Tales hallazgos indudablemente reflejan las diferencias fisiológicas inherentes entre las cepas y podrían tener importancia con respecto al potencial patógeno. Nuestros resultados no indicaron una diferencia en la producción de biopelícula en las especies identificadas ($p > 0.05$). Sin embargo, este resultado no excluye la posibilidad de que las cepas de otras especies o muestras puedan mostrar cantidades estadísticamente diferentes de biopelícula. De hecho, un estudio de Kuhn et al., en 2002 mostraron que los aislamientos invasivos de

C. albicans produjeron más biopelículas que las cepas no invasivas. Los autores atribuyeron la discordancia de sus resultados a varios factores potenciales, las diferencias en las tasas metabólicas y la cantidad de matrices extracelulares. Cabe señalar que Kuhn et al., analizaron un total de diez cepas de *C. albicans* provenientes de siete sitios diferentes del cuerpo, con tres cepas de sangre, dos de catéteres, una de dentaduras postizas, orina, vagina, piel y bronquios.

En este estudio, utilizamos placas de poliestireno para cultivar las biopelículas, debido a que el poliestireno no es un material utilizado en dispositivos médicos los resultados que obtuvimos aquí pueden no corresponderse exactamente con las capacidades de formación de biopelícula en materiales de uso clínico. Es posible que el uso de otros materiales pueda producir resultados diferentes a los basados en placas de poliestireno, de hecho, Baillie y Douglas (2000) encontraron que las biopelículas de *C. albicans* cultivadas en dos catéteres diferentes de cloruro de polivinilo mostraron diferencias significativas en la susceptibilidad a anfotericina B. Sin embargo, por varias razones, creemos que nuestros resultados son relevantes e importantes para la comprensión de las biopelículas de hongos. En primer lugar, el poliestireno se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico in vitro en una variedad de microorganismos y se ha demostrado que es un material excelente para promover la adherencia de las células (Merritt et al., 2000). En segundo lugar, muchos estudios sobre biopelículas de *C. albicans* utilizaron poliestireno (por ejemplo, San Millan et al., 1996; Ramage et al., 2001; Shin et al., 2002; Bachmann et al., 2002), por lo tanto, nuestros resultados se pueden comparar a estos y otros estudios futuros. En tercer lugar, se ha establecido y estandarizado un método eficiente para la formación de biopelícula en *C. albicans* basado en placas de poliestireno de 96 pocillos (Ramage et al., 2001; Bachmann et al., 2002) y, a diferencia de muchos otros materiales, las placas de poliestireno son comercialmente disponible y relativamente barato.

Para comparar la formación de biopelículas, es fundamental contar con un método eficiente y altamente reproducible para la cuantificación. Se han utilizado varios métodos y materiales de sustrato para cuantificar las biopelículas de hongos, y todos fueron adaptados de los métodos informados previamente para bacterias. (Baillie y Douglas, 1998; Reynolds & Fink, 2001; Merritt et al., 2000).

Se realizó la prueba de Switching fenotípico solamente a los aislados de *C. tropicalis* ya que en 2012 resultados de Xie et al., mostraron una mejor observación de este fenómeno en

cepas *C. tropicalis* comparadas con *C. albicans* debido a que sólo el 8% de las cepas mostraron Switching fenotípico.

En este trabajo hemos encontrado que GlcNAc induce este Switching “White to opaque” o cambio de células blanco-opaco en *C. tropicalis* la cual presenta algunas características únicas. Por ejemplo, mostramos que *C. tropicalis* experimenta cambio blanco a opaco (White to opaque) a 25 °C en medio Lee, mientras que las células opacas de *C. albicans* se vuelven extremadamente inestables a 25 °C en *C. albicans*, las células blancas se pueden diferenciar en células filamentosas u opacas en respuesta a diferentes estímulos. Una variedad de señales ambientales, incluyendo GlcNAc y CO₂, no sólo pueden inducir la formación de células opacas sino también promover el desarrollo filamentosas en *C. albicans* (Cottler et al., 2009; Huang et al., 2009, 2010). Las células filamentosas son blancas y expresan un conjunto de genes específicos. Para experimentar un crecimiento filamentosas, las células opacas deben volver a cambiar a blanco. Curiosamente, en comparación con su efecto sobre *C. albicans*, GlcNAc juega un papel contrastante en la filamentación de *C. tropicalis*. (Xie et al., 2012).

Es decir que otra de las características fue que encontramos que GlcNAc inhibía la capacidad de filamentación en las cepas probadas de *C. tropicalis* de igual manera las colonias o sectores opacos envejecidos se tiñeron de rojo en medios que contienen Floxina B como lo muestran también Xie et al., en 2012.

Por lo tanto, es muy posible que la mayoría de las cepas tengan la capacidad de someterse a cambio en nichos ecológicos en los que están presentes factores inductores tales como GlcNAc (por ejemplo, condiciones fisiológicas). De igual manera la inhibición del crecimiento filamentosas por GlcNAc en *C. tropicalis* proporciona nuevos conocimientos sobre la evolución del fenotipo opaco. Tomados en conjunto, este estudio sobre Switching fenotípico en *C. tropicalis* es significativo y proporciona nuevas implicaciones para ayudar a comprender la trayectoria evolutiva de especies de *Candida* patógenas.

10. Conclusiones

- *C. albicans* sigue siendo la primera causa de enfermedad infecciosa.
- La prueba de tubo germinal es útil para diferenciar a *C. albicans* de especies no-*albicans*.

- La identificación por CHROMagar no es 100% fiable para especies de *Candida* no-albicans a excepción de *C. tropicalis*.
- A pesar de que el examen directo y la siembra en CHROMagar es útil para dar un resultado rápido, la identificación por la amplificación de regiones ITS 1 y 2 resulta de mayor eficiencia en el laboratorio, pudiendo ser una mejor herramienta de identificación.
- La prueba de identificación por PCR a pesar de ser un método rápido y eficaz tiene que validarse con otros métodos como la secuenciación del ADN.
- La identificación adecuada de la especie de *Candida* aislada a partir de las muestras clínicas es de suma importancia, con el fin de corroborar el diagnóstico clínico, obtener un diagnóstico micológico preciso e instaurar un tratamiento antifúngico adecuado.
- La presencia de resistencia a agentes antifúngicos por parte de las levaduras del género *Candida* aisladas de pacientes nos permite enfatizar la importancia de esta prueba en los laboratorios y proponerla como rutinaria con el fin de adecuar tratamientos y proponer estrategias para la prevención y diseminación de estas cepas en los ambientes hospitalarios y de laboratorio.
- La formación de biopelículas de *Candida spp.* en aislados clínico han demostrado ser altamente dependientes de la cepa las cuales reflejan diferencias fisiológicas inherentes entre las cepas y podrían tener importancia con respecto al potencial patógeno.
- Es posible que la mayoría de las cepas de *C. tropicalis* tengan la capacidad de someterse a Switching en nichos ecológicos en los que están presentes factores inductores tales como GlcNAc.
- Las pruebas de formación de biopelículas y Switching fenotípico son útiles para detectar factores de virulencia que pueden asociarse a la resistencia antifúngicos y a su vez son útiles como datos epidemiológicos y de investigación ya que proporciona nuevas implicaciones para ayudar a comprender la trayectoria evolutiva de especies de *Candida* patógenas.

11. Perspectivas

Debido a la diversidad de sitios anatómicos infectados por diferentes levaduras del género *Candida*, se podría hacer un análisis de los grupos de pacientes a los cuales son más afectados, así como analizar la especie infectante que predomina estos sitios.

La comparación de métodos moleculares y convencionales de identificación realizada en este trabajo nos permite dar paso a la utilización de métodos aún más precisos como la espectrometría de masas o la secuenciación del genoma con el fin de confirmar las identificaciones realizadas.

Con respecto a la producción y cuantificación de biopelícula se podrán realizar estudios en relación a la resistencia a antifúngicos comparado con la cantidad de biopelícula producida por las levaduras del género *Candida* para poder conocer la relación de esta característica con su perfil de resistencia al tratamiento.

12. Bibliografía

- Adigüzel N., Karakurt Z., Güngör G., Yazicioğlu M.O., Acartürk E., Soğukpınar O., Baran R. (2010) Mortality rates and risk factors associated with nosocomial *Candida* infection in a respiratory intensive care unit. *Tuberk Toraks*, 58, 35-43.
- Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., Douglas, L. J. (2006), Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryotic Cell*, p. 1770–1779
- Cantón Lacasa, E., Martín Mazuelos, E., & Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. segunda edición ed. Bilbao: Revista iberoamericana de micología.
- Castañón-Olivares L.R. (2015). Candidiasis o Candidosis. Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
- Chai. L.Y.A., Denning, D.W., and Warn, P. (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Crit. Rev. Microbiol.* 36: 282-298.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M. A. (2001) Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of bacteriology*, , Vol. 183, No. 18 p. 5385–5394
- Colombo A., Nucci M., Park B., Nouér S., Arthington-Skaggs B., da Matta D., Warnock D., Morgan J. (2006) Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 2816-2823.
- Colombo A.L., Guimarães L. (2003). Epidemiologia das infecções por *Candida* spp. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36, 599–607.
- Cottier F, Mühlischlegel FA. 2009. Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor. *FEMS Microbiol. Lett.* 295:1–9.
- Cuevas-Barrera, L.A. (2012). Caracterización fenotípica y molecular de aislados clínicos mexicanos de *Candida tropicalis*. BUAP

- Diagnóstico y Tratamiento de Candidiasis Invasiva en el Adulto. México: Secretaría de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2012. Recuperado de: www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/562GER.pdf
- Duarte, A., Márquez, A., Araujo, C., & Pérez, C. (2009). Modalidades de la prueba del tubo germinal. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1).
- Estrada-Barraza, D., Martínez, A. D., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 36-42.
- Fernandes, T., Silva, S., Henriques, M. (2015) *Candida tropicalis* biofilm's matrix— involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 83 (2015) 165–169
- Flores-González, J.C., Guerrero-Lozano, I., Pérez-Guerrero, J.J., Hernández-González, A., Galán-Sánchez, F., Quintero-Otero, S., Rubio-Quiñones, F., Pantoja-Rosso, S. (2015) First report of invasive fungal disease by *Candida fabianii* in a non-neonatal paediatric patient. *Rev Iberoam Micol.* 2015 Aug 17. pii: S1130-1406(15)00055-8
- Fuenmayor BA, Paz MA, Fuenmayor BA, Acosta MN. Diagnóstico clínico presuntivo versus diagnóstico microbiológico en mujeres con leucorrea. *Rev Soc Ven Microbiol* 2009; 29: 26-33.
- Giusiano G.E., Mangiaterra M. L. (1998). Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROMaar Candida *Revista Argentina de Microbiología* 30: 100-103- ISSN0235-7541
- Hajjeh R.A., Sofair A.N., Harrison L.H., Lyon G.M., Arthington–Skaggs B.A., Mirza S.A., Phelan M., Morgan J., Lee–Yang W., Ciblak M.A., Benjamin L.E., Sanza L.T., Huie S., Yeo S.F., Brandt M.E., Warnock D.W. (2004) Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population–based active surveillance program. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1519–1527.

- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro, *Infect Immun* , 1994, vol. 62 (pg. 915-921)
- Houang ET, Chu KC, Koehler AP, Cheng AF. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol* 1997; 50: 563-5.
- Huang G, et al. 2010. N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6:e1000806. doi:10.1371/journal.ppat.1000806.
- Huang G, Srikantha T, Sahni N, Yi S, Soll DR. 2009. CO₂ regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr. Biol.* 19:330 –334.
- Klingspor, L., Tortorano, A.M., Peman, J., Willinger, B., Hamal, P., Sendid, B., Velegriaki, A., Kibbler, C., Meis, J.F., Sabino, R., Ruhnke, M., Arikian-Akdagli, S., Salonen, J., Dóczy, I. (2015). Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 21, Issue 1, January 2015, Pages 87.e1–87.e10
- Lachke, S.A., Srikantha, T., Tsai, L.K., Daniels, K., Soll, D.R. (2000). Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect. Immun.* 68, 884–895.
- Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.
- Liguori, G., Di Onofrio, V., GallÃ, F., Lucariello, A., Albano, L., Catania, M. R., & Guida, M. (2010). *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 51(3).
- López-Martínez, R., Méndez-Tovar L. J., Hernández Hernández, F., Castañon-Olivares, L.R. (1995). *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Trillas, Mexico, Df.
- Lott, T.J., Kuykendall, R.J., Welbel, S.F., Pramanik, A., Lasker, B.A. (1993). Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet.* 23, 463–467.

- Luo, G., Mitchell, T. G. (2002). Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40(8): 2860–2865.
- Mackenzie, D. W. R. (1962). Serum tube identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Pathology*, 15(6), 563-565.
- Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L.J., Arenas, R.,. (2011). Levaduras causantes de onicomicosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Rev Iberoam Micol*; 28(1): 32-35.
- METİN, D. Y., PULLUKÇU, H., POLAT, S. H., İnci, R., & TÜMBAY, Z. E. (2012). Do incubation temperature, incubation time, and carbon dioxide affect the chromogenic properties of CHROMagar?. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(6), 977-980.
- Méx, M. I. (2014). Susceptibilidad in vitro de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente. *Medicina Interna de México*, 30(4).
- Muadcheingka, T., Tantivitayakul, P., (2015). Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of oral biology* 60()894–901
- Munin, E., Giroldo, L. M., Alves, L. P., & Costa, M. S. (2007). Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88(1), 16-20.
- Nakayama H., Shibuya K., Kimura M., Ueda M., Iwabuchi S. (2010) Histopathological study of candidal infection in the central nervous system. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.*, 51, 31-45.
- Negri, M; Martins, M; Henriques, M; Svidzinski, T; Azeredo, J; Oliveira, R. (2009). Examination of Potencial Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates from Hospitalized Patients. *Mycopathologia*. 169:175-182.
- Odds F.C., Nuffel L.V., Dams G., (1998) Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2869-2873.
- Odds, F. C., & Davidson, A. (2000). “Room temperature” use of CHROMagar *Candida*™. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 38(3), 147-150.

- Ostrosky L, Pappas P.(2006). Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2006; 34: 857-863.
- Ostrosky-Zeichner L., Rex J., Bennett J., Kullberg B.J. (2002) Deeply invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 16, 821-835.
- Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device, *APMIS* , 2006, vol. 114 (pg. 298-306)
- Perea-Ramos, M.J., Garau, M., González, A., Noriega, A.R., Del-Palacio, A. (2000). Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *J Clin Microbiol. Sep*;38(9):3226-30.
- Pfaller M., Diekema D. (2007) Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Rev. Microbiol. Clin.*, 20, 133-163.
- Pfaller M.A and Diekema D.J. (2004) Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10, 11-23.
- Pfaller M.A. (2012) Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *A.m J. Med.*, 125, 3-13.
- Pfaller M.A., Diekema D.J., Messer S.A., Boyken L., Hollis R.J., Jones R.N. International Fungal Surveillance Participant Group. (2003) In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* 41, 78-83.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion, *J Clin Microbiol* , 2010, vol. 48 (pg. 1366-77)
- Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, et al. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance, *J Clin Microbiol* , 2013, vol. 51 (pg. 2571-81)

- Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 58-61
- Pineda-Murillo, J., Cortés-Figueroa, A. Á., Uribarren-Berrueta, T. D. N. J., & Castañón-Olivares, L. R. (2015). Candidosis vaginal. primera parte: revisión de la clínica, epidemiología y situación de México. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1), 58-63.
- Ponton, J. O. S. E., & Jones, J. M. (1986). Identification of two germ-tube-specific cell wall antigens of *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 54(3), 864-868.
- Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem, *FEMS Yeast Res*, 2006, vol. 6 (pg. 979-986)
- Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2584–2589.
- Saludes, P., Araguás, C., Sánchez-Delgado, J., Dalmau, B., Fonte, B. (2015) Isolation of *Candida* spp. from ascites in cirrhotic patients. *Enferm Infecc Microbiol.* pii: S0213-005X(15)00195-0
- Seneviratne, C.J., Silva, W.J., Jin L.J., Samaranayake, L.P. (2009). Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol.*; 54:1052– 1060
- Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources, *J Clin Microbiol*, 2002, vol. 40 (pg. 1244-1248)
- Silva V., Cabrera M., Díaz, M., Abarca C., Hermosilla G. (2003) Prevalencia de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. *Rev. Iberoam. Micol.*, 20, 46-51.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 47(7), 681-689.

- Slutsky, B., Buffo, J., Soll, D.R. (1985). High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230, 666–669.
- Soll, D.R. (2009). Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Res.* 9, 973–989.
- Soll, D.R., Morrow, B., Srikantha, T. (1993). High frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.* 9, 61–65.
- Soll, D.R., Staebell, M., Langtimm, C., Pfaller, M., Hicks, J., Gopala Rao, T.V. (1988). Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1448–1459.
- Tapia C., González P., Díaz M.C., Corvalán V., Gaete M., Cuenca-Estrella M., Rodríguez- Tudela J.L. (2002) Systemic yeast infections in a general hospital. Correlation between study of susceptibility in vitro and patient survival to the fungal infection episode. *Rev. Med. Chil.*,130, 661-665.
- Vazques-Rechy, E. (2007) Incidencia de Candidosis en pacientes con pie diabético. BUAP
- Vélez-García-Nieto, A., Ocaña-Wilhelmi, M.S., Moreno-Giménez, J.C. (1999). Diagnóstico diferencial y tratamiento de las onicomicosis. ISSN 0304-5412, Vol. 7, N° 133, págs. 6325-6330
- Villarroel-Rodríguez, P.J., SantaCruz, A. (2011) Identificación de especies de levaduras del género *Candida* aislados de exudados vaginales de pacientes en el Hospital Materno Germán Urquidí. *Gac Med Bol*; 34(2): 84-86.
- Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 1999; 42: 61-5.
- Xiao, M., Fan, X., Chen, S. C. A., Wang, H., Sun, Z. Y., Liao, K., ... & Chu, Y. Z. (2014). Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 802 Marr, K. A., C. N. Lyons, T. Rustad, R. A. Bowden, and T. C. White. 1998.
- Xie, J., Du, H., Guan, G., Tong, Y., Kourkoumpetis, TK., Zhang, L., Bai, FY., and Huang, G. (2012). N-Acetylglucosamine Induces White-to-Opaque Switching and

Mating in *Candida tropicalis*, Providing New Insights into Adaptation and Fungal Sexual Evolution. *Eukaryot Cell*. Jun;11(6):773-82.

- Yoon, S.A., Vasquez, J.A., Steffan, P.E., Sobel, J.D., Akins, R.A. (1999). High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 836–845.

13. Anexos

Preparacion de medio Lee

Para un litro de medio Lee:

(NH₄)₂SO₄ 5.0 gr

MgSO₄-7H₂O** 0.2 gr

K₂HPO₄ 2.5 gr

NaCl 5.0 gr

L-alanine 0.5 gr

L-leucine 1.3 gr

L-lysine 1.0 gr

L-methionine 0.1 gr

L-ornithine 0.0714 gr

L-phenylalanine 0.5 gr

L-proline 0.5 gr

L-threonine 0.5 gr

Agregar glucosa o N-acetilglucosamina como fuente de carbono 12.5 gr

Prepare el medio como se describió anteriormente en un volumen de 500 ml, en un matraz separado, prepare 15 gramos de agar en un volumen de 500 ml, mezclar el agar con el medio para posteriormente autoclavar el medio.

En condiciones de esterilidad agregar 1 mg de Biotina al medio antes de solidificar, mezclar y verter en placas.

Tabla general de resultados de identificación

Num. cepa	Sab	Mycocel	Tubo germinal	Color en Chromagar	Identificación Chrom	Identificación PCR
1	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
2	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
3	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
4	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
5	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
7	+	+	-	Azul	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
8	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
9	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
10	+	+	-	Azul	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
11	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
12	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
13	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. spp</i>
14	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. spp</i>
15	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
16	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
17	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>

18	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
19	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
20	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
21	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
22	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
23	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
24	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
25	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
26	+	+	-	Azul	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
27	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
28	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
29	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
30	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
31	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
32	+	+	-	Azul	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
33	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
34	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
35	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. spp</i>
36	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
37	+	-	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
38	+	+	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>

39	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
40	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
41	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
42	+	-	-	Rosado	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
43	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
44	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
45	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
47	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
48	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
49	+	+	+	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
50	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
51	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
52	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
53	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
54	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
55	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
56	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
57	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
58	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
59	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>

60	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
61	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
62	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
63	+	+	+	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
64	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
65	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
66	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
67	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
68	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
69	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
70	+	+	-	Azul	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
71	+	+	-	Azul	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
72	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
73	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>
74	+	+	-	Rosadas	<i>C. glabrata</i>	<i>c. spp</i>

Tabla 2. Promedio de absorbancias para las cepas de *C.*

Numero de cepa	Promedio de absorbancias
7	0.194
10	0.17866667
26	0.20266667
32	0.17666667
70	0.17933333
71	0.033

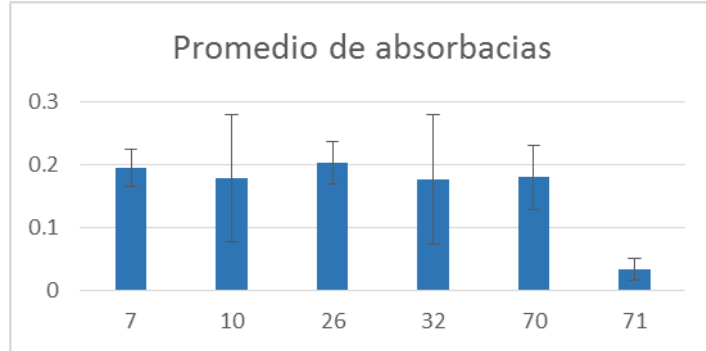


Figura 1. Grafico comparativo de absorbancias promedio de las cepas de *C. tropicalis*.

Tabla 3. Promedio de absorbancias para las cepas de *C. glabrata*.

Numero de cepa	Promedio
9	0.249
11	0.08
17	0.165
20	0.17766667
29	0.153
36	0.141
38	0.21833333
42	0.31633333
12	0

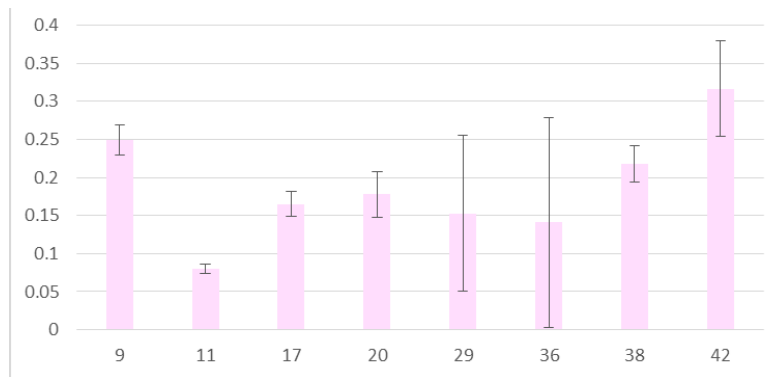


Figura 2. Grafico comparativo de absorbancias promedio de las cepas de *C. glabrata*.

Tabla 4. Promedio de absorbancias para las cepas de *C. albicans*.

Numero de cepa	Promedio	Numero de cepa	Promedio
3	0.22633333	43	0.203
4	0.288	44	0.209
5	0.081	46	0.18
6	0.216	47	0.24666667
8	0.44	48	0.19366667
15	0.27333333	50	0.14133333
16	0.135	51	0.33033333
18	0.27266667	52	0.08596667
19	0.16333333	53	0.145
21	0.20066667	55	0.21866667
22	0.185	56	0.169
23	0.207	58	0.265
24	0.10166667	60	0.144
25	0.16233333	62	0.08666667
27	0.23666667	67	0.11733333
28	0.17933333	68	0.131
30	0.17666667	69	0.12433333
31	0.182		
33	0.315		
37	0.21233333		
39	0.24766667		
40	0.21433333		
41	0.10833333		

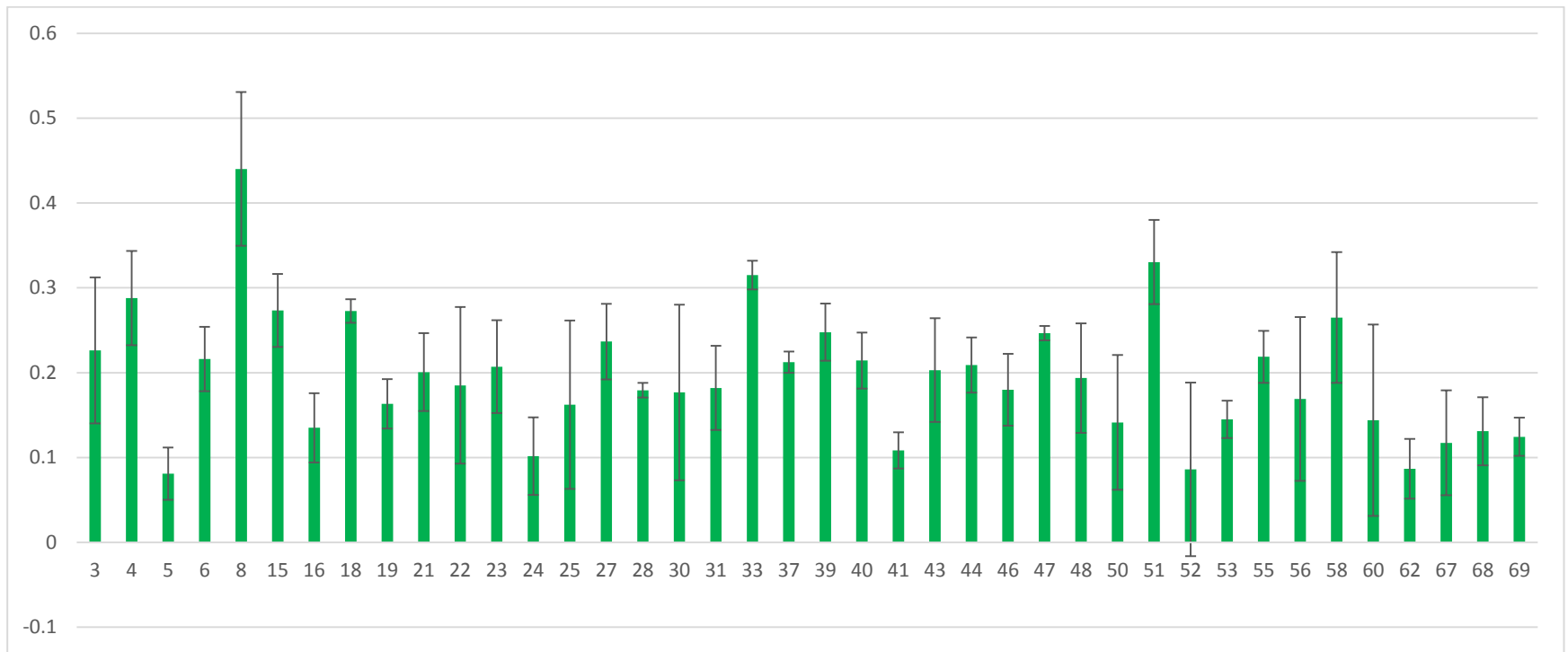


Figura 2. Grafico comparativo de absorbancias promedio de las cepas de *C. albicans*.

