



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DEL GEN *ERG11* DE ESPECIES  
DE *Candida* Y SU ASOCIACIÓN A LA RESISTENCIA A LOS  
AZOLES”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y CELULAR**

**PRESENTA  
Q.F.B. ROSA ISELA ARREDONDO SÁNCHEZ**

**Durango, Dgo.**

**Noviembre 2017**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DEL GEN *ERG11* DE ESPECIES  
DE *Candida* Y SU ASOCIACIÓN A LA RESISTENCIA A LOS  
AZOLES”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y CELULAR**

**PRESENTA**

**Q.F.B. ROSA ISELA ARREDONDO SÁNCHEZ**

**Durango, Dgo.**

**Noviembre, 2017**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



**“IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DEL GEN *ERG11* DE ESPECIES  
DE *Candida* Y SU ASOCIACIÓN A LA RESISTENCIA A LOS  
AZOLES”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGIA  
MOLECULAR Y CELUAR**

**PRESENTA**

**Q.F.B. ROSA ISELA ARREDONDO SÁNCHEZ**

**APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS**

---

**D.C. ESTELA RUIZ BACA**

**Durango, Dgo.**

**Noviembre, 2017**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DEL GEN *ERG11* DE ESPECIES DE *Candida*  
Y SU ASOCIACIÓN A LA RESISTENCIA A LOS AZOLES”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y CELULAR**

**PRESENTA  
Q.F.B. ROSA ISELA ARREDONDO SÁNCHEZ**

**APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL**

**D.C. ESTELA RUIZ BACA  
DIRECTOR DE TESIS**

---

**D.C. EDA GUADALUPE RAMÍREZ VALLES  
SECRETARIA**

---

**D.C. MA. LETICIA SAUCEDO MENDIOLA  
VOCAL**

---

**Durango, Dgo.**

**Noviembre 2017**

## **DEDICATORIA**

A mis padres por todo su apoyo a lo largo de mis estudios, por los consejos que me han brindado durante mi crecimiento y por ser el pilar fundamental en mi vida.

A mi hermana por todo su apoyo y por los consejos que me ha brindado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a mis padres y a mi hermana por todo su apoyo y consejos a lo largo de mis estudios.

Agradezco a mi tutora la D.C. Estela Ruiz Baca el apoyo, tiempo, orientación y enseñanzas que me brindó durante la realización de mi trabajo de maestría, ya que sin su ayuda nada de esto sería posible.

De igual forma agradezco a la Doctora Lourdes Villa Tanaca y a la Doctora Patricia Manzano por su apoyo en la realización de las pruebas de susceptibilidad.

A todos mis profesores le agradezco las enseñanzas y apoyo que me dieron a lo largo de toda la maestría, así como por su gran paciencia y generosidad, muchas gracias. A mis amigos y a mis compañeros de estudio les agradezco el haberme ayudado y apoyado en los momentos que más los necesité.

Por último, agradezco a todas las personas que me brindaron su ayuda y que gracias a ellos pude continuar y finalizar mi trabajo de investigación en la maestría.

## ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mitocondrial
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BrEt	Bromuro de etidio
CC	Crecimiento del cultivo
CDR1	Región determinante de la complementariedad 1
CDR2	Región determinante de la complementariedad 2
CE	Control de esterilidad
CI	Candidiasis invasiva
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFI	Enfermedad Fúngica Invasiva
EFIs	Enfermedades Fúngicas Invasivas
gr	Gramos
h	Horas
IAAS	Infecciones asociadas a la atención de la salud
ITS	Región intertranscripcional
ITS1	Región intertranscripcional 1
ITS2	Región intertranscripcional 2
Kb	Kilobases

KOH	Hidróxido de potasio
Lt	Litros
MDR1	Proteína multidrogoresistente 1
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Micromolar
MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico
N	Normal
n	Número
N/A	No aplica
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
s	Segundos
SDA	Medio agar glucosado de Sabouraud
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SM	Solución madre
TAE	Acetato de tris
TBE	Bromuro de tris
UCIN	Unidad de Terapia Intensiva Neonatal
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTIA	Unidad de Terapia Intensiva Adulta
UTIP	Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica
YPD	Medio extracto de levadura, peptona y glucosa.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>X</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enfermedad Fúngica Invasiva.....	1
1.2 Candidiasis Invasiva.....	2
1.2.1 <i>Candida</i> spp. ....	2
1.3 Epidemiología.....	4
1.4 Diagnóstico.....	5
1.4.1 Hemocultivo.....	5
1.4.2 Examen directo.....	6
1.4.3 Cultivos.....	6
1.4.4 Detección de manano y anticuerpo anti-manano.....	7
1.4.5 Detección de anticuerpos anti-micelio o anti-tubos germinales...	8
1.4.6 Detección de $\beta$ -D-glucano.....	8
1.4.7 Detección de ácidos nucleicos.....	9
1.4.8 Identificación molecular por secuenciación.....	9
1.5 Tratamiento.....	10
1.6 Antifúngicos.....	11
1.7 Resistencia fúngica.....	11
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>14</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>

5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
6.1 Tipo de estudio.....	22
6.2 Población de estudio.....	22
6.3 Aspectos éticos.....	22
6.4 Criterios de inclusión.....	22
6.5 Criterios de exclusión.....	22
6.6 Criterios de eliminación.....	22
6.7 Tamaño de la muestra.....	23
6.8 Recolección de muestras.....	23
6.9 Identificación de los aislados clínicos de <i>Candida</i> spp. ....	23
6.10 Pruebas de susceptibilidad antifúngica.....	24
6.10.1 Medio de cultivo.....	24
6.10.2 Solución madre de los antifúngicos.....	24
6.10.3 Diluciones de los antifúngicos.....	24
6.10.4 Preparación del inóculo.....	28
6.10.5 Inoculación de las microplacas.....	28
6.10.6 Lectura de los resultados.....	29
6.11 Extracción de ADN genómico.....	30
6.12 Amplificación de las regiones ITS.....	31
6.13 Purificación de las regiones ITS.....	32
6.14 Secuenciación y análisis de las regiones ITS.....	32
6.15 Diseño de oligonucleótidos para el gen <i>ERG11</i> .....	33
6.16 Amplificación de un fragmento del gen <i>ERG11</i> .....	33
6.17 Purificación del fragmento del gen <i>ERG11</i> .....	34
6.18 Secuenciación y análisis del fragmento del gen <i>ERG11</i> .....	34
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
7.1 Recolección de muestras.....	35
7.2 Identificación de los aislados clínicos de <i>Candida</i> spp. ....	36
7.3 Pruebas de susceptibilidad antifúngica.....	37

7.4 Extracción de ADN genómico.....	38
7.5 Amplificación y secuenciación de las regiones ITS.....	39
7.6 Diseño de oligonucleótidos para el gen <i>ERG11</i> .....	42
7.7 Amplificación y secuenciación de un fragmento del gen <i>ERG11</i> .....	45
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>56</b>
<b>XI. REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>63</b>
<b>XIII. MEMORIAS.....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
<b>Figura 1</b>	Morfología de <i>Candida albicans</i> .....	3
<b>Figura 2</b>	Tinciones de especies de <i>Candida</i> en medio Sabouraud.....	3
<b>Figura 3</b>	Clamidoconidios en medio de agar harina de maíz.....	4
<b>Figura 4</b>	Examen directo de candidiasis.....	6
<b>Figura 5</b>	Cultivo de especies de <i>Candida</i> en medio CHROM- <i>Candida</i> .....	7
<b>Figura 6</b>	Esquema del mecanismo de acción de los azoles que actúan en la vía de síntesis del ergosterol.....	12
<b>Figura 7</b>	Mecanismos de resistencia a los azoles en <i>C. albicans</i> .....	13
<b>Figura 8</b>	Esquema para las diluciones del Fluconazol.....	25
<b>Figura 9</b>	Segundo paso de las diluciones para Fluconazol.....	26
<b>Figura 10</b>	Esquema para las diluciones del Voriconazol e Itraconazol....	27
<b>Figura 11</b>	Segundo paso de las diluciones para Itraconazol y Voriconazol.....	28
<b>Figura 12</b>	Inoculación de las microplacas.....	29
<b>Figura 13</b>	Esquema de la región ITS.....	31
<b>Figura 14</b>	Descripción de la población por género y edad.....	35
<b>Figura 15</b>	Fuente de aislamiento de las cepas de <i>Candida</i> spp.....	35
<b>Figura 16</b>	Número de cepas aisladas de cada servicio del hospital.....	36
<b>Figura 17</b>	Porcentaje de la resistencia encontrada en <i>Candida</i> spp. a los antifúngicos analizados.....	38
<b>Figura 18</b>	Integridad del ADN extraído de las cepas de <i>Candida</i> resistente a los azoles analizados.....	39
<b>Figura 19</b>	Amplificación de la región ITS de las cepas de <i>Candida</i> spp.....	40
<b>Figura 20</b>	Secuencias de la región ITS de las cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a los azoles.....	41

<b>Figura 21</b>	Alineamiento de las secuencias correspondientes al gen <i>ERG11</i> de las especies de <i>Candida</i> .....	42
<b>Figura 22</b>	Amplificación del gen <i>ERG11</i> de las cepas de <i>Candida</i> resistentes.....	46
<b>Figura 23</b>	Secuencias del gen <i>ERG11</i> de las cepas de <i>Candida</i> resistentes a los azoles.....	47
<b>Figura 24</b>	Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 302-H y la secuencia del gen <i>ERG11</i> de <i>C. glabrata</i> .....	47
<b>Figura 25</b>	Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 1421-H y la secuencia del gen <i>ERG11</i> de <i>C. glabrata</i> .....	48
<b>Figura 26</b>	Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 434-H y la secuencia del gen <i>ERG11</i> de <i>C. krusei</i> .....	48
<b>Figura 27</b>	Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 1030-H y la secuencia del gen <i>ERG11</i> de <i>C. krusei</i> .....	49
<b>Figura 28</b>	Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 735-H y la secuencia del gen <i>ERG11</i> de <i>C. parapsilosis</i> .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
<b>Tabla 1</b>	Diluciones del Fluconazol..... 25
<b>Tabla 2</b>	Diluciones del Itraconazol y Voriconazol..... 27
<b>Tabla 3</b>	Puntos de corte para cepas resistentes según el CLSI..... 30
<b>Tabla 4</b>	Cantidades y condiciones de la PCR para la amplificación de las regiones ITS..... 32
<b>Tabla 5</b>	Cantidades y condiciones de la PCR para la amplificación del gen <i>ERG11</i> ..... 33
<b>Tabla 6</b>	Identificación de las cepas de <i>Candida</i> spp. aisladas, mediante el equipo BD Phoenix™ y CHROMagar <i>Candida</i> ... 36
<b>Tabla 7</b>	Susceptibilidad de los aislados de <i>Candida</i> spp. a las diferentes concentraciones de los antifúngicos analizados de acuerdo a los puntos de cortes de la CLSI..... 37
<b>Tabla 8</b>	Cuantificaciones de las muestras de ADN extraído de las cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes..... 38
<b>Tabla 9</b>	Identificación de las cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a los azoles analizados por los métodos: Molecular, BD Phoenix y CHROMagar..... 41
<b>Tabla 10</b>	Porcentaje de identidad presentado entre las secuencias del gen <i>ERG11</i> de <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> ..... 45
<b>Tabla 11</b>	Oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>ERG11</i> ..... 45
<b>Tabla 12</b>	Mutaciones encontradas en el gen <i>ERG11</i> de las cepas de <i>Candida</i> resistentes..... 51

## RESUMEN

**Introducción:** La candidiasis invasiva (CI) se considera la principal causa de morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados con compromiso inmune. Actualmente para el tratamiento de CI los azoles es la familia de antifúngicos más usados. El mecanismo de acción de los azoles se basa en la inhibición de la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa. Para la familia de los azoles uno de los mecanismos de resistencia descrito es la presencia de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima blanco (*ERG11*). El objetivo del presente estudio fue identificar mutaciones puntuales en el gen *ERG11* en aislados clínicos de *Candida* spp. resistentes a los azoles obtenidos de una población del Estado de Durango.

**Material y métodos:** es un estudio observacional, ambispectivo, transversal, descriptivo. Se incluyeron cepas aisladas de líquidos estériles de pacientes que presentaron candidemias del Hospital Materno Infantil de Durango de Enero del 2012 a Agosto del 2016. Los aislados clínicos de *Candida* spp. fueron identificados a nivel de género y especie mediante el equipo BD Phoenix™ y CHROMagar, *Candida*. Para la determinación de la susceptibilidad antifúngica se siguió el protocolo de acuerdo a las recomendaciones del CLSI en su documento M27-S4, probando un total de 3 antifúngicos: fluconazol, itraconazol y voriconazol. Las cepas aisladas de *Candida* spp. resistentes se confirmó su identificación a nivel molecular (amplificación y secuenciación de la región ITS) y se identificaron las variantes del gen *ERG11* mediante PCR y secuenciación.

**Resultados:** se lograron captar un total de 56 aislados clínicos de *Candida* spp. de los cuales 5 fueron resistentes a los azoles analizados: 2 *C. glabrata*, 2 *C. krusei* y 1 *C. parapsilosis*. Una cepa resultó resiste a los 3 antifúngicos (*C. parapsilosis*), dos cepas fueron resistentes al itraconazol (*C. glabrata*) y dos cepas fueron resistentes al fluconazol (*C. krusei*). En el análisis de la secuencia del gen *ERG11* de cada una de las cepas resistentes aisladas se encontraron mutaciones puntuales.

**Conclusiones:** se observó una prevalencia de la resistencia a los azoles del 9% en especies de *Candida* no-*albicans*. Las mutaciones puntuales encontradas en el gen

*ERG11* en las especies resistentes analizadas pueden estar asociadas a la resistencia a los azoles.

## ABSTRACT

**Introduction:** Invasive candidiasis (IC) is considered the leading cause of morbidity and mortality in hospitalized patients with immune compromise. Currently, azole is the antifungal family most used for the treatment of IC. The action mechanism of azoles is based on the inhibition of the enzyme lanosterol 14- $\alpha$ -desmethylase. For the azoles family, one mechanism of azole resistance involves point mutations in the gene that encodes for the target enzyme (*ERG11*). The purpose of the present study was to identify point mutations in the *ERG11* gene in clinical isolates of azole-resistant *Candida* spp obtained in a population of Durango.

**Material and methods:** The study was observational, ambispective, transversal, and descriptive. The isolates of *Candida* spp included in the present study were of sterile fluid from patients presenting with candidiasis of the Maternal and Child Hospital of Durango from January 2012 to August 2016. Clinical isolates of *Candida* spp. were identified using the BD Phoenix<sup>TM</sup> and CHROMagar, *Candida*. For the determination of antifungal susceptibility, the protocol was followed, according to the recommendations of the CLSI in its document M27-S4. We test three antifungals: fluconazole, itraconazole, and voriconazole. The resistant isolates of *Candida* spp. were molecularly characterized (amplification and sequencing of the ITS region) and point mutations in the *ERG11* gene were identified by sequencing.

**Results:** A total of 56 clinical isolates of *Candida* spp. were included of which 5 were resistant to the azoles analyzed: two *C. glabrata*, two *C. krusei*, and one *C. parapsilosis*. One strain was resistant to 3 antifungals (*C. parapsilosis*), two strains were resistant to itraconazole (*C. glabrata*) and two strains were resistant to fluconazole (*C. krusei*). We found point mutations in the *ERG11* gene sequence of each resistant strain analyzed.

**Conclusions:** We observed a prevalence of azole resistance of 9% in *Candida* non-*albicans* species. The point mutations found in the *ERG11* gene in the resistant strains analyzed could be associated with azole resistance.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedad Fúngica Invasiva

Los hongos patógenos se encuentran entre las causas más frecuentes de las enfermedades infecciosas en seres humanos. Las enfermedades por hongos varían en severidad desde infecciones leves hasta enfermedades invasoras que amenazan la vida principalmente a pacientes vulnerables inmunodeprimidos (Ben-Ami, 2015).

La enfermedad fúngica invasiva (EFI) se considera una infección de tipo oportunista que acontece casi exclusivamente en el paciente inmunodeprimido y en el paciente crítico. Tiene un impacto creciente en la atención hospitalaria y constituye un porcentaje importante de las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (Pontón & Quindós, 2006; Ruiz-Baca, 2013).

La EFI tiene las siguientes características: a) son muy difíciles de diagnosticar antes de la muerte, b) su epidemiología varía de acuerdo a la geografía, los embalses nosocomiales y a la exposición al antifúngico, c) son difíciles de tratar, tiene una respuesta lenta a los antifúngicos, d) pueden requerir cirugía, e) los tratamientos son prolongados (de semanas a meses o años), f) el retraso de su tratamiento se asocia con un aumento de la tasa de mortalidad, g) se puede recaer después de la curación aparente si se produce un período posterior de la inmunosupresión, y h) están asociados a un aumento significativo en costos (Dignani, 2014).

Diversos factores de riesgo se han asociado con el mal pronóstico de la EFI, entre estos destacan la dificultad diagnóstica, la deficiencia inmunológica de gran parte de los pacientes y la alta tasa de fallos terapéuticos (Pontón & Quindós, 2006; Ruiz-Baca, 2013).

La EFI por hongos filamentosos es una causa frecuente de morbilidad y mortalidad tanto en población adulta como pediátrica (Cruz, 2015). Las tasas de mortalidad superan el 30% en los pacientes diagnosticados con EFI (Chen, 2017). Entre las

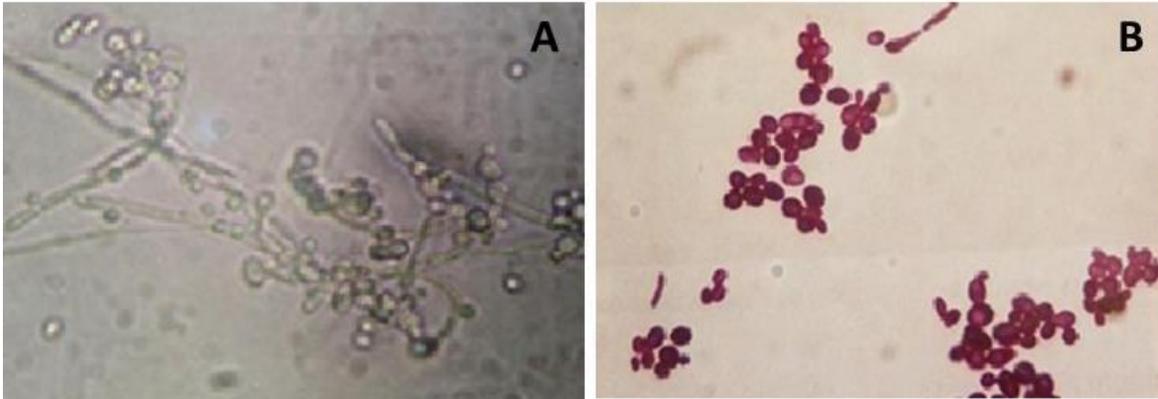
entidades más importantes de la EFI se encuentran la aspergilosis invasiva y la candidiasis invasiva (Boža, 2015; Chen, 2017).

## **1.2 Candidiasis Invasiva**

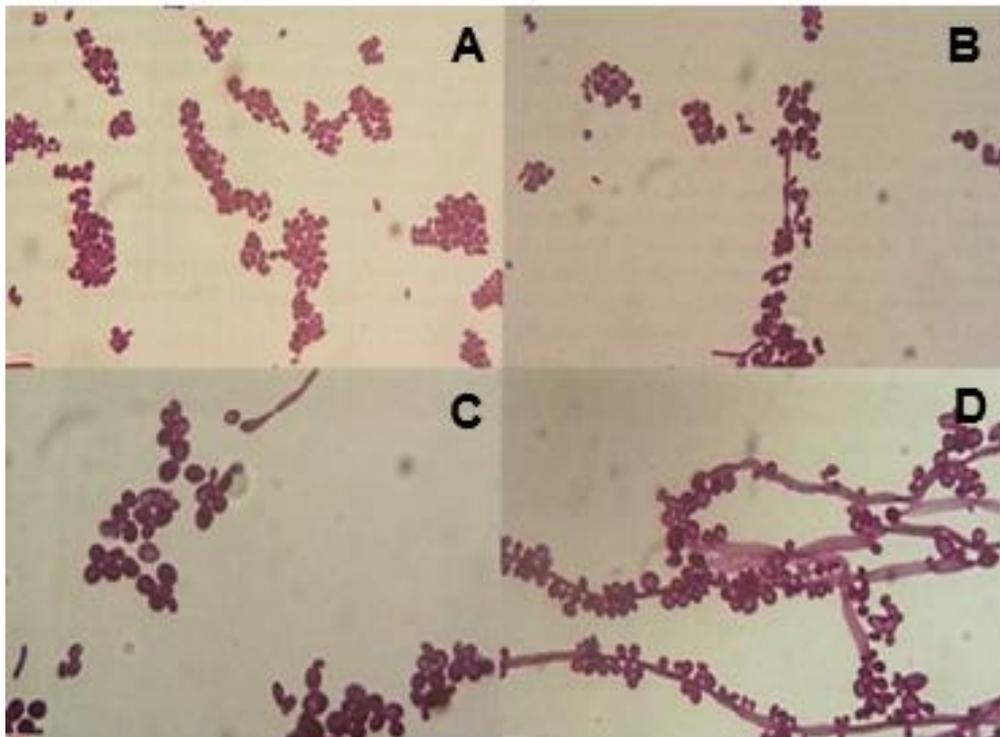
El término Candidiasis Invasiva (CI) engloba una amplia variedad de enfermedades graves oportunistas, que incluye candidemia, endocarditis, meningitis, endoftalmitis y afectación de diversos órganos profundos; excluye las infecciones superficiales y formas menos graves de enfermedad, como las candidiasis orofaríngeas y esofágicas (Del Palacio, 2009). *Candida albicans* es la causa más común de la candidemia, pero en los últimos años se ha aumentado el aislamiento de especies no-*albicans* de *Candida*, entre los más destacados se tienen a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Forastiero, 2015).

### **1.2.1 *Candida* spp.**

Son levaduras que no producen pigmentos melánicos, y su forma puede variar según la especie: globosas, ovoides, elípticas y cilíndricas; su reproducción asexual o anamórfica es por blastoconidios y la mayoría de las especies patógenas pueden formar pseudohifas e hifas verdaderas (Figura 1), con excepción de *C. glabrata*. Con base en estudios de biología molecular se clasifican dentro de la familia *Saccharomycetaceae*, aunque a la mayoría no se le haya encontrado fase telemórfica. Con la actual taxonomía basada en la secuenciación genética, se les ordena dentro del tipo de levaduras ascospóridas. Los blastoconidios que forman miden entre 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con gemas de la mitad de su tamaño; la formación de pseudomicelio se puede ver en cultivos *in vitro*, ya sea cuando envejecen o cuando tienen sustratos bajos en carbohidratos más tensoactivos (Bonifaz, 2012).



**Figura 1.** Morfología de *Candida albicans*. A) Se observan levaduras gemantes (blastoconidios), hifas y pseudohifas (400x) (Jawetz, 2011). B) Colonia de *C. albicans* en medio cromogénico, blastoconidios y pseudohifas (PAS, 100x) (Bonifaz, 2012).



**Figura 2.** Tinciones de especies de *Candida* en medio Sabouraud. A) *C. glabrata*; B) *C. albicans*; C) *C. parapsilosis*; D) *C. tropicalis* (PAS, 80x y 100x) (Bonifaz, 2012).

Todas las especies patógenas oportunistas de *Candida* presentan pseudohifas largas, ramificadas, con pequeños o grandes cúmulos de levaduras o blastoconidios (excepto *C. glabrata*) (Figura 2). La formación de clamidoconidios se hace a partir del

pseudomicelio y solo dos especies lo generan, *C. albicans* con estructuras terminales o intercalares de 10 y 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, y *C. dubliniensis*, con estructuras múltiples en racimos del mismo tamaño (Figura 3) (Bonifaz, 2012).



**Figura 3.** Clamidoconidios en medio de agar harina de maíz (PAS, 60x) (Bonifaz, 2012).

### 1.3 Epidemiología

La epidemiología de las candidemias ha sido objeto de numerosos estudios, pero, las tasas de incidencia han sido muy diferentes de un estudio a otro. Se han documentado variaciones considerables entre hospitales y países con respecto a la incidencia de *C. albicans* y otras especies de *Candida*. Estas diferencias se deben, en parte, a la naturaleza de las encuestas que se realizan, a los grupos que se les aplica el estudio y a las zonas en que es llevado a cabo (Arendrup, 2013; González, 2008).

A pesar de lo anterior se han realizado estudios donde se unen varios artículos de diferentes partes del mundo para englobar de forma mundial la epidemiología de las candidemias. Se ha encontrado que en general *C. albicans* es el patógeno predominante aislado en el norte y centro de Europa y Estados Unidos. Por otra parte, las especies no-*albicans* predominan en Asia, el sur de Europa y el sur de América. *C. glabrata* se encuentra en mayor proporción en el norte y centro de Europa, en los Estados Unidos y en Asia la proporción varía según la configuración, el diseño del estudio y la región geográfica. *C. parapsilosis* se encuentra en mayor proporción en el

sur de Europa, seguido del sur de América y Asia. *C. tropicalis* se encuentra en mayor proporción Asia Oriental y Argentina, pero en general su proporción varía según el diseño del estudio y la región geográfica. *C. krusei* se encontró en menor proporción en todas las regiones geográficas. Para otras especies de *Candida* no se tienen suficientes datos para reportar su epidemiología (Falagas, 2010).

En México, la CI es la quinta EFI más frecuente, con una tasa anual de 1.2 y 14 casos por cada 100,000 habitantes, teniendo un total de 5,617 casos por año. Al año se tienen al menos 3.5 muertes por cada 100,000 habitantes (Corzo-León, 2015).

## **1.4 Diagnóstico**

El diagnóstico para la CI se realiza en el laboratorio y puede hacerse por diferentes pruebas, dentro de las cuales se utilizan con mayor frecuencia el hemocultivo, el examen directo y los cultivos, sin embargo, estas pruebas tienen una baja sensibilidad (50%) y retraso en el resultado (72 a 96 h) (Bonifaz, 2012).

En los últimos años se han desarrollado otras técnicas microbiológicas para detectar precozmente la CI. Suelen agruparse bajo el término de técnicas alternativas al cultivo, ya que están basadas en la detección de componentes fúngicos como lo son el mano, el micelio, el  $\beta$ -D-glucano y los ácidos nucleicos (Cuenca, 2012).

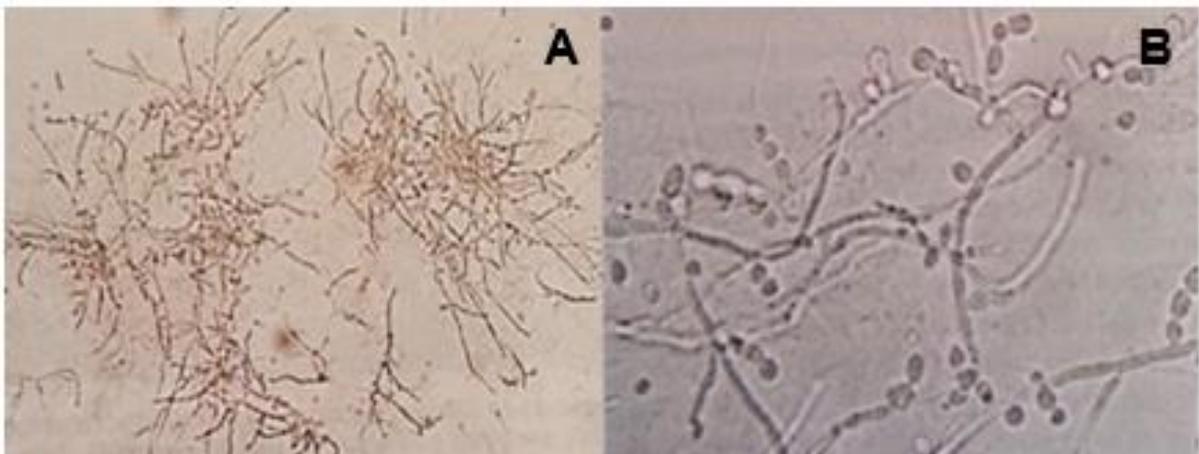
### **1.4.1 Hemocultivo**

No existe estándar de oro para el diagnóstico de candidemia. Los hemocultivos convencionales y cultivos de sitios estériles son la principal herramienta diagnóstica para la CI; a pesar de su baja sensibilidad (50%) y su retraso en el resultado (72 a 96 h). *Candida* en hemocultivos nunca debe de ser visto como contaminante y siempre debe de realizarse una investigación rápida para determinar el origen de la infección. Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: agar sabouraud, gelosa sangre, infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura. Crecen de 2 a 3 días a 28 o 37 °C dando colonias blanquecinas,

lisas, húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observa micelio dentro del agar (Bonifaz, 2012).

#### 1.4.2 Examen directo

El material obtenido se coloca entre porta objetos y cubreobjetos con un aclarante, de preferencia hidróxido de potasio de 10 a 20%, también se pueden realizar tinciones como Gram, Wright, PAS, etc. Al microscopio se observan grandes cúmulos de blastoconidios de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudohifas cortas o largas e hifas (Figura 4) (Bonifaz, 2012).



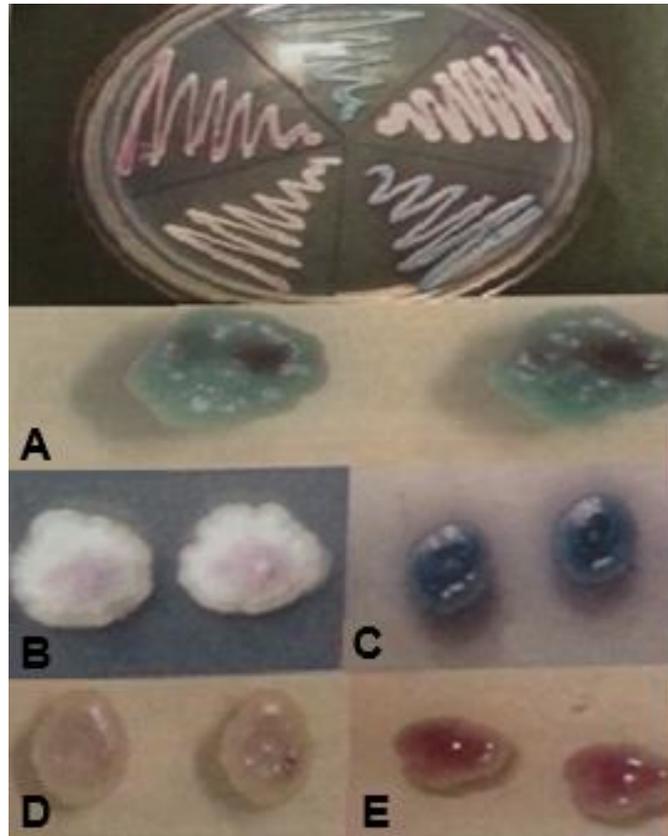
**Figura 4.** Examen directo de candidiasis; se observan: A) pseudomicelio y B) blastoconidios (KOH, 10%. A) 10x; B) 40x) (Bonifaz, 2012).

#### 1.4.3 Cultivos

Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: Sabouraud agar, gelosa sangre, infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura. Las características de las colonias en la mayor parte de medios son similares, crecen de 2 a 3 días a 28 o 37°C, dando colonias blanquecinas, lisas, húmedas, limitadas y opacas (Bonifaz, 2012).

En la actualidad se tiene el medio CHROMagar-Candida® está hecho a base de sales cromógenas y enzimas, que permiten el desarrollo de las especies más comunes de

*Candida* mediante la formación de colonias coloridas: *C. albicans* (verde-claro), *C. dubliniensis* (verde-oscuro), *C. tropicalis* (azul-gris), *C. krusei* (rosa pálido), *C. glabrata* (rosa intenso), *Candida spp.* (blanco.crema) (Figura 5) (Bonifaz, 2012).



**Figura 5.** Cultivo de especies de *Candida* en medio CHROM-*Candida*. A) *C. albicans*; B) *C. krusei*; C) *C. tropicalis*; D) *C. parapsilosis*; E) *C. glabrata* (Bonifaz, 2012).

#### 1.4.4 Detección de manano y de anticuerpo anti-manano

La detección combinada de manano y de anticuerpo anti-manano ha sido desarrollada como técnica específica para la detección de *Candida spp.*, en suero. Hay un kit comercial disponible (Platelia *Candida* Antigen Plus y Antibody Plus, Bio-Rad Laboratories). La técnica ha demostrado una gran fiabilidad para la detección de la candidemia, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85%. Se recomiendan hacer determinaciones seriadas (2 a la semana) en pacientes con riesgo, y de esta forma se adelanta la detección de la infección unos 6 días. La técnica tiene un 85% como valor predictivo negativo, por lo que puede ser muy útil para descartar

la infección y ahorrar tratamientos innecesarios. En un metanálisis de 14 estudios, siete de los cuales se realizaron en pacientes críticos no neutropénicos, la sensibilidad y especificidad del manano y anticuerpo anti-manano fueron 58 y 93% y 59 y 83%, respectivamente. Los valores para el ensayo combinado manano-anti-aanano fueron de 83 y 86%, con mejores resultados para infecciones por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Un meta-análisis reciente de candidiasis crónica diseminada indica que, en este subgrupo de pacientes, la sensibilidad de la técnica es del 86% y que detecta la infección 16 días antes que los hemocultivos (Cuenca, 2012; León, 2014).

#### **1.4.5 Detección de anticuerpos anti-micelio o anti-tubos germinales**

Otra técnica específica para la detección de *Candida* es la cuantificación de anticuerpos anti-micelio o anti-tubos germinales de *C. albicans* en suero, que pese a su nombre es capaz de detectar anticuerpos frente a otras especies de *Candida*. Este método ha sido desarrollado en España y comercializado como *Candida albicans* IFA IgG® (Vircell). Los estudios preliminares realizados indican que tiene una sensibilidad del 84.4%, con un valor predictivo positivo del 96% y una especificidad del 94.7% (Cuenca, 2012; León, 2014).

#### **1.4.6 Detección de $\beta$ -D-glucano**

Otras técnicas se basan en la detección del  $\beta$ -D-glucano, componente de la pared fúngica que no es específico de especie. Puede emplearse en el diagnóstico de la candidiasis, de la aspergilosis y de otras EFIs. Existen varias técnicas comercializadas para la detección de glucano en suero. En Europa y en América la más utilizada es el Fungitell (Associated of Cape Cod Incorporated). La utilización de albúmina, gasas, inmunoglobulinas y hemodiálisis se asocia a falsos positivos, y la neutropenia a falsos negativos. Por ello, se ha impuesto la idea de que esta técnica puede ser de utilidad en el enfermo crítico, ayudando a descartar la infección. Los datos disponibles en estudios muestran que la sensibilidad de la cuantificación de  $\beta$ -D-glucano en el caso concreto de la candidemia y otras candidiasis invasoras puede ser superior al 80%, con un valor predictivo negativo > 90% cuando se realizan determinaciones seriadas,

adelantando en 7 días la detección por hemocultivos. En un reciente metanálisis de 11 estudios, la sensibilidad y especificidad de  $\beta$ -D-glucano para el diagnóstico de la CI fueron 57-97% y 56-93%, respectivamente (Cuenca, 2012; León, 2014).

#### **1.4.7 Detección de ácidos nucleicos**

Ante las limitaciones de las técnicas convencionales en el diagnóstico de las micosis profundas, la detección de ácidos nucleicos de los hongos en muestras clínicas siempre se ha considerado como una alternativa de gran potencial, sobre todo las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación de cantidades muy pequeñas de ADN. Sin embargo, la elevada sensibilidad teórica de las técnicas basadas en la PCR no se ha visto confirmada hasta la fecha en la práctica clínica. Existe una técnica comercializada, SeptiFast (Roche Diagnostica), que permite detectar ADN de bacterias y de algunas especies fúngicas de *Candida* y de *Aspergillus*. Por las características de esta metodología, su principal limitación es la falta de estandarización y las distintas metodologías empleadas. La sensibilidad y la especificidad medias de estas técnicas en el diagnóstico de la candidemia son del 92 y del 95%. En el caso de enfermos críticos con sospecha de candidiasis invasora la sensibilidad de estas técnicas superó el 70%, mientras que los hemocultivos fueron positivos solo en el 38% de los casos. Además, otros trabajos han demostrado la precocidad diagnóstica de las técnicas moleculares frente a los cultivos tradicionales, ya que son capaces de detectar la infección 48 h antes (intervalo 12 h a 8 días), lo que puede ser trascendental para instaurar un tratamiento precoz y aumentar la supervivencia de los enfermos (Cuenca, 2012; León, 2014).

#### **1.4.8 Identificación molecular por secuenciación**

La identificación de muchas especies de *Candida* por métodos tradicionales es un desafío y a veces impreciso, particularmente para microorganismos poco comunes. El análisis secuencial de la región de los espaciadores internos transcripcionales 1 y 2 (ITS1 e ITS2) del ARNr y el gen para ARNr 5.8S se han utilizado ampliamente para la identificación de patógenos fúngicos. La región 5.8S es codificadora y conservada por

lo que permite la delimitación entre cepas de diferente género, por otra parte, la región de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento a nivel interespecífico permitiendo diferenciar entre cepas de diferente especie (White, 1990; Orberá, 2004; Nejat, 2017).

## 1.5 Tratamiento

Se considera de suma importancia el poder identificar a pacientes con riesgo de presentar CI con la finalidad de mejorar su control y tratamiento. El tratamiento antifúngico o la profilaxis que reciba un paciente con CI se debe personalizar teniendo en cuenta las características del paciente y los patrones epidemiológicos locales y la sensibilidad a los antifúngicos (Quindós, 2010).

Hasta principios de la década pasada, el tratamiento de elección de la infección invasiva por *Candida* spp. fue fluconazol, reservándose las formulaciones lipídicas de anfotericina B para el tratamiento de las infecciones más graves. La experiencia adquirida durante los últimos 10 años en el tratamiento de la CI con el empleo de las diferentes equinocandinas, ha hecho que diferentes Sociedades Médicas se replantearan las recomendaciones respecto al tratamiento de elección. Las guías de diagnóstico y tratamiento de la infección por *Candida* spp. de diferentes Sociedades Médicas, publicadas en los últimos 5 años, consideran a las equinocandinas como el tratamiento de elección de la candidiasis invasora y la candidemia, tanto en pautas de tratamiento empírico como en el tratamiento dirigido. Tras la defervescencia y estabilidad clínica, si los hemocultivos son negativos, el tratamiento puede seguirse por vía oral con fluconazol o voriconazol, en función de la especie de *Candida* y de su sensibilidad. El tratamiento se mantiene, hasta completar 14 días después del último hemocultivo positivo. Si existe afección primaria o metastásica de un órgano, el tratamiento debe prolongarse hasta la desaparición de la clínica y, como mínimo, durante 4 semanas más (Cardozo, 2015).

## 1.6 Antifúngicos

Los antifúngicos son compuestos, naturales o sintéticos, que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad (Fuentes, 2014).

Actualmente, existen varias familias de antifúngicos disponibles en el mercado entre los que se encuentran los polienos (anfotericina B y nistatina), azoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, posaconazol), y las Equinocandinas (Caspofungina) (Bonifaz, 2010; Cardozo, 2015).

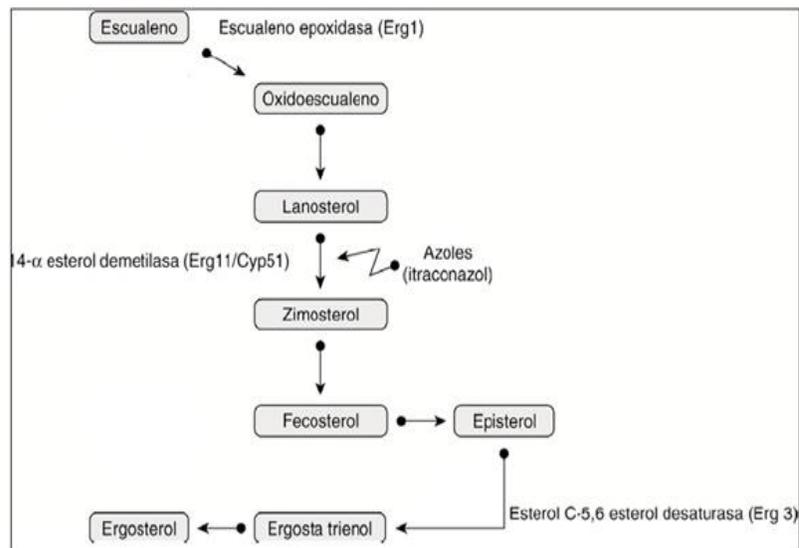
Los azoles son la familia más amplia de fármacos antifúngicos y una de las más usadas para el tratamiento de estas enfermedades, comprenden los imidazoles y los triazoles. Este grupo de antifúngicos revolucionó la micología médica por su espectro de actividad y sus limitados efectos adversos. El único inconveniente de los mismos es la escasa utilidad que hasta la fecha han demostrado en las infecciones invasoras graves por hongos miceliales, así como la aparición de cepas con resistencia secundaria. Los azoles bloquean la síntesis del ergosterol uniéndose fundamentalmente a la enzima 14- $\alpha$ -demetilasa y de esta forma se acumulan esteroides metilados que resultan tóxicos para la célula (Figura 6). No obstante, este bloqueo de la síntesis del ergosterol inhibe el crecimiento de la célula, pero no la mata (Ghannoum & Rice, 1999; Mellado, 2002; Fuentes, 2014). Los azoles actúan sobre el citocromo P-450 lanosterol 14- $\alpha$ -demetilasa (*Ergp* o *Cyp51p*), que cataliza la eliminación del grupo 14- $\alpha$ -demetilasa del lanosterol (Pontón & Quindos, 2006).

## 1.7 Resistencia Fúngica

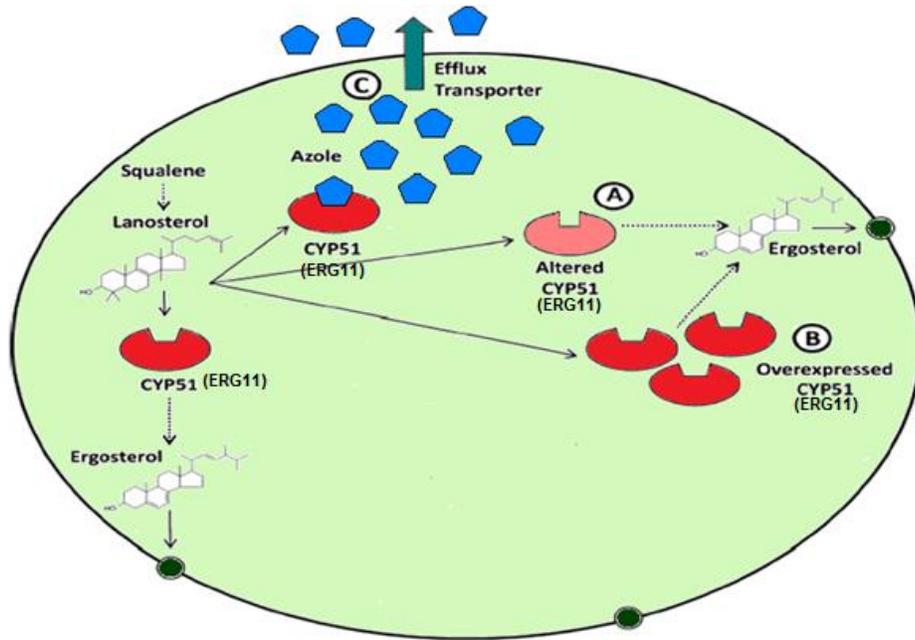
Con el incremento paulatino de la población en riesgo de contraer CI y el mayor uso de antifúngicos, se ha observado un aumento en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de las cepas de *Candida* spp., lo cual podría asociarse a falla terapéutica (Fuentes, 2014).

A nivel molecular, diversos mecanismos de resistencia a azoles han sido descritos en *C. albicans*, como mutaciones puntuales en la región 405-488 del gen que codifica para la enzima “blanco” del fármaco o *ERG11* y/o sobre-expresión de este gen (Xu, 2000; Morschhauser, 2002; Fuentes, 2014). Los azoles inhiben el crecimiento de hongos al interferir con la síntesis del ergosterol, ésta es interrumpida a través de la inhibición de la actividad enzimática de la 14- $\alpha$ -demetilasa, el producto del gen *ERG11*. Los azoles tienen un nitrógeno básico que coordina al átomo de hierro del grupo hemo ubicado en el sitio activo de la 14- $\alpha$ -demetilasa. El sitio activo está de este modo ocupado por el azol, que actúa como un inhibidor competitivo (Ming-Jie, 2013).

Otros mecanismos estudiados son la sobre-expresión de bombas de eflujo como CDR1, CDR2 y MDR1, estos mecanismos podrían estar involucrados en la resistencia, tanto de azoles como de otros antifúngicos, ya que la sobre-expresión de estas bombas no permite la acumulación del fármaco en el compartimiento intracelular (Figura 7) (Fuentes, 2014). Algunas otras mutaciones pueden ejercer un efecto solamente cuando está en combinación con otras mutaciones (Sanglar, 1998; Golabek, 2015).



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de acción de los azoles que actúan en la vía de síntesis del ergosterol (Mellado, 2002).



**Figura 7.** Mecanismos de resistencia a los azoles en *C. albicans* (Parker, 2014).

## II. ANTECEDENTES

Las micosis oportunistas aumentan la morbilidad y la mortalidad de los pacientes inmunocomprometidos. Se ha demostrado que cinco especies de *Candida* son responsables del 97% de los casos en todo el mundo de la CI (Salazar, 2015).

En Estados Unidos se llevó a cabo un estudio para comparar los genotipos y susceptibilidades a fluconazol en *C. albicans* de humanos. El estudio se realizó desde noviembre de 1994 hasta febrero de 1995, en la Clínica de Enfermedades Infecciosas para Adultos del Centro Médico de la Universidad de Duke en Carolina Del Norte. Las cepas analizadas se tomaron de: pacientes con SIDA que habían sido tratados con fluconazol, pacientes con SIDA que no habían sido tratados con fluconazol y voluntarios sanos. Se obtuvieron 10 cepas resistentes a fluconazol. Todas las cepas resistentes presentaron valores de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) similares. Al compararse los genotipos de las cepas de personas saludables con las cepas de personas con SIDA no se encontró una diferencia significativa genética. También se encontró que cepas diferentes, aisladas del mismo paciente, presentaban genotipos y CIM diferentes. Otro resultado que se obtuvo fue que las cepas resistentes tenían una mayor similitud genética entres sí que las cepas sensibles (Xu, 2000).

En España se realizó un estudio para evaluar la epidemiología de la CI y la susceptibilidad antifúngica en la Unidad de Cuidados Intensivos Quirúrgicos. La duración del estudio fue desde enero del 2012 hasta diciembre del 2013. Los resultados arrojaron que de los 1149 ingresos que se tuvieron 22 fueron por CI. La incidencia global fue de 19.1 casos de CI por cada 1,000 ingresos. De los 22 casos el 59.1% fue debida a *C. albicans*, 22.7% por *C. parapsilosis*, 9.1% por *C. glabrata*, 4.5% por *C. krusei* y 4.5% por *C. tropicalis*. También se encontró que hubo resistencia a fluconazol e itraconazol en el 13.6% de los casos (Aguilar, 2015).

En México, existen pocos estudios relacionados a la susceptibilidad antifúngica, por lo que se realizó un estudio, en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional

Siglo XXI, para evaluar la resistencia antifúngica, en levaduras del género *Candida*, a ketoconazol, fluconazol, voriconazol e itraconazol. Se obtuvieron 40 cepas, de las cuales el 27.5% mostraron resistencia antifúngica, siete a ketoconazol, siete a itraconazol, una a voriconazol y una a fluconazol (Manzano-Gayosso, 2008).

González *et al.* (2008) estableció la distribución de especies y susceptibilidad antifúngica de *Candida*, aisladas de hospitales públicos y privados en Monterrey, en un periodo comprendido de julio del 2004 hasta julio del 2007. Encontró una incidencia mayor de *C. parapsilosis* (37.9%), seguida de *C. albicans* (31.9%), *C. tropicalis* (14.8%), *C. glabrata* (8%), *C. krusei* (2.7%) y *C. spp.* (4.6%). Los aislados de *C. albicans* mostraron una resistencia del 0.78% para fluconazol y voriconazol, y una resistencia del 1.6% para itraconazol. En *C. tropicalis* se observó una resistencia del 1.6% para itraconazol. El 31.25% de los aislados de *C. glabrata* fueron resistentes a fluconazol y el 43.3% fueron resistentes a itraconazol. Las demás cepas de *Candida* no presentaron resistencia.

Otro estudio para determinar la distribución de especies y la susceptibilidad antifúngica del hongo circulatorio, en pacientes pediátricos, se realizó en 14 hospitales de diferentes estados de México. El periodo de duración del estudio fue desde enero del 2010 hasta diciembre del 2011. Se encontró que las especies de *Candida* representaban el 98.32% del total de los aislados fúngicos, con una incidencia de *C. albicans* y *C. parapsilosis* del 36.08%, seguida de *C. tropicalis* con el 20.45%, *C. glabrata* con el 2.56%, *C. guilliermondii* con el 1.99 % y *C. spp.* con el 2.84%. En cuanto a la resistencia en azoles la mayoría de las especies no presentaron resistencia, a excepción de *C. glabrata* y *C. tropicalis* que mostraron una mayor resistencia al fluconazol y al itraconazol (González, 2013).

Sanglar *et al.* (1998) realizaron un estudio para ver los mecanismos moleculares de resistencia a los azoles en cepas de *Candida* obtenidas de pacientes con SIDA que adquirieron resistencia a derivados azólicos, estas cepas fueron tomadas de un estudio previo realizado en 1995. Después del análisis de los resultados se

encontraron cinco mutaciones (G129A, Y132H, S405F, G464S y R467K) en el gen *ERG11* asociadas a resistencia en los azoles. Pudiera ser que estas mutaciones den la resistencia encontrándose solas o asociadas a otros mecanismos de resistencia, como lo son la sobreexpresión de las bombas de flujo.

En Estados Unidos se realizó un estudio para ver la prevalencia, en cepas de *C. albicans*, de los mecanismos moleculares de resistencia al fluconazol. Las cepas clínicas se obtuvieron del Centro Científico de Salud de la Universidad de Texas. Se encontraron 13 mutaciones (T348A, T376C, A383C, A395T, A428G, A685G, G919A, C1214T, G1309A, G1336A, T1346C, G1349A, G1390A) en el gen *ERG11* que causaban cambios de aminoácidos en la proteína codificada. Los resultados que se obtuvieron demostraron que la resistencia al fluconazol y otros azoles es el resultado de una combinación de diferentes mecanismos de resistencia, siendo el mecanismo predominante la sobreexpresión de las bombas de flujo, solas o en combinación con la sobreexpresión del gen *ERG11* y la presencia de mutaciones puntuales (Perea, 2001).

En China se llevó a cabo un estudio para la detección de mutaciones en el gen *ERG11* de 23 cepas de *C. albicans* obtenidas de aislados clínicos de cuatro hospitales diferentes de Shanghai. El proyecto comprendió un periodo de duración de dos años, desde el 1 de noviembre del 2006 hasta el 31 de diciembre del 2008. Se encontraron 33 mutaciones, de las cuales 16 eran mutaciones silenciosas que no cambiaban la secuencia de la proteína. De las otras 17 mutaciones 10 ya se habían reportado anteriormente y siete fueron nuevas (K143Q, Y205E, A255V, E260V, N435V, G472R, D502E). De las 17 mutaciones que presentaron cambios en aminoácidos 6 (A114S, Y132H, Y132F, K143R, Y257H y K143Q) contribuyeron a aumentos significativos en la resistencia al fluconazol y al voriconazol. Además, también se concluyó que, basándose en los resultados obtenidos y de acuerdo a estudios anteriores, se podrían utilizar las sustituciones de aminoácidos A61V, A114S, Y132F, Y132H, K143Q, K143R, Y257H, S405F, G448E, F449S, G464S, R467K e I471T como marcadores predictivos de la resistencia a los azoles (Ming-Jie, 2013).

En otro estudio se exploraron los principales mecanismos moleculares responsables de la resistencia a itraconazol, en cepas de *C. krusei*. Los aislamientos de las cepas incluidas en el estudio se tomaron del Hospital Central de Tianjin y del Hospital General de la Universidad Médica de Tianjin. Los resultados mostraron que existían siete puntos de mutaciones en el gen *ERG11* de *C. krusei*, incluyendo seis mutaciones sinónimas (C51T, C642T, A756T, T939C, T1389C y G1536C) y una mutación sin sentido (C44T). También se encontró que en cepas resistentes los niveles de expresión del ARNm del gen *ERG11* estaban significativamente más altos que los de cepas sensibles al antifúngico. Según los resultados que se obtuvieron en el estudio se concluyó que las mutaciones en el gen *ERG11* pudieran estar asociadas a la resistencia del itraconazol, sin embargo, no se contó con suficientes cepas experimentales para poder afirmarlo, por el contrario, si se pudiera atribuir la resistencia presentada al itraconazol por la sobreexpresión del gen *ERG11* (He, 2015).

En Polonia se realizó un estudio para investigar los mecanismos moleculares de resistencia a los azoles, en cepas de *C. albicans*. Se utilizaron 120 cepas (60 resistentes y 60 sensibles) obtenidas de pacientes del Hospital de Especialidades John Paul. Se encontraron 19 mutaciones en las cepas, de las cuales cuatro (T495A, A530C, G622A y A945C) causaban cambios de aminoácidos en la proteína codificada por el gen, cinco (A530C, G622A, G1309A, A1167G y A1230G) solo se presentaron en cepas resistentes y de estas una (G1309A) tenía el 54% de frecuencia. El 33% de las cepas resistentes presentaron tres mutaciones simultáneas (A530C, G622A y A1167G). También se encontró que las mutaciones T462C y G1309A estaban relacionadas con la sobreexpresión del gen *ERG11*, por lo que se podría atribuir principalmente, a estas dos mutaciones, la causa de resistencia a los azoles, en estas cepas (Golabek, 2015).

En China se realizó un estudio para verificar si mutaciones en la secuencia del gen *ERG11* eran responsables de la resistencia a los azoles, en cepas de *C. albicans*. Las cepas se obtuvieron de pacientes en Jínan y Guangzhou. Se encontraron 19

mutaciones que no causaban cambios en la proteína codificada por el gen y dos mutaciones (G487T y Y257H) que se encontraban en 14 de las cepas resistentes. En las 14 cepas se evaluó la expresión de cinco genes relacionados con la resistencia (*CDR1*, *CDR2*, *ERG11*, *MDR1* y *FLU1*), en general no se encontró una sobreexpresión de los genes, por lo que se propone que la resistencia podría atribuirse solo a las dos mutaciones mencionadas (Xu, 2015).

En Brasil se realizó un estudio con el objetivo de identificar mutaciones en la región codificadora del gen *ERG11*, en aislados clínicos de especies de *Candida* resistentes a los azoles. Los aislados clínicos se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Universidad Federal de Grande Dourados. Se encontraron 25 mutaciones en las secuencias, de las cuales solo dos (Y166S y G524R) alteraban la secuencia de la proteína codificada, y tres eran nuevas (C108G, C423T y A1581G). Se concluyó que la mutación G524R afectaba mayormente a la enzima codificada por lo que podría estar relacionada a la resistencia antifúngica (Santos, 2016).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las Enfermedades fúngico invasivas (EFIs) tienen un impacto creciente en la atención hospitalaria y constituyen un porcentaje importante de las infecciones asociadas a la atención de la salud.

La EFI por *Candida* o candidiasis invasiva (CI) se considera la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados con compromiso inmune. En México, no existen estudios sobre mecanismos de resistencia en especies de *Candida* asociados a la falla terapéutica. En base a estos antecedentes se considera de gran relevancia realizar estudios de distribución de especies, sensibilidad antifúngica y la caracterización de mecanismos de resistencia a nivel molecular en especies de *Candida* aisladas de pacientes con CI asociadas a fallas terapéuticas en el Estado de Durango.

## IV. HIPÓTESIS

En la población de Durango prevalecen cepas de *Candida* spp. con resistencia a la familia de los azoles la cual se asocia a la presencia de mutaciones puntuales en el gen *ERG11*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Identificar variantes del gen *ERG11* en especies de *Candida* aisladas de candidemias nosocomiales y su asociación a la resistencia a los azoles en una población del Estado de Durango.

### 5.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar cepas de *Candida* spp. de pacientes con candidemias nosocomiales del Hospital Materno-Infantil de Durango.
- Determinar los fenotipos de resistencia al fluconazol, voriconazol e itraconazol, por pruebas de microdilución en caldo de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI de las cepas identificadas.
- Amplificar la región ITS y el gen *ERG11* de los aislados clínicos de las especies de *Candida* que presenten resistencia a los antifúngicos analizados e identificar mutaciones puntuales del gen por secuenciación.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Tipo de estudio**

Observacional, ambispectivo, transversal, descriptivo.

### **6.2 Población de estudio**

El estudio se realizó durante el periodo de Enero del 2012 a Enero del 2018 e incluyó todos los aislados clínicos de *Candida* spp. obtenidos a partir de líquidos estériles de pacientes con infección nosocomial aislados del Hospital General 450 de la Secretaría de Salud del Estado de Durango.

### **6.3 Aspectos éticos**

El protocolo del presente trabajo de investigación se ha sometido a evaluación y fue aprobado por el comité de ética e investigación del Hospital General 450 de la Secretaría de Salud de Durango (Anexo 1).

### **6.4 Criterios de inclusión**

Cepas de *Candida* spp. aisladas de líquidos estériles de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial de acuerdo a la NOM-045-SSA2-2005.

### **6.5 Criterios de exclusión**

Cepas de *Candida* spp. procedentes de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial de los cuales ya se había obtenido una cepa previamente.

### **6.6 Criterios de eliminación**

Aislados que se contaminen durante el estudio.

## 6.7 Tamaño de la muestra

Se incluyeron todos los aislados clínicos de *Candida* spp. de líquidos estériles de pacientes que presenten infección nosocomial de Instituciones de Salud del Estado de Durango.

## 6.8 Recolección de muestras

Se incluyeron cepas aisladas de líquidos estériles de pacientes que presentaron candidemias del Hospital Materno-Infantil de Durango de Enero del 2012 a Agosto del 2016. Para los criterios de inclusión se tomaron cepas de *Candida* spp. aisladas de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial de acuerdo a la NOM-045-SSA2-2005. Los criterios de exclusión fueron para cepas de *Candida* spp. procedentes de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial de los cuales ya se había obtenido una cepa previamente. Los criterios de eliminación fueron para cepas contaminadas por otros microorganismos y para placas de agar con contaminación por microorganismos ajenos a los de interés en el estudio.

## 6.9 Identificación de los aislados clínicos de *Candida* spp.

Se llevó a cabo la identificación de los aislados clínicos en el equipo BD Phoenix™ (Becton Dickinson), el cual contiene sustratos fluorogénicos y cromogénicos que al estar en contacto con el organismo puede haber una reacción (reacción positiva) o no haber reacción (reacción negativa). Cuando se combinan las reacciones positivas y negativas, se determina la identificación del organismo. También se confirmó la especie mediante agar cromogénico (CHROMagar *Candida*), el cual es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos, con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco.

## **6.10 Pruebas de susceptibilidad antifúngica**

Los ensayos de susceptibilidad se llevaron a cabo por pruebas de microdilución en caldo de acuerdo a las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) de su documento M27-S4 del 2012. Como control de calidad del método se utilizó la cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 29019. Se probaron tres antifúngicos: fluconazol, itraconazol y voriconazol.

### **6.10.1 Medio de cultivo**

El medio que se utilizó fue el RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164M (Sigma), ajustado a pH  $7\pm 0.1$  y con 0.2% de glucosa. Para su preparación se disolvieron 10.40 gr de RPMI 1640 y 34.53 gr de MOPS en 700 ml de agua destilada, se ajustó a pH  $7\pm 0.1$  con NaOH 10N y se aforó a 1Lt. Se esterilizó el medio por filtración y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **6.10.2 Solución madre de los antifúngicos**

Para el antifúngico soluble en agua (fluconazol) se pesaron 0.0128 gr y se disolvieron en 10 ml de agua destilada, la solución se esterilizó por filtración y se dividió en alícuotas de 1.1 ml que se guardaron a -70°C hasta su uso. Para los antifúngicos insolubles en agua (itraconazol y voriconazol) se pesaron 0.0160 gr y se disolvieron en 10 ml de dimetil sulfóxido (DMSO), la solución se esterilizó por filtración y se dividió en alícuotas de 1.1 ml que se guardaron a -70°C hasta su uso. Una vez descongeladas las alícuotas no podían volverse a congelar.

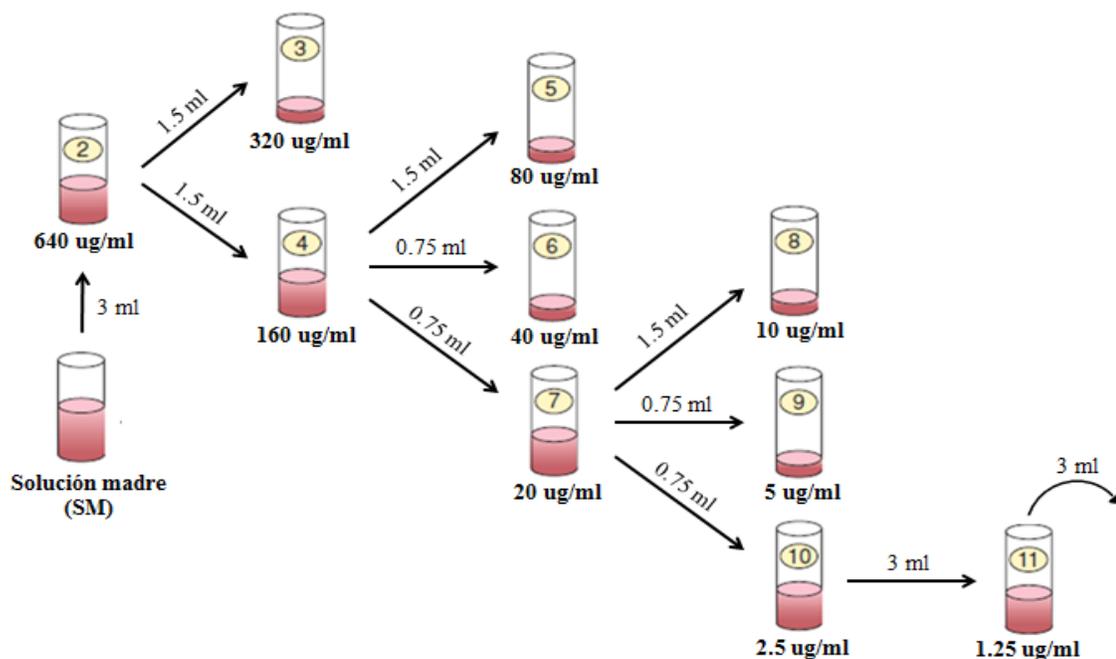
### **6.10.3 Diluciones de los antifúngicos**

Para el antifúngico soluble en agua (fluconazol) las concentraciones que se ensayaron fueron de 64 a 0.12 ug/ml. Se utilizaron las cantidades indicadas en la Tabla 1 y se siguieron los pasos presentados en las Figuras 8 y 9. El control de esterilidad (CE) y

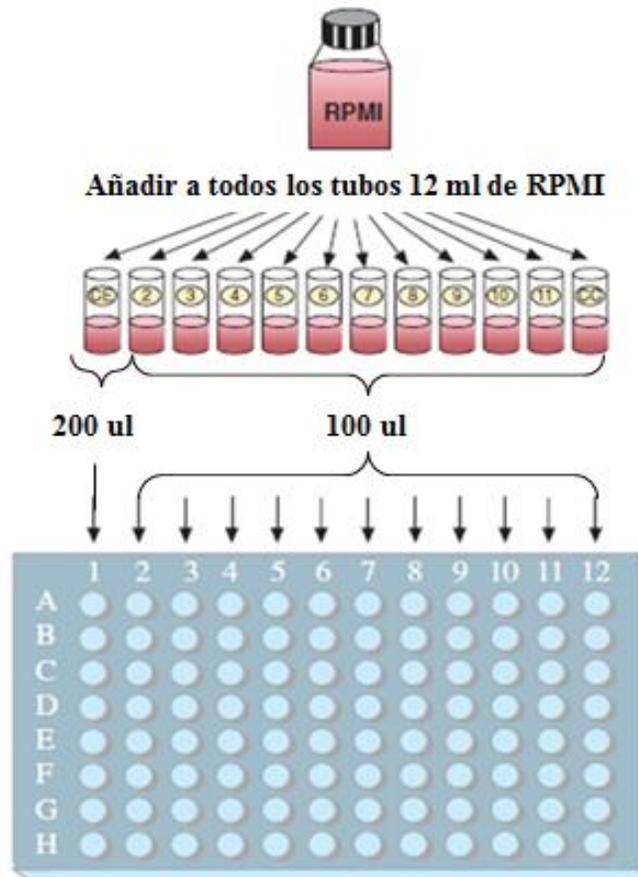
el control de crecimiento del cultivo (CC) solo llevaron medio RPMI. En total se llenaron 18 microplacas y estas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

**Tabla 1.** Diluciones del antifúngico soluble en agua (fluconazol) (CLSI, 2012).

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con RPMI	Concentración resultante	Tubo
SM	1280 ug/ml	3 ml	3 ml	640 ug/ml	2
2	640 ug/ml	1.5 ml	1.5 ml	320 ug/ml	3
2	640 ug/ml	1.5 ml	4.5 ml	160 ug/ml	4
4	160 ug/ml	1.5 ml	1.5 ml	80 ug/ml	5
4	160 ug/ml	0.75 ml	2.25 ml	40 ug/ml	6
4	160 ug/ml	0.75 ml	5.25 ml	20 ug/ml	7
7	20 ug/ml	1.5 ml	1.5 ml	10 ug/ml	8
7	20 ug/ml	0.75 ml	2.25 ml	5 ug/ml	9
7	20 ug/ml	0.75 ml	5.25 ml	2.5 ug/ml	10
10	2.5 ug/ml	3 ml	3 ml	1.25 ug/ml	11



**Figura 8.** Esquema para las diluciones del antifúngico soluble en agua (fluconazol) (Cantón, 2007).

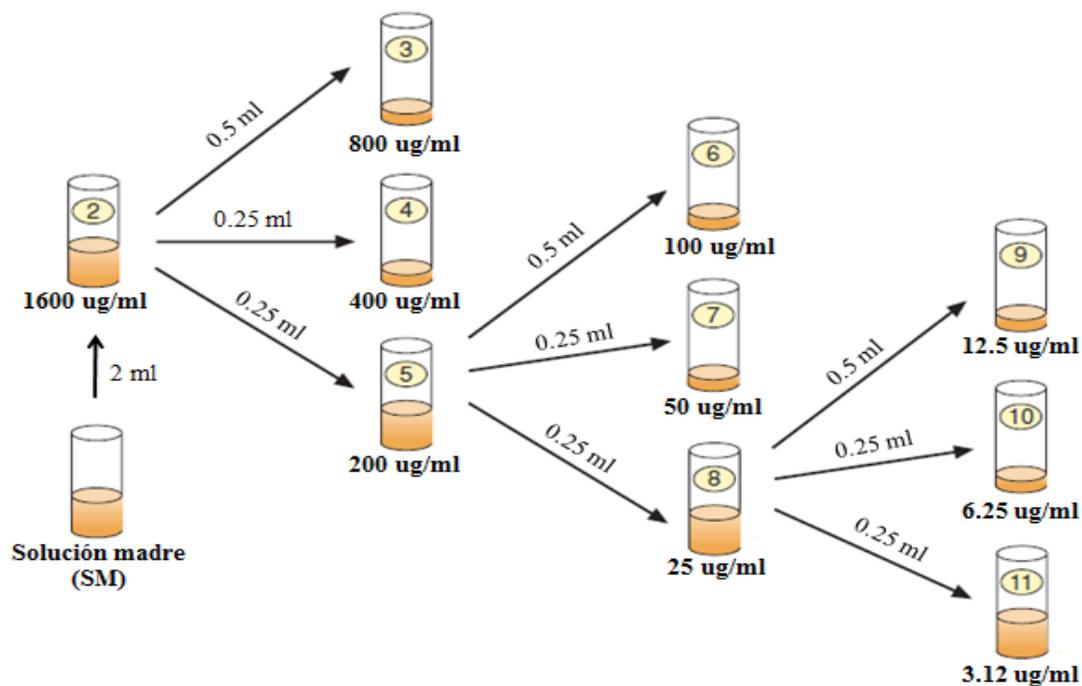


**Figura 9.** Segundo paso de las diluciones para fluconazol (Cantón, 2007).

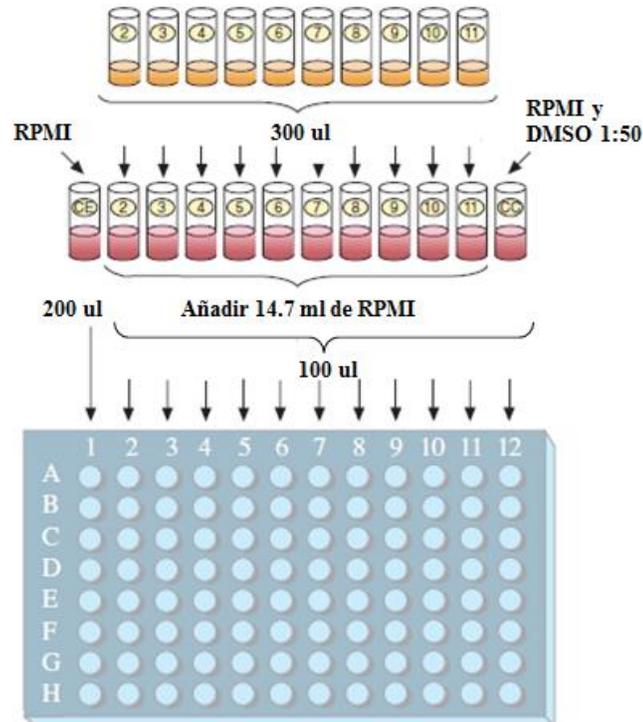
Para los antifúngicos insolubles en agua (itraconazol y voriconazol) las concentraciones que se ensayaron fueron de 16 a 0.03  $\mu\text{g/ml}$ . Se utilizaron las cantidades indicadas en la Tabla 2 y se siguieron los pasos presentados en las Figuras 10 y 11. El control de esterilidad (CE) solo llevó medio RPMI y el control de crecimiento del cultivo (CC) llevó DMSO y RPMI en una proporción 1:50. En total se llenaron 18 microplacas y estas se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**Tabla 2.** Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua (itraconazol y voriconazol) (CLSI, 2012).

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con DMSO	Concentración resultante	Tubo
SM	3200 ug/ml	2 ml	-	1600 ug/ml	2
2	1600 ug/ml	0.5 ml	0.5 ml	800 ug/ml	3
2	1600 ug/ml	0.25 ml	0.75 ml	400 ug/ml	4
2	1600 ug/ml	0.25 ml	1.75 ml	200 ug/ml	5
5	200 ug/ml	0.5 ml	0.5 ml	100 ug/ml	6
5	200 ug/ml	0.25 ml	0.75 ml	50 ug/ml	7
5	200 ug/ml	0.25 ml	1.75 ml	25 ug/ml	8
8	25 ug/ml	0.5 ml	0.5 ml	12.5 ug/ml	9
8	25 ug/ml	0.25 ml	0.75 ml	6.25 ug/ml	10
8	25 ug/ml	0.25 ml	1.75 ml	3.12 ug/ml	11



**Figura 10.** Esquema para las diluciones de los antifúngicos insolubles en agua (itraconazol y voriconazol) (Cantón, 2007).



**Figura 11.** Segundo paso de las diluciones para itraconazol y voriconazol (Cantón, 2007).

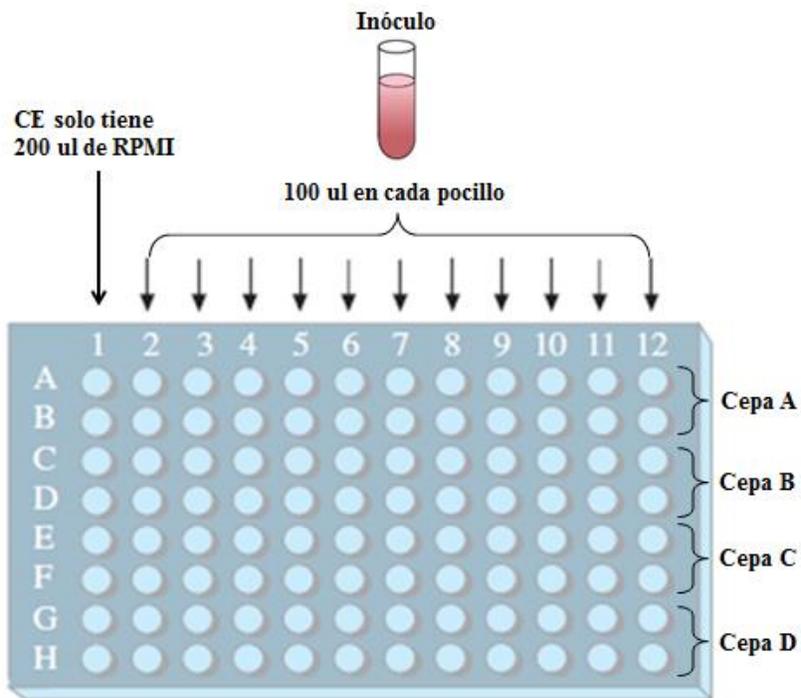
#### 6.10.4 Preparación del inóculo

Como las levaduras estaban almacenadas en congelación primeramente se realizaron 2 pases en agar glucosado de Sabouraud (SDA), las placas se dejaron incubando a 35°C por 24 h. De la placa con la resiembra se tocaron, con el asa de cultivo, 5 colonias que se resuspendieron en un tubo de solución salina (NaCl 0.85%). Se agitó bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 650 nm), se ajustó a una densidad óptica 0.5 McFarland. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con el inóculo y medio RPMI, esta dilución es la que se utilizó para inocular las microplacas. La dilución final fue sembrada en agar cromogénico (CHROMagar *Candida*) para el control de pureza del cultivo.

#### 6.10.5 Inoculación de las microplacas

Se sacaron las placas de congelación y se dejaron a temperatura ambiente hasta descongelarse. Fueron colocados 100 ul de la dilución del inóculo en cada pocillo,

desde el pocillo 2A hasta el pocillo 12A. Cada dilución de inóculo se puso por duplicado (Figura 12). Una vez inoculada la placa se dejaba incubando por 24 horas a 35°C y luego se pasaba a la lectura de los resultados.



**Figura 12.** Inoculación de las microplacas (Cantón, 2007).

### 6.10.6 Lectura de los resultados

La lectura fue de forma visual y se realizó con ayuda de un espejo invertido. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura (90%), comparada con el control de crecimiento del cultivo. La lectura se realizó 24 h después de la inoculación de las placas, en caso de que el control de crecimiento del cultivo no hubiera crecido suficiente las placas se dejaban otras 24 h en incubación a 35°C y después se realizaba la lectura de las placas. Como puntos de corte para las cepas resistentes se tomaron en cuenta las concentraciones presentadas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Puntos de corte para cepas resistentes según el CLSI (2008, 2012).

Antifúngico	Puntos de corte (µg/ml)					
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Otras M27-A3
<b>Fluconazol</b> (M27-S4)	≥8	≥64	≥8	≥8	≥8	≥64
<b>Voriconazol</b> (M27-S4)	≥1	≥4	≥1	≥2	≥1	≥4
<b>Itraconazol</b> (M27-A3)	≥1	≥1	≥1	≥1	≥1	≥1

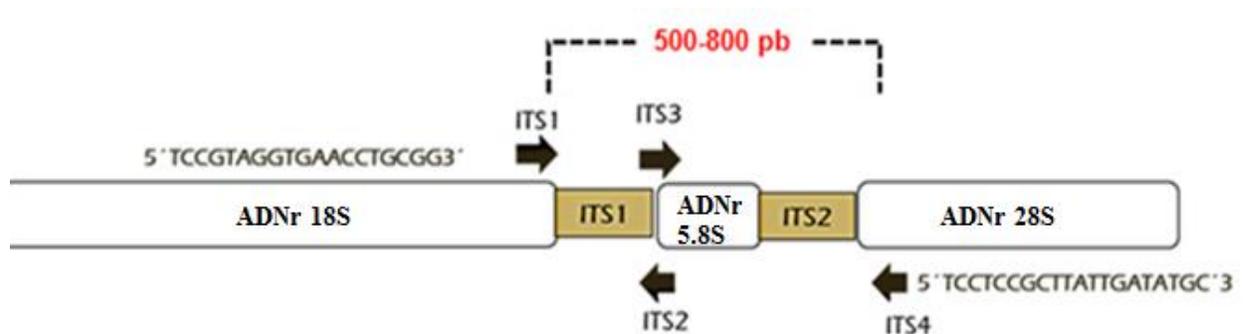
## 6.11 Extracción de ADN genómico

Para obtener el ADN genómico de las cepas resistentes se utilizó el método modificado de Hoffman y Winston (1987). Primero se sembró la levadura en agar YPD y se dejó incubando 24 h a 37°C, luego se pasó una colonia a 5 ml de caldo YPD, se dejó incubando a 35°C por 24 h con agitación de 100 rpm. El paquete celular se obtuvo por centrifugación (13,000 rpm durante 3 min a 4°C) en tubos Eppendorf. Se decantó el sobrenadante y después se lavó el paquete celular con 500 µl de agua destilada estéril, se agitó en vórtex y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis (Tritón X-100 2.0%, SDS 1.0%, NaCl 10.0 mM, Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM.) y 200 µl de mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se añadieron 0.3 gr de perlas de vidrio (0.45-0.52 µm de diámetro) pretratadas (esterilizadas por calor) y se agitó vigorosamente en vórtex por 4 min (40 s en vórtex y 20 s se dejaban reposar en hielo hasta completar el tiempo). Posteriormente, se agregaron 200 µl de TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) y se agitó en vórtex por 30 s, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se obtuvo la fase acuosa en un tubo Eppendorf. Se agregó 1 ml de etanol absoluto y se mezcló por inversión, se dejó precipitar a -20°C por 1 h. Después de la precipitación, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µl de

etanol al 70%, se dejó secar el botón de ADN a temperatura ambiente. El botón de ADN se resuspendió en 50 µl de agua mili-Q. Por último, se cuantificó la cantidad de ADN extraído en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se realizó un gel de agarosa al 1% para verificar su presencia.

## 6.12 Amplificación de las regiones ITS

Para la identificación molecular de las especies de las cepas resistentes se amplificó la región ITS que incluye la secuencia parcial del gen para el ARNr 18S de la subunidad ribosomal pequeña; las secuencias completas del espaciador interno transcripcional 1 (ITS1), el gen para el ARNr 5.8S y el espaciador interno transcripcional 2 (ITS2); la secuencia parcial del gen para el ARNr 28S de la subunidad ribosomal grande (Figura 13). Las condiciones y reactivos usados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se muestran en la tabla 4. Los oligonucleótidos fueron mandados a sintetizar según las secuencias propuestas por White en 1990. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para comprobar su presencia.



**Figura 13.** Esquema de la región ITS, correspondiente a la secuencia parcial del gen ARNr 18S; las secuencias completas del espaciador interno transcripcional 1 (ITS1), el gen para el ARNr 5.8S y el espaciador interno transcripcional 2 (ITS2); la secuencia parcial del gen para el ARNr 28S. Esta región varía de 500 a 800 pb (Lafuente, 2015).

**Tabla 4.** Cantidades y condiciones de la PCR para la amplificación de las regiones ITS.

CANTIDADES A UTILIZAR		CONDICIONES DE LA PCR
Reactivo	Volumen	
Agua mili-Q	Completar 25 µl	35 ciclos 94°C/15 s 58°C/15 s 72°C/1 min
5X Advantage HD Buffer (Clontech)	5 µl	
dNTPs 10 µM	0.5 µl	
Oligonucleótido directo 10 µM	0.3 µl	
Oligonucleótido reverso 10 µM	0.3 µl	
Advantage HD Polymerase Mix (Clontech)	0.25 µl	
Muestra de ADN	100 ng	

### 6.13 Purificación de las regiones ITS

Los productos amplificados en la PCR anterior fueron purificados con el kit para purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) el cual se basa en la capacidad que tiene el ADN para unirse a las membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas. Este kit está diseñado para extraer y purificar fragmentos de ADN de 100pb a 10kb de geles de agarosa estándar o de bajo punto de fusión en acetato de Tris (TAE) o borato de Tris (TBE) o para purificar productos de PCR Directamente de una amplificación por PCR. La purificación de los productos se hizo a partir de un gel de agarosa al 1.5%. Los productos purificados fueron cuantificados en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 6.14 Secuenciación y análisis de las regiones ITS

Los productos purificados se mandaron secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la identificación de especie de las cepas resistentes.

## 6.15 Diseño de oligonucleótidos para el gen *ERG11*

Se diseñaron oligonucleótidos para las tres diferentes especies de *Candida* spp. que fueron encontradas en las cepas resistentes. Para el diseño se utilizó el programa en línea Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y las secuencias de las cepas de *C. glabrata* (GenBank: KR998010.1), *C. krusei* (GenBank: KR998013.1) y *C. parapsilosis* (GenBank: GQ302972.1).

## 6.16 Amplificación de un fragmento del gen *ERG11*

Para la amplificación de un fragmento gen *ERG11* se utilizó una enzima de alta fidelidad (Advantage HD Polymerase Mix, Clontech) para evitar cambios en las bases propias de la amplificación. Las condiciones y reactivos usados en la PCR se muestran en la Tabla 5. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para comprobar su presencia.

**Tabla 5.** Cantidades y condiciones de la PCR para la amplificación del gen *ERG11*.

CANTIDADES A UTILIZAR		CONDICIONES DE LA PCR
Reactivo	Volumen	
Agua mili-Q	Completar 25 $\mu$ l	35 ciclos 94°C/15 s 58°C/15 s 72°C/1:40 min
5X Advantage HD Buffer (Clontech)	5 $\mu$ l	
dNTPs 10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l	
Oligonucleótido directo 10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ l	
Oligonucleótido reverso 10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ l	
Advantage HD Polymerase Mix (Clontech)	0.25 $\mu$ l	
Muestra de ADN	100 ng	

## **6.17 Purificación del fragmento del gen *ERG11***

Los productos amplificados del fragmento del gen *ERG11* fueron purificados con el kit para purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) el cual se basa en la capacidad que tiene el ADN para unirse a las membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas. Este kit está diseñado para extraer y purificar fragmentos de ADN de 100pb a 10kb de geles de agarosa estándar o de bajo punto de fusión en acetato de Tris (TAE) o borato de Tris (TBE) o para purificar productos de PCR Directamente de una amplificación por PCR. La purificación de los productos se hizo a partir de un gel de agarosa al 1.5%. Los productos purificados fueron cuantificados en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

## **6.18 Secuenciación y análisis del fragmento del gen *ERG11***

Los productos purificados se mandaron secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>). Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa en línea Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), y para los alineamientos se utilizaron las secuencias de las cepas de *C. glabrata* (GenBank: KR998010.1), *C. krusei* (GenBank: KR998013.1) y *C. parapsilosis* (GenBank: GQ302972.1).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Recolección de muestras

Se recolectaron un total de 56 aislados clínicos de *Candida* spp. a partir de líquidos estériles de pacientes con infección nosocomial aislados del Hospital Materno-Infantil del Estado de Durango. La distribución de la prevalencia de *Candida* spp. por género fue: 53% masculino, 43% femenino y del 4% no se supo el género (Figura 14 A); y por edad fue: 64% pacientes pediátricos, 34% pacientes adultos y del 2% no se supo la edad (Figura 14 B). La principal fuente de aislamiento fueron los hemocultivos (96%), seguido de líquido peritoneal (4%) (Figura 15). El número de cepas de *Candida* spp. aislada por servicio fue: 9 de Medicina Interna, 11 de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), 8 de Pediatría, 3 de la Unidad de Terapia Intensiva Adultos (UTIA), 8 de Oncología, 11 de la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), 4 de Transición y 2 de Cirugía (Figura 16).

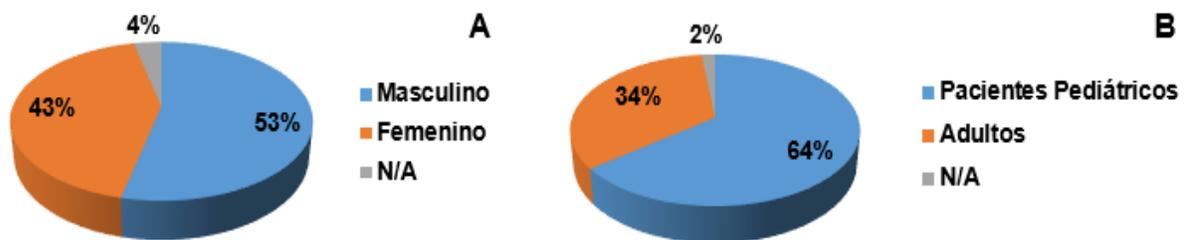


Figura 14. Descripción de la población por: A) Género y B) Edad.

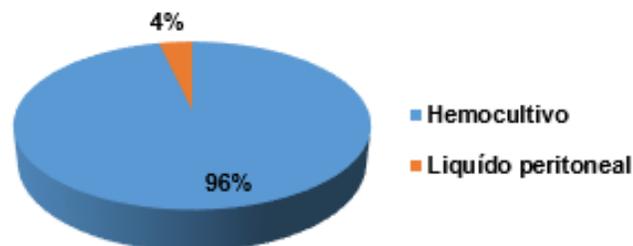


Figura 15. Fuente de aislamiento de las cepas de *Candida* spp.

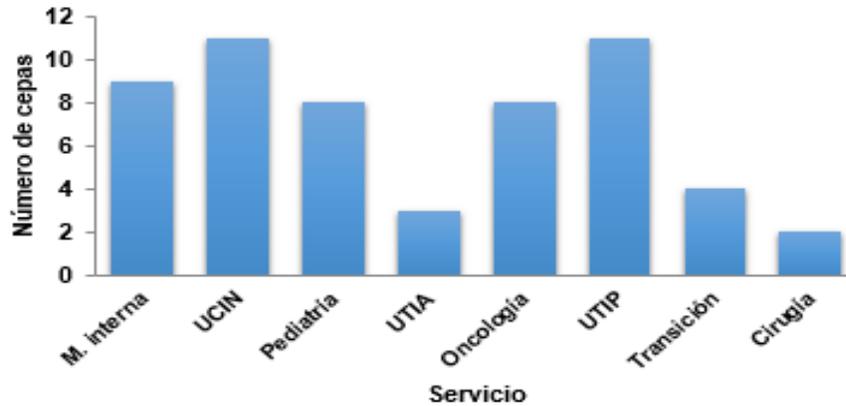


Figura 16. Número de cepas aisladas de cada servicio del hospital.

## 7.2 Identificación de los aislados clínicos de *Candida* spp.

Los 56 aislados obtenidos fueron analizados en el equipo BD Phoenix™ y en CHROMagar *Candida* para la identificación a nivel de especie. Mediante el equipo BD Phoenix™ se encontró con un mayor porcentaje de prevalencia a *C. albicans* (30.3%) seguida de *C. tropicalis* (23.2%), *C. lusitaniae* (17.8%), *C. glabrata* (8.9%), *C. parapsilosis* (8.9%), *C. famata* (3.5%), *C. spp.* (3.5%), *C. krusei* (1.7%) y *C. lipolytica* (1.7%). Con el CHROMagar *Candida* se obtuvo con un mayor porcentaje de prevalencia a *C. spp.* (48.2%) seguida de *C. albicans* (28.5%) y *C. tropicalis* (23.2%) (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación de las cepas de *Candida* spp. aisladas, mediante el equipo BD Phoenix™ y CHROMagar *Candida*.

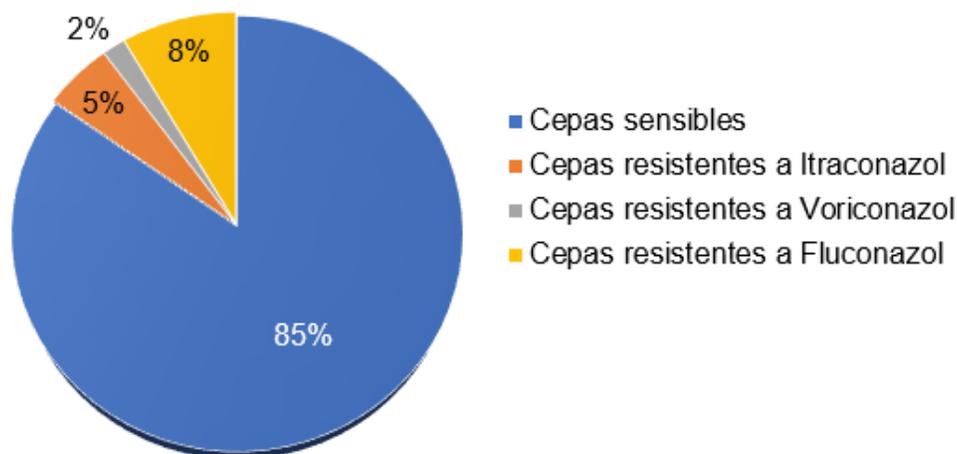
Microorganismo	Método de identificación			
	Equipo BD Phoenix™		CHROMagar <i>Candida</i>	
	n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	17	30.3	16	28.5
<i>C. tropicalis</i>	13	23.2	13	23.2
<i>C. lusitaniae</i>	10	17.8	0	0
<i>C. glabrata</i>	5	8.9	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	5	8.9	0	0
<i>C. famata</i>	2	3.5	0	0
<i>C. spp.</i>	2	3.5	27	48.2
<i>C. krusei</i>	1	1.7	0	0
<i>C. lipolytica</i>	1	1.7	0	0
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>100%</b>	<b>56</b>	<b>100%</b>

### 7.3 Pruebas de susceptibilidad antifúngica

A las 56 cepas de *Candida* spp. aisladas se analizó la susceptibilidad al fluconazol, itraconazol y voriconazol de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (2012) en su documento M27-S4, encontrando un total de 6 (10.7%) cepas resistentes a los antifúngicos analizados. La cepa 735-H fue resistente a los 3 antifúngicos, la cepa 302-H fue resistente al fluconazol e itraconazol, las cepas 434-H, 1030-H y 581-H fueron resistentes al fluconazol y la cepa 1421-H fue resistente al itraconazol. En la Tabla 7 se muestran el número de cepas que crecieron a las diferentes concentraciones de cada antifúngico analizado, en amarillo se encuentran marcadas las concentraciones que se tomaron como punto de corte para la resistencia de cada antifúngico de acuerdo a lo recomendado por el CLSI (2008-2012). En la Figura 17 se tienen los porcentajes de resistencia encontrados en la población total de cepas aisladas, teniendo un 85% de cepas sensibles, un 8% de cepas resistentes al fluconazol, 5% de cepas resistentes al itraconazol y 2% de cepas resistentes al voriconazol.

**Tabla 7.** Susceptibilidad de los aislados de *Candida* spp. a las diferentes concentraciones de los antifúngicos analizados de acuerdo a los puntos de cortes de la CLSI (2008, 2012).

Fluconazol (µg/ml)	No. de cepas que creció	Voriconazol (µg/ml)	No. de cepas que creció	Itraconazol (µg/ml)	No. de cepas que creció
0	6	0	19	0	10
0.125	10	0.03	11	0.03	12
0.25	10	0.06	8	0.06	5
0.5	8	0.12	6	0.12	7
1	12	0.25	7	0.25	13
2	3	0.5	4	0.5	6
4	2	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>8</b>	<b>3</b>	2	0	2	0
16	1	4	0	4	0
32	0	8	0	8	0
64	1	16	1	16	1
<b>Resistentes</b>	<b>5</b>	<b>Resistentes</b>	<b>1</b>	<b>Resistentes</b>	<b>3</b>



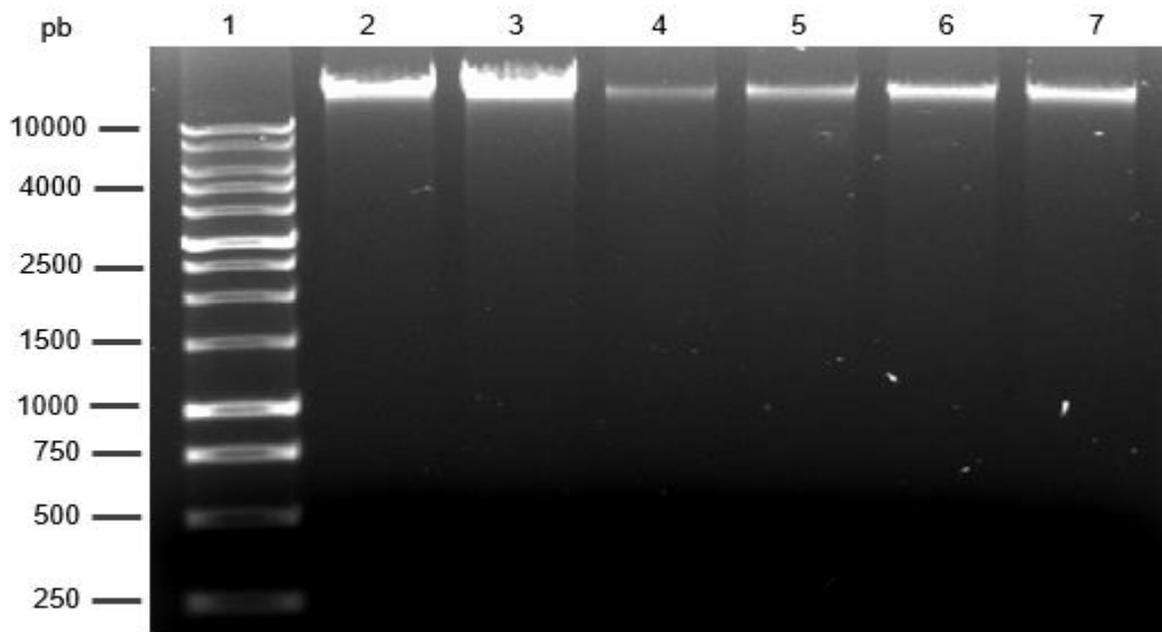
**Figura 17.** Porcentaje de la resistencia encontrada en *Candida* spp. a los antifúngicos analizados.

#### 7.4 Extracción de ADN genómico

A las 6 cepas de *Candida* spp. que presentaron resistencia a los azoles se les realizó extracción de ADN genómico. En Tabla 8 se presentan las cuantificaciones de las muestras de ADN obtenidas por el Nanodrop 2000. En la Figura 18, se muestra la integridad del ADN genómico extraído en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. El ADN extraído se utilizó para amplificar la región ITS (para confirmar la especie) y un fragmento del gen *ERG11* (identificar mutaciones por secuenciación).

**Tabla 8.** Cuantificaciones de las muestras de ADN extraído de las cepas de *Candida* spp. resistentes.

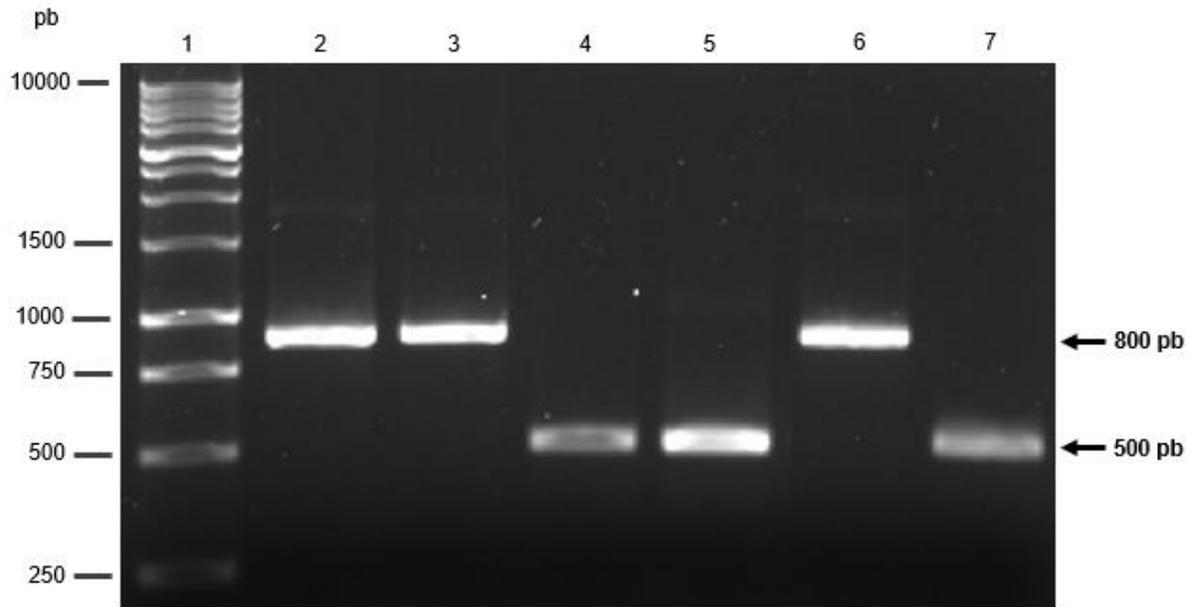
Cepa	Cantidad de ADN (ng/μl)	Relación	
		260/280	260/230
302-H	1013.2	1.96	1.69
1421-H	744.5	1.98	1.87
434-H	1216.1	2.00	2.00
1030-H	970.9	1.95	1.91
581-H	1090.4	2.00	1.89
735-H	102.0	1.68	1.90



**Figura 18.** Integridad del ADN extraído de las cepas de *Candida* resistente a los azoles analizados en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. 1) Marcador de tamaño molecular de 1 Kb; 2) Cepa 302-H; 3) Cepa 1421-H; 4) Cepa 434-H; 5) Cepa 1030-H; 6) Cepa 581-H; 7) 735-H.

## 7.5 Amplificación y secuenciación de las regiones ITS

Para confirmar la especie de los aislados resistentes de *Candida*, se amplificó y secuenció la región ITS a partir del ADN genómico extraído. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1% observando que las cepas 434-H, 1030-H y 735-H amplificaron un producto de 500 pb, mientras que las cepas 302-H, 1421-H y 581-H amplificaron un producto de aproximadamente de 800 pb (Figura 19). Los productos amplificados se purificaron y se mandaron secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.



**Figura 19.** Amplificación de la región ITS de las cepas de *Candida* spp. y analizadas en geles de agarosa al 1.5% y teñido con BrEt. 1) Marcador de tamaño molecular de 1Kb; 2) Cepa 302-H; 3) Cepa 1421-H; 4) Cepa 434-H; 5) Cepa 1030-H; 6) Cepa 581-H; 7) 735-H.

En el análisis de las secuencias de las regiones ITS de las cepas de *Candida* spp. se logró obtener de la cepa 302-H una secuencia de 386 pb la cual mostro una identidad del 95% con *C. glabrata*. De la cepa 1421-H se obtuvo una secuencia de 676 pb la cual mostro una identidad del 99% con *C. glabrata*. De la cepa 434-H se logró obtener una secuencia de 482 pb la cual mostro una identidad del 98% con *C. krusei*. De la cepa 1030-H se obtuvo una secuencia de 479 pb la cual mostro una identidad del 99% con *C. krusei*. De la cepa 581-H se obtuvo una secuencia de 902 pb la cual mostro una identidad del 98% con *C. glabrata*. De la cepa 735-H se logró obtener una secuencia de 491 pb la cual mostro una identidad del 99% con *C. parapsilosis* (Figura 20 y Tabla 9). Al realizar la identificación molecular de la cepa 302-H y 581-H se vio que ya no eran resistentes para el fluconazol ya que los puntos de corte para *C. glabrata* son mayores a los de otras especies. En la Tabla 9 se muestra un resumen de la identificación de las cepas de *Candida* spp. resistente a los azoles analizados por los tres métodos utilizados, obteniendo en la comparación del análisis molecular y el equipo BD Phoenix™ solo un 16.6% de similitud.

>302-H  
 CSGGGGAAATTTATTGATTGTCTGAGCTCGGAGAGAGACATCTCTGGGGG  
 GGACCACTGTAGACACTCAGGAGGCCAAAAATATTTCTCTGCTGTGAA  
 TGCTATTTCATCTCCCGCGCTTARGTGCAGCGTTGGTGGGTGTTCTGCA  
 GTGGGGGGAGGGAGCCGACAAAGACCTGGGAGTGTGCGTGTATCTCTA  
 TTCRAAGGAGGTGTTTTATCACACGACTCGACRATTTCTAATACCTACA  
 CACAGYGGAGTTGCTTTACTACTATGCTTTKGTWCATGGGGGAACGCTCT  
 CTTTCGGGGGGAGTCTCCCTGAAGCKRACCCCAT

>434-H  
 TCSGGGCATTCTACTGATTTGAGGTCAAMTTTTGTTGTCTCKYAACAC  
 KCGCTCTCGGCCGCCAAGCGCCCTGAAAAAAGTCTAGTTCGCTCGGCC  
 AGCTTCGCTCCCTTTTCAGGSGAGTGCAGCTCCGACGCTSTTTACACGTC  
 GTCGCTCCGCTCCCCCACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAACACGCGT  
 CAAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAGA  
 ACTCGATGATTACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCAATTCGCT  
 GCGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGT  
 TTGTTTTGCTAGATTTCTCTTGTGCGACTATATGCTATATTCACATTTT  
 AGGTGTTGTTGTTTTGTTCCGCTCACGCACTGTAGTACTAAATCACAGT  
 AATGATCCTTCCGCAAGTTTACCTACGGAAGR

>581-H  
 CKGGGWCCTACCTGATTTGAGGTCAACTTAAAGACGCTCTGTCTGCCACG  
 ACGCACAAAACACTCACTTACCCCTCCCTAGATCAACACCGAGTTGGTAAA  
 ACCTAATACAGTATTAACCCCGCGCTCGCGCAACCGAGCAGCAGATTA  
 ATAGAGAAGCTTGCCTCGTGTCCACATACTGATWTGGCTTACAAATTC  
 AAGTTAACTCAAAAACGAGAGTATCACTCACTACCAAAACACAAYGTGTT  
 GAGARGAATGACGCTCAACAGGCATGCCCCCGGAATACAGAGGGC  
 CCAATGTGCGTTCAAAAGATTTCGATGATTACGGAATTCGCAATTCACAT  
 TACGTATCGCATTTGCTGCTGCTTCTTCATCGATGCGAAGAACCAAGAGTC  
 CATTGTTGAAAGTTTTGAAAGTTGTTTTCTACTAAAAGAAATCTTGTGTTG  
 ACTGAATTAGTTAAAATAAAAAAATATTTGTTGTTGCAATCCACTGG  
 GAGAACTCCCTCCCGAAGAGAGCTTTCCCCCAACGAAACAAAAGARTGT  
 AGTAAAGTAACTCCACTGTGTGTAGTAAATAGAAAGTGTGCGAGTCGYGT  
 GATAAAAACCTCCTTTGGAATAGAGAGATCCACGCACTCCAGGKCT  
 TTGTGCGCTCCCTCCCCCACTGYAGAACCCCAACCCGCGCACTTAA  
 GCGCAKGCAGGAGAAATAGCAATTCACACMAGAGAAATATTTAGGYGCC  
 TCCTGAGTGTCTACTGCTCCTCCCAAKATGTCTCTCCGAGCTCA  
 GACAAATCAATTAATTTCTTAAATGATCCTTCCGYWSGTTWCCTMCGGA  
 AGATAAAGGATMAAAAATAAATTTAATTTTSTTTTTGCTGAGCTTCGGA  
 CA

>1421-H  
 AGGTCCTCCGGHAKGTGCTGATCTGAGATTTCTCAAAGACACTGCTGAMC  
 GGMCRAGGCCCAATGACTTGGTTACCGTCTCATAKCTTTCCCTCAGATGG  
 CTARACCTTCCACCCRACTKACGCTTCTGATTASATGGGGAGCAGCAGA  
 TTAATAGAGAACTTGCCTCGTGTCCACATACTGATATGGCCTACAAT  
 TTCARGTAACTCAAAAACGAGAGTATCACTCACTACCAAAACACAACGTC  
 TTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAAACAGGCATGCCCCCGGAATACAGAG  
 GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACCGGAATTCGCAATTC  
 CATTACGTATGCGATTTGCTGCTGCTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAG  
 ATCCATTGTTGAAAGTTTTGAAAGTTGTTTTCTACTAAAAGAAATCTTGTG  
 TTGACTGAATAGTTTAAAAAATATTTGTTGTTGTTGCTCCACTGGG  
 AGAACTCCCCCGAAGAGAGCGTTCCCCCAACGAAACAAAAGAAATAGTA  
 GTAAGTAACTCCAATGTGTGTAGTAAATAGAAAGTGTGCGAGTGTGAG  
 ATAAAACACCTCCTTTGGAATAGAGAGATCCMCGWCACTCCMGGTCTT  
 TGCTGGCTCCCTCCCCCACTGCSA

>1030-H  
 AKKGGCATCTACCTGATTTGAGGTGCGACTTTTTGTTGCTCGCAACACT  
 CGCTCTCGGCCGCCAAGCGTCCCTGAAAAAAGTCTAGTTCCGCTCGGCCA  
 GCTTCGCTCCCTTTTCAGGCGAGTGCAGCTCCGACGCTCTTTACACGTCG  
 TCCGCTCCGCTCCCCCACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAACGACGCTC  
 AAACRGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGRCGCAATGTGCGTTCAAGAA  
 CTCGATGATTACGATGGCTGCAATTCACACTAGGTATCGCAATTTGCGTG  
 CGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTT  
 TGTTTTTGCTAGATTTCTCTTGTGCGACTATATGCTATATTCACATTTTA  
 GGTGTTGTTGTTTTGTTCCGCTCACGCACTGTAGTAAATCACAGTA  
 ATGATCCTTCCGCAAGTTTCACTACGGA

>735-H  
 ATGGCWGTCTCCTGATTTGAGGTGCAATTTGGARGAAGTTTTGGAGTTG  
 TACCAATGAGTGGAAAAAACCATCCATTAGTTTATACTCCGCTTTCTTT  
 CAAGCAACCCAGCGTATCGCTCAACACCAAAACCCGAGGGTTTGGGGAG  
 AAATGACGCTCAAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAGGGCGCAATGT  
 GCGTTCAAAGATTTCGATGATTACGAAATATCTGCAATCATATTACTTAT  
 CGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT  
 GAAAGTTTTGACTATTAATAATCGGTTGACATTAATAAATTTGGTTG  
 AGTTTAACTCTGCGAGGCCCATATAGAGGCCTACCAAGGCAAAAGTTT  
 TCAAAAAAAGAAAAACCATGTGTAAAGAAAAATGCAAGTAAAGCACTTTT  
 CATTCTGTAATGATCCTTCCGCAAGTTTCACTACGGAAGAA

Figura 20. Secuencias de la región ITS de las cepas de *Candida* spp. resistentes a los azoles.

Tabla 9. Identificación de las cepas de *Candida* spp. resistentes a los azoles analizados por los métodos: Molecular, BD Phoenix y CHROMagar.

Cepa	Identificación molecular por ITS (BLAST)		BD Phoenix™ (Becton Dickinson)	CHROMagar <i>Candida</i>
	Identidad	Organismo	Organismo	Organismo
302-H	95%	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Candida</i> spp.
1421-H	99%	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida</i> spp.
434-H	98%	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>Candida</i> spp.
1030-H	99%	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida</i> spp.
581-H	98%	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Candida</i> spp.
735-H	99%	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida</i> spp.

## 7.6 Diseño de oligonucleótidos para el gen *ERG11*

Para el diseño de los oligonucleótidos se hizo un alineamiento de las secuencias utilizadas de cada especie de *Candida* para ver el porcentaje de identidad que tenían entre ellas (Tabla 10), sin embargo, como se vio que había muchas variaciones se decidió hacer un par de oligonucleótidos para cada especie (Tabla 11). En el alineamiento se marcó con colores los principales puntos de interacción con los azoles, así como las principales mutaciones que se han reportado y que están relacionadas a la resistencia para determinar la zona a amplificar (Figura 21).

C. glabrata	ATGTCCACTGAAAACACTTCTTTGGTGGTTGAACTATTGGAGTACGTGAAAGCTTGGTCTT	60
C. krusei	ATGTCCGTCAATCAAGGCAATTGCGGCCGATG---TCCAGAGGTATGCTCTTCTCGCAIAC	
C. albicans	ATGGCTATTGTTGAACT-----GTCATTGATGGCATT	
C. parapsilosis	ATGGCATTAGTTGATTTA-----GCCCTTCATGGGTAC	
	*** * * * * *	
C. glabrata	TCGTACTTCCAAGCTCTGCCATTGGCCGACAGAGTGTCTATTAATGGTGGCCTTGCCATTT	120
C. krusei	AGCCACTTTCAAACATCTCCTTGTCTGCAACAGACACTGTTGGTGATATCCATTCCTTTC	
C. albicans	AATTATTTTTGTCCCTTAGTGTACACGACAGATCAGTATATTAATAGGGGTTCCATT	
C. parapsilosis	AACTACTTTATGACTCTTAGTACCCTTCAACAAATTTGGTTTACTTGTGTTTGTCTCCTTTC	
	* ** * * * * *	
C. glabrata	GTGTACACCATCACATGGCAATTGCTTTACTCCTTGAGAAAAGGACAGACCACCCTTGTG	180
C. krusei	TTATACTCTGCCTTTGGCACTCCTCTACTCGTTCGGTAAAGGACAGAGTCCCAATGGTC	
C. albicans	GTTTACAACTTAGTATGGCAATATTTATATTCAATARGAAAAGATAGAGCTCCATTAGTG	
C. parapsilosis	ATTTACAACATCAATTTGGCACTACTTTATTCACTCAGAAAAGATCGTGTTCATTAGTA	
	* ** * * * * *	
C. glabrata	TTCTACTGGTCCCATGGGTCGGCTCTGCTATCCCATACCGTACCAAGCCATACGAGTTC	240
C. krusei	CACTACTGGTCCCATGGGTCGGCTCGCCGTTGTTACGGAAATGCAACCTTACGAGTTT	
C. albicans	TTTTATTGGATCCCTTGGTTTGGTTCGCACTTCATATGGTCAACCAACCATTAGAAATT	
C. parapsilosis	TTTTATTGGATCCCTTGGGTTGGTTCAGCCGATCTTATGGACAGGATCCATATGGGTTT	
	** * * * * *	
C. glabrata	TTGGAAGACTGCCAAAAGGATTTGGTATCTTTCCTTTTCAATGCTAATTGGGTAGAATT	300
C. krusei	TTTGAGAATTGTCGTAAAGGATTTGGTATCTTTCCTTTTCAATGCTAATTGGGTAGAATT	
C. albicans	TTGGAATCATGTCGTCAAAAGGATTTGGTATCTTTCCTTTTCAATGCTAATTGGGTAGAATT	
C. parapsilosis	TTTGAACAATGTCGTGAAAGGATTTGGTATCTTTCCTTTTCAATGCTAATTGGGTAGAATT	
	** * * * * *	
C. glabrata	ATGACTGTCTACTTGGGTCCAAAGGGTCAAGAAATTCATCTTCAACGCCAAGTGGCCAT	360
C. krusei	ATGACTGTTTACTTGGGTCCAAAGGGCCATGAGTTTGTCTCAATGCCAAGGTTAGTAA	
C. albicans	ATGACGGTTTATTTAGGTCCAAAGGGTCAATGAAATTTGTTTTAATGCTAAATTTCTGAT	
C. parapsilosis	ATGACGGTGTACTTGGGTCCAAAGGGTCAATGAAATTTGTGTTAATGCTAAATTTCTGAT	
	***** ** * * * * *	
C. glabrata	TCCGCTGAAGCTGCTTACTTCCACTTGAACCTCCAGTGTTCGGTAAAGGGTATTATC	420
C. krusei	GTCTCCGGGAAGAGCTTACTTCCACTTGAACCTCCAGTGTTCGGTAAAGGGGTCATT	
C. albicans	GTCTCTGCTGAAGAGCTTATTAACATTTAACHTCCAGTGTTCGGTAAAGGGGTTATT	
C. parapsilosis	GTCTCTGCTGAAGAGCTATTAACATTTGACTTCCAGTGTTCGGTAAAGGGTATTATT	
	** * * * * *	

<i>C. glabrata</i>	TATGATGGTCAAACCCACAGACTAATGGAACAAAAGAAGTTGTCAAGGGTGCCTTGACT	480
<i>C. krusei</i>	TACGATGGTCAAATTGGAAGTTGATGGAACAGAAGAAGTTGCCAAAGTTGCCCTCACC	
<i>C. albicans</i>	TATGATGGTCAAATTCCAGATTAATGGAACAAAAAATTTGCTAAATTTGCTTTGACT	
<i>C. parapsilosis</i>	TACGATGGTCCGAATGCAAGACTTATGGAGCAAAGAAGTTGCCAAAGACCAGCATTGACT	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	AAGGAAAGCCTTGTAGATACGTTCCATTGATCGCTGAGGAAATCTACAGTACTTCAGA	540
<i>C. krusei</i>	AAGGAAATCCTTATAGGTACGTCCCTCATCAAGGACGAGATGCTCAAGTATTTCAT	
<i>C. albicans</i>	ACTGATTCATTAAAGATATGTTCCTAAGATTAGAGAAGAAATTTGAAATTTATTTTGTT	
<i>C. parapsilosis</i>	ACCGATTCCTTTAGAGATACGTGCCATTGATTAGAGGGGAAATTTGGATTATTTTACC	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	AACTCCAAGAACTTCAAGATCAACGAAAACAACCTCCGGTATCGTCGACGTATGGTCTCC	600
<i>C. krusei</i>	G-----CCAACTTTAGGGGGGA---CTCGGGCAAAACCAGTGTTTTGAAATCG	
<i>C. albicans</i>	ACTGATGAAAGTTTCAAATGAAAGAAAAAATCTCACGGGGTGGCAATGTATGAAAATC	
<i>C. parapsilosis</i>	AAATCTAAGGTGTTCAATAGAAACAGAAAAGTGGCGTGTGTTGATGTATTGCAATCA	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	CAACCTGAAATGCTTACTTCTCTGCTTCCAGATCCCTGCTAGGTAAAGAAATGAGAGAC	660
<i>C. krusei</i>	CAGTCGGAAATGACGCTCTTTCCGCATCTCGTTCTCTCTTTGGTGACGCTCTACGTAAC	
<i>C. albicans</i>	CAACCAGAAATGACTATTTTCTGCTTCAAGATCTTTATTGGTGATGAAATGAGAAGA	
<i>C. parapsilosis</i>	CAACCAGAAATGACATTTTCTGCTATCTAGATCCCTATTAGGAGAAGCAATGAGAAA	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	AAGTTGGACACCGACTTCGCTTACTTGGTAAGTGACCTGGACAAGGGTTTCACCCAATT	720
<i>C. krusei</i>	AGATTGGACGCTTCTTATGCTGMAATGMAAGCGACTTGGATAAGGGCTTTACCCCTCTG	
<i>C. albicans</i>	ATTTTTGACCGTTCATTTGCTCAATTAATCTGATTTAGATAAAGGGTTTACCCCTATT	
<i>C. parapsilosis</i>	AGATTGATGCTTCATTTGCTCAATTTGGTAAGCTGATTTAGATAAAGGGATTCACCCAATC	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	AACITCGTCTTCCCTAACTTGCTCTAGAACACTACAGAAAGGAGACCCATGCCCCAACAA	780
<i>C. krusei</i>	AAITTCGTCTTCTCCTATTTGOCATTGCCTAACTACTGGAAAPRGAATGCTGCTCATAAG	
<i>C. albicans</i>	AAITTTGTTTTCCCTAATTTACCTTTACCTCATTATGGAGACGATGCTGCTCAAAG	
<i>C. parapsilosis</i>	AAITTTGTTTTCCCACTTGCCATTACCTCATTATGGAAACGATGCTGCTGCGCAACAA	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	GCTATCTCTGGTACTTACATGTCCTTGATTAAGGAAAGACGTGAGAAGAACGATATCCA-	840
<i>C. krusei</i>	AACATCTCAAACACTTACTTGGATTTGATCAATACAAAGCGTGCCGGTGGTGAATCAAA-	
<i>C. albicans</i>	AAATCTCTGCTACTTATATGAAGAAATTAACCTGAGAAGAGAACGTGGTGATATTGAT	
<i>C. parapsilosis</i>	AAGATTCTGAAACGTATATGACAGAGATTGCTAGAGAGAGAGACGGGTGACATTGAT	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	--AAACCGTGACTTGATTGATGAATTGATGAAGAACCCACTTACAAAGGATGGTACTAAG	900
<i>C. krusei</i>	--AAATGAGGATTGGTTGATGCATTGTTGAAAAATTCAGTTTACAAAGGATGGTACTAGA	
<i>C. albicans</i>	CCAAATCGTGATTTAATTGATTCCTTATTGATTCATTCACCTTATAAGAATGGTGTGAAA	
<i>C. parapsilosis</i>	GAAATCGTGATTTAATCGATTCTTTATTGGTAAACTCTACATACAAGAATGGTGTAAA	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	ATGACCACCAAGAAATTTCAACCTATTGATTGGTGTCTTGATGGTGGTCAACATACT	960
<i>C. krusei</i>	ATGACCACCAAGAAATTTGCCACTTATTGATTGGTGTCTTAAATGGTGGTCAACATACT	
<i>C. albicans</i>	ATGACTGATCAAGAAATTTGTAATCTTTAATTGGTATTCTTATGGTGGTCAACATACT	
<i>C. parapsilosis</i>	ATGACTGATCAAGAAATTTGTAACCTTATTGATTGGTGTCTTGATGGGAGACAGCATACT	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	TCCGCTGCTACCTCCGCTTGGTGTCTATTGCATTGGCTGAAAAGCCAGATGTCCAAGAA	1020
<i>C. krusei</i>	TCTTCTGCAACATCTGCTTGGTCTTATTACACCTTGGTAAAAAACCATAATTACAAGAA	
<i>C. albicans</i>	TCTGCTTCTACTTCTGCTTGGTCTTGTACATTAGGTGAAAAAACCATAATTACAAGAT	
<i>C. parapsilosis</i>	ATGCCACTACATCTGCTTGGTTTTTGTTCATTGGCTGAGAAGCCACAATTACAAGAT	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	GAATTGTACCAAGAACAATGCGCGTCTTG-----AACAAACGATACCAA---GGAA	1080
<i>C. krusei</i>	GAAATTACAGAGAAAATCCAATCCGTTTAA-----GGTGAATAATTCGAAAAGAGAA	
<i>C. albicans</i>	GTCATTATCAAGAAGTTGTTGAATTATTGAAAGAAAAGGTGGTGAATTTGAA---TGAT	
<i>C. parapsilosis</i>	GAATTGTATCAAGAGTTCTTAAATGCTTATCTGGTAAAGGTGGCAACTTGGAA---TGAT	
	* *	
<i>C. glabrata</i>	TTGACTTACGATGACCTACAAAACATGCCTCTATTGAACCAAATGATCAAGGAAACTTTG	1140
<i>C. krusei</i>	CTCACTTATGATGACTTACAAAACCTCGATTAGTCAACGCCACAATCAAGAGACCTTA	
<i>C. albicans</i>	TTGACTTATGAAGATTACAAAACATACCATCAGTCAATAACACTATTAAAGGAACTCTT	
<i>C. parapsilosis</i>	TTATCGTATGAGGATTGCAACAAATGCCATGGTTAACCAACCATCAAGGAAACCTTC	
	* *	



**Tabla 10.** Porcentaje de identidad presentado entre las secuencias del gen *ERG11* de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. krusei</i>	100%	64.74%	63.41%	62.88%
<i>C. glabrata</i>	64.74%	100%	64.40%	65.42%
<i>C. albicans</i>	63.41%	64.40%	100%	73.80%
<i>C. parapsilosis</i>	62.88%	65.42%	73.80%	100%

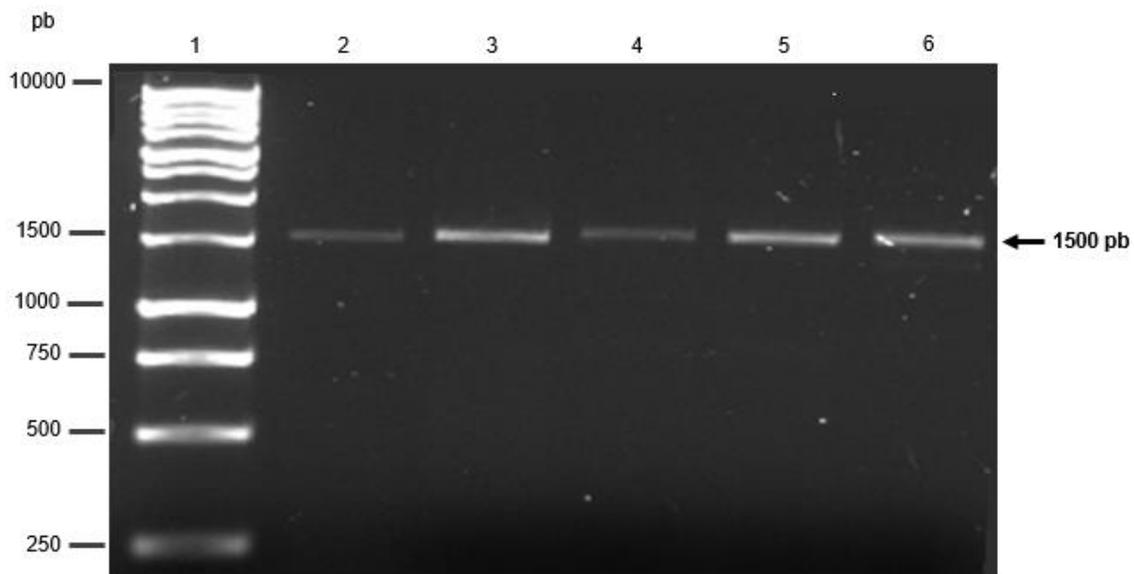
**Tabla 11.** Oligonucleótidos para la amplificación del gen *ERG11*.

Especie	Clave	Dirección	Secuencia (5'→3')	Largo	Tm	%GC
<i>C. glabrata</i>	OCg1	Directo	CATTGGCGCAGAGAGTGTCTA	21	65.4	52.38
	OCg4	Reverso	GGATGCCTCTTTTCCCAGTA	20	62.9	50.00
<i>C. krusei</i>	Ock1	Directo	TTCTCGCATACAGCCACTTT	20	62.4	45.00
	Ock4	Reverso	AGTTCTTTTGTCTTCYCTCCCA	22	60.8	40.91
<i>C. parapsilosis</i>	OCp1	Directo	TAGCCCTTCATGGGTACAAC	20	61.4	50.00
	OCp4	Reverso	TCAGATTACACATGTATCTCTTTT	25	57.5	28.00

## 7.7 Amplificación y secuenciación de un fragmento del gen *ERG11*

Para determinar si existen mutaciones asociadas a la resistencia a los azoles en el gen *ERG11* de las cepas de *Candida* spp. resistentes, se procedió a amplificar un fragmento del gen *ERG11* mediante PCR. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1% observando que las 5 cepas de *Candida* spp. analizadas amplificaron un producto de 1500 pb (Figura 22). Los productos amplificados de las 5 cepas de *Candida* spp. se purificaron y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM observando que en la cepa 302-H se logró secuenciar un producto de 398 pb, en la cepa 1421-H un producto de 515 pb, en la cepa 434-H un producto de 354 pb, en la cepa 1030-H un producto de 1469 pb y en la cepa 735-H un producto de 278 pb (Figura 23). Para el análisis de las secuencias se realizaron alineaciones con secuencias del gen *ERG11* correspondientes a cada especie de *Candida*. En la cepa 302-H se identificaron las siguientes mutaciones: G121T, A125G, C126T, C128A, G470C, G483A, T492A y G493C, de las cuales 7 dan lugar a sustitución de aminoácidos (G121T, A125G, C126T, C128A, G470C, T492A y

G493C) (Figura 24, Tabla 12). En la cepa 1421-H se identificaron las siguientes mutaciones: C1058A, A1073T, G1092C, C1215T y A1421T, de las cuales 4 dan lugar a sustitución de aminoácidos (C1058A, A1073T, G1092C y A1421T) (Figura 25, Tabla 12). En la cepa 434-H no se identificaron mutaciones (Figura 26, Tabla 12). En la cepa 1030-H se identificaron las siguientes mutaciones: G453T, C461G y A463C, de las cuales todas dan lugar a sustitución de aminoácidos (Figura 27, Tabla 12). En la cepa 735-H se identificaron las siguientes mutaciones: C1256T, A1257T, C1271G, C1275T, A1286T, G1303T, T1311G, G1352A y A1438T, de las cuales 7 dan lugar a sustitución de aminoácidos (C1256T, A1257T, C1271G, A1286T, G1303T, G1352A y A1438T) y una ha sido reportada anteriormente relacionada a la resistencia a los azoles (G1303T) (Figura 28, Tabla 12).



**Figura 22.** Amplificación del gen *ERG11* de las cepas de *Candida* resistentes. Los productos amplificados del gen *ERG11* fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% y teñido con BrEt. 1) Marcador de tamaño molecular de 1Kb; 2) Cepa 302-H; 3) Cepa 1421-H; 4) Cepa 434-H; 5) Cepa 1030-H; 6) 735-H.

```

>302-H
ATGCCCTGAATTGTGTAAACATCACATGGCAATTGCTTTACTCCTTGAGA
AAGGACAGACCACCCTTTGTGTTCTACTGGATCCCATGGGTCCGGCTCTGC
TATCCCATACGGTACCAAGCCATACAGATTTCTTCCGAAGACTGCCAAAAGA
AATACGGTGATATCTTCTCTTCATGCTAATGGGTAGAATTATGACTGTC
TACTTGGGTCCAAAGGGTCACGAATTCATCTTCAACGCCAAGTTGGCCGA
TGTTTCCGCTGAAGCTGCTTACTCCCACTTGACCACCCAGTGTTCGGTA
AAGGTGTTATCTACGATTGTCCAAACCACAGACTAATGGAACAAAAGAAG
TTTGTCAAGGCTGCTTTGACTAAAGAAAGCCTTACTCAGATACGTTCCA

>1421-H
GYGKKTITTTGTWCATCGTATAACRAGWAATTGWCTTTCGATGACCTACA
AAACATCCCTCTATTGAACCAAATGATCAAGGAAACTTTGAGATTGCACC
AGCCATTGCACCTTTTGTTCYGTAAAGTCATGAGAGATGTCGCTATTCCA
AACACTTCTACGTTGTTCYCAAGGACTACCACGTTCTAGTCTCCCCAGG
TTACACTCACTTGCAAGAAATTTCTCCCTAAGCCAAATGAATTCAACA
TCCACCGTTGGGACGGTGTGCTGCTTCTTCCAGTGTCTGCTGGTGTGAC
GAAGTTGATTACGGTTTCGGTGTATCTCCAAAGGGTGTTCCTCTCCATA
CTTGCCATTCCGGTGGTGTAGACAGATGTATCGGTGAATTGTTCCGCTT
AMWGTCAATTGGGTGTGTTGATGTCCATTTTATCAGAACCMTGATATGG
CGTTACCCAACTGAAGGTGAAACTGTCCCACTATGACTCACTCCATG
GTCACCTACMGTYCC

>434-H
ACGAMAGAAGTGTGGTGATATCCATTCCCTTTCTTACTCTGCGCTTTG
GCAACTCCTCTACTCGTTCCGTAAAGGACAGAGTCCCAATGGTCCACTACT
GGATCCATGGGTCCGGCTCCGCGTGTGTTACGGAATGCAACCTTACGAG
TTTTTTGAGAATTTGCGTAAACAACATGGTGTGTTTTCTCTCTCTCT
GTTGGGCAAGGTCATGACTGTTTATCTTGGTCCAAAGGGCCATGAGTTTG
TCCTCAATGCAAAAGTTGATGATGTCTCCGCGAAGATGCTTACCCCAT
CTCACCACTCCWGTTCGTTAAGGGYGTCAATTTACGATWGTCCAAATTK
YTAA

>735-H
ACGTTTCTGATTTCAACCGTCATAGATGGGATGTATCAGCATCCACCAAT
TACGACGGGGAAGTTGATTATGGATTTGGTAAAGTTTCCAAAGGTGTTAA
CTCTCGTATTGCCCATTGGTGGTGGAAAGCATAAGATGATTTGGTGAAC
AGTTTGCCTATGTCCAATTGGGAACAATCTTGACCTCATTGTTTATAAT
CTTAAATGGAATGGCAATGGTAAAGTGCCTGATGTTGATTATCTTCA
ATGGTTACGTTCTCACTCCCAAGGG

```

Figura 23. Secuencias del gen *ERG11* de las cepas de *Candida* resistentes a los azoles.

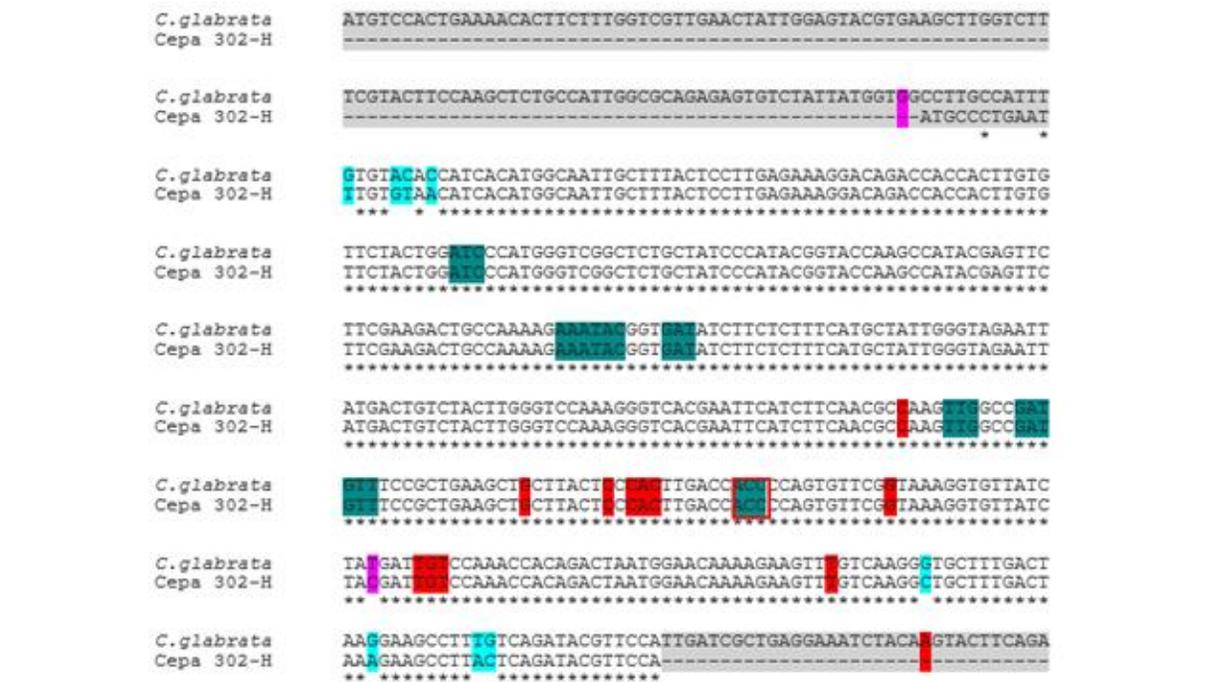
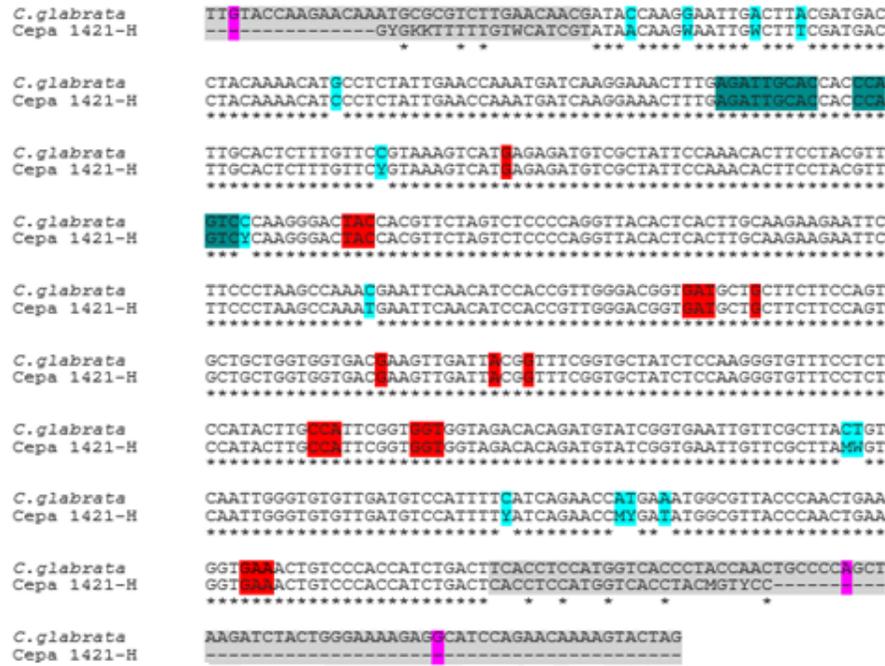
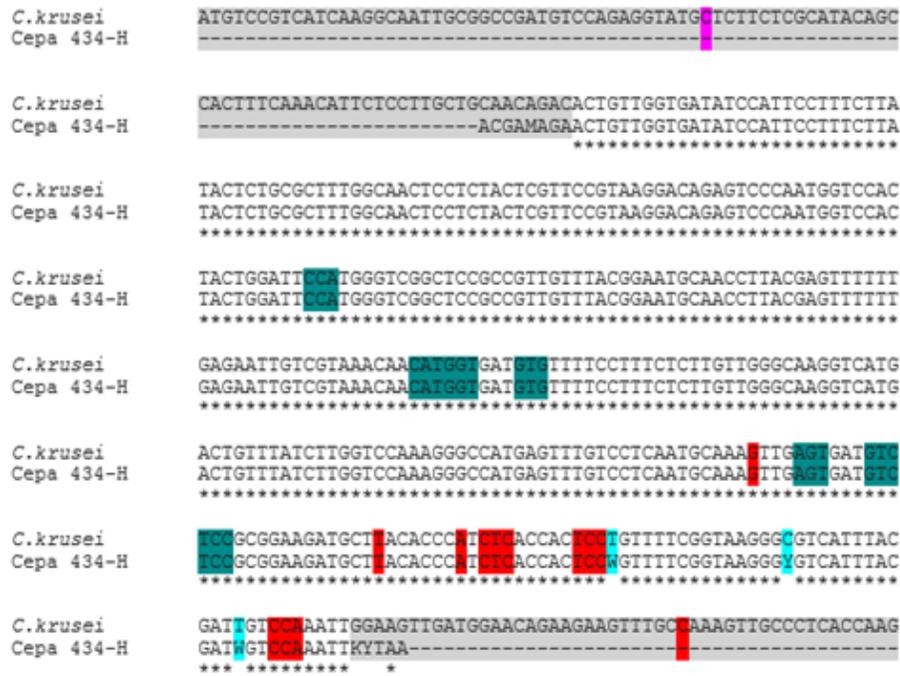


Figura 24. Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 302-H y la secuencia del gen *ERG11* de *C. glabrata*.



■ Cambios encontrados entre diferentes cepas. 
 ■ Mutaciones asociadas a resistencia. 
 ■ Puntos de interacción con los azoles. 
 ■ Mutaciones encontradas.

**Figura 25.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 1421-H y la secuencia del gen *ERG11* de *C. glabrata*.



■ Cambios encontrados entre diferentes cepas. 
 ■ Mutaciones asociadas a resistencia. 
 ■ Puntos de interacción con los azoles. 
 ■ Mutaciones encontradas.

**Figura 26.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 434-H y la secuencia del gen *ERG11* de *C. krusei*.

*C. krusei* ATGTCGGTCATCAAGGCAATTGCGGCCGATGTCCAGAGGTAIGTCTTCTCGCATAACAGC  
Cepa 1030-H

*C. krusei* CACTTTCAAACATTTCTCCTTGTGCAACAGACACTGTTGGTGATATCCATTCCTTTCTTA  
Cepa 1030-H  
-----TAATTTATGCTGCACAGACACTGTTGGTGATATCCATTCCTTTCTTA  
\* \* \* \*

*C. krusei* TACTCTGCGCTTTGGCAACTCCTCTACTCGTTCGTAAGGACAGAGTCCCAATGGTCCAC  
Cepa 1030-H  
TACTCTGCGCTTTGGCAACTCCTCTACTCGTTCGTAAGGACAGAGTCCCAATGGTCCAC  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* TACTGGATTTCGTTGGGTCGGCTCCGCCGTTGTTTACGGAATGCAACCTTACGAGTTTTTT  
Cepa 1030-H  
TACTGGATTTCGTTGGGTCGGCTCCGCCGTTGTTTACGGAATGCAACCTTACGAGTTTTTT  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* GAGAATTGTCGTAACAAATGGTGATTTTTCTTTCTCTGTGGGCAAGGTCATG  
Cepa 1030-H  
GAGAATTGTCGTAACAAATGGTGATTTTTCTTTCTCTGTGGGCAAGGTCATG  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* ACTGTTTATCTTGGTCCAAAGGCCATGAGTTTGTCTCAATGCAAAATTGGATGAT  
Cepa 1030-H  
ACTGTTTATCTTGGTCCAAAGGCCATGAGTTTGTCTCAATGCAAAATTGGATGAT  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* TCGCGGAAGATGCTACACCCCTTACCACCTGTTTTCGGTAAGGGCGTCATTTAC  
Cepa 1030-H  
TCGCGGAAGATGCTACACCCCTTACCACCTGTTTTCGGTAAGGGCGTCATTTAC  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* GATTGTAAATTGGAAGTTGATGGAACAGAAAGATTGGCAAGTTGCCCTCACCAG  
Cepa 1030-H  
GATTGTAAATTGGAAGTTGATGGAACAGAAAGATTGGCAAGTTGCCCTCACCAG  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* GAATCCTTTATTAGTTCGTCCCCCTCATCAAGGACGAGATGCTCAAGTTTTCATGCC  
Cepa 1030-H  
GAATCCTTTATTAGTTCGTCCCCCTCATCAAGGACGAGATGCTCAAGTTTTCATGCC  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* AACTTTAGGGGGGACTCGGGCAAACCGATGTTTTGAAATCGCAGTCGGAAATGACCGTC  
Cepa 1030-H  
ACCTTTAGGGGA-----TYYGGGCAACCGATGTTTTGAAATCGCAGTCGGAAATGACCGTC  
\* \* \* \*

*C. krusei* TTTACCGCATCTTCTCTCTTGGTGACGCTCTACGTAAAGATTGGACGCTTCTTAT  
Cepa 1030-H  
TTTACCGSATCTTCTCTCTTGGTGACGCTCTACGTAAAGATTGGACGCTTCTTAT  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* GCTGAGATGTACAGCGACTTGGATAGTTTACCCTGTAATTCGTCTTCTCCTAT  
Cepa 1030-H  
GCTGAGATGTACAGCGACTTGGATAGTTTACCCTGTAATTCGTCTTCTCCTAT  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* TTGCCATTGCTAACTACTGAAAAGAGATGCTGCATAAGATCTCAAACACTTAC  
Cepa 1030-H  
TTGCCATTGCTAACTACTGAAAAGAGATGCTGCATAAGATCTCAAACACTTAC  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* TTGGATTTGATCAATACAAAGCGTGCCGGTGGTGAATCAAAAATGAGGATTTGGTTGAT  
Cepa 1030-H  
TTGGATTTGATCAATACAAAGCGTGCCGGTGGTGAATCAAAAATGAGGATTTGGTTGAT  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* GCATTGTTGAAAATTCAGTTTACAAGGATGGTACTAGAAAGACCGACGAGGAATTAGCC  
Cepa 1030-H  
GCATTGTTGAAAATTCAGTTTACAAGGATGGTACTAGAAAGACCGACGAGGAATTAGCC  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* CACTTGATGATTGGTGTCTAATGGGTGGTCAACATACTTCTTCAACATCTGCTTGG  
Cepa 1030-H  
CACTTGATGATTGGTGTCTAATGGGTGGTCAACATACTTCTTCAACATCTGCTTGG  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* TTCTTATTACCTTTGGTGA AAAACCTCAATTACAAGAAAGAAATTTACAGAGAAATCCAA  
Cepa 1030-H  
TTCTTATTACCTTTGGTGA AAAACCTCAATTACAAGAAAGAAATTTACAGAGAAATCCAA  
\*\*\*\*\*

*C. krusei* TCGGTTTTAGGTGAAAATTCGAAAGAGA ACTCACTTATGATGACTTACAAAACCTCGAT  
Cepa 1030-H  
TCGGTTTTAGGTGAAAATTCGAAAGAGA ACTCACTTATGATGACTTACAAAACCTCGAT  
\*\*\*\*\*

```

C.krusei      TTAGTCAACGCCACAATCAAAGAGACCCTAAGATTGCACATGCCATTACATTCGATTTC
Cepa 1030-H   TTAGTCAACGCCACAATCAAAGAGACCCTAAGATTGCACATGCCATTACATTCGATTTC
*****

C.krusei      AGGAAAGTCACTCGTGATTACCCTGTCCAAACACTTCGTACATTGTTCCAAAGGGCCAT
Cepa 1030-H   AGGAAAGTCACTCGTGATTACCCTGTCCAAACACTTCGTACATTGTTCCAAAGGGCCAT
*****

C.krusei      TAGTTTTGATCTCCAGGTTATAACAATGTTAAGTGAAAGATACTTCCTAATGCCAGC
Cepa 1030-H   TAGTTTTGATCTCCAGGTTATAACAATGTTAAGTGAAAGATACTTCCTAATGCCAGC
*****

C.krusei      GAATFCCAACCTCATAGATGGGATGAAATCAAGTCCATTGATGGTGTCTCTTTGCCT
Cepa 1030-H   GAATFCCAACCTCATAGATGGGATGAAATCAAGTCCATTGATGGTGTCTCTTTGCCT
*****

C.krusei      GCTGAAGGTGAAAATCAAAGGAAATGCGATTACGGTTCGGTAAGATCTCTAAAGGT
Cepa 1030-H   GCTGAAGGTGAAAATCAAAGGAAATGCGATTACGGTTCGGTAAGATCTCTAAAGGT
*****

C.krusei      GTTGCATCCCTTACTTACCTTTGGTGGTGGTAGACATAGATGATTGGTGAACCTTTT
Cepa 1030-H   GTTGCATCCCTTACTTACCTTTGGTGGTGGTAGACATAGATGATTGGTGAACCTTTT
*****

C.krusei      GCTTACACCCAATTAGGAACTCTTTTGGTCCACTACATCCAGAACTTTAAGTGGACAGCC
Cepa 1030-H   GCTTACACCCAATTAGGAACTCTTTTGGTCCACTACATCCAGAACTTTAAGTGGACAGCC
*****

C.krusei      AAGCTCCCTCCAATTGATTACACCTCTATGGTTACCTTACCAACACAGCCAGCGGAAATC
Cepa 1030-H   AAGCTCCCTCCAATTGATTACACCTCTATGGTTACCTTACCAACACAGCCAGCGGAAATC
***** *      ***      *

C.krusei      AAGTGGGAGGGAAGACAAAAGAAGTAG
Cepa 1030-H   -----

```

■ Cambios encontrados entre diferentes cepas. 
■ Mutaciones asociadas a resistencia. 
■ Puntos de interacción con los azoles. 
■ Mutaciones encontradas.

**Figura 27.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 1030-H y la secuencia del gen *ERG11* de *C. krusei*.

```

C.parapsilosis  CAGTATTGGTGTCCAGGTTATGCTCATACAAACGAAAGATTTACAAGGACCCTCT
Cepa 735-H      -----ACGTTTCT
*****

C.parapsilosis  GATTTCACCTTCACAGATGGGATGATCAGCATCCACCAATGAGCAAGTGAAGTTGAT
Cepa 735-H      GATTTCACCTTCACAGATGGGATGATCAGCATCCACCAATGAGCAAGTGAAGTTGAT
*****

C.parapsilosis  TATGGATTGGTAAATTTCCAAAGTGTACTCTTCGTATTGCCATTGGTGGTGGGA
Cepa 735-H      TATGGATTGGTAAATTTCCAAAGTGTACTCTTCGTATTGCCATTGGTGGTGGGA
*****

C.parapsilosis  AGACATAGAGGATTGGTGCAGTTTGCCTATGICCAATTGGGAACAATCTTGACCA
Cepa 735-H      AGACATAGAGGATTGGTGCAGTTTGCCTATGICCAATTGGGAACAATCTTGACCA
*****

C.parapsilosis  TTTGTTTATAATCTTAAATGGAAATGGCARRATGGTAAAGTGCCTGATGTTGATTACT
Cepa 735-H      TTTGTTTATAATCTTAAATGGAAATGGCARRATGGTAAAGTGCCTGATGTTGATTACT
*****

C.parapsilosis  TCAAGTTACGTTACCTCAACACCCAGCAGAAATGTTTGGGAAAAGAGATACATGT
Cepa 735-H      CAAAGTTACGTTACCTCAACACCCAGCAGAAATGTTTGGGAAAAGAGATACATGT
*****

C.parapsilosis  GTAATCTGA
Cepa 735-H      -----

```

■ Cambios encontrados entre diferentes cepas. 
■ Mutaciones asociadas a resistencia. 
■ Puntos de interacción con los azoles. 
■ Mutaciones encontradas.

**Figura 28.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la cepa 735-H y la secuencia del gen *ERG11* de *C. parapsilosis*.

**Tabla 12.** Mutaciones encontradas en el gen *ERG11* de las cepas de *Candida* resistentes.

Cepa y Especie	Mutaciones	Cambio de aminoácido	Reportadas anteriormente relacionadas con resistencia a los azoles
<b>302-H</b> <i>C. glabrata</i>	G121T	Valina por Leucina	NO
	A125G	Tirosina por Cisteina	NO
	C126T	Tirosina por Cisteina	NO
	C128A	Treonina por Asparagina	NO
	G470C	Glicina por Alanina	NO
	G483A	NO	NO
	T492A	Fenilalanina por Leucina	NO
	G493C	Valina por Leucina	NO
<b>1421-H</b> <i>C. glabrata</i>	C1058A	Treonina por Asparagina	NO
	A1073T	Tirosina por Fenilalanina	NO
	G1092C	Metionina por Isoleucina	NO
	C1215T	NO	NO
	A1421T	Lisina por Isoleucina	NO
<b>434-H</b> <i>C. krusei</i>	NO	NO	NO
<b>1030-H</b> <i>C. krusei</i>	G453T	Lisina por Aspragina	NO
	C461G	Alanina por Glicina	NO
	A463C	Lisina por Glutamina	NO
<b>735-H</b> <i>C. parapsilosis</i>	C1256T	Alanina por Valina	NO
	A1257T	Alanina por Valina	NO
	C1271G	Prolina por Arginina	NO
	C1275T	NO	NO
	A1286T	Ac. Glutámico por Valina	NO
	G1303T	Ac. Aspártico por Tirosina	SI (Ming-Jie, 2013)
	T1311G	NO	NO
	G1352A	Serina por Asparagina	NO
	A1438T	Treonina por Serina	NO

## VIII. DISCUSIÓN

La candidiasis invasiva o candidemia, se considera la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados con compromiso inmune (Del Palacio, 2009). Actualmente para el tratamiento de la Candidemia se utilizan principalmente los antifúngicos pertenecientes a la familia de los azoles. El mecanismo de acción de los azoles es a nivel de membrana plasmática inactivando a la enzima Lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa (Mellado, 2002). Se han descrito varios mecanismos de resistencia para estos antifúngicos, uno de los cuales es la presencia de mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima blanco (*ERG11*) (Parker, 2014).

En nuestro país existen pocos estudios relacionados a la distribución de especies, susceptibilidad antifúngica y mecanismos moleculares de resistencia en cepas de *Candida* spp. relacionadas a Candidemias, y específicamente en el Estado de Durango no existen estudios sobre estos temas, por lo que se consideró que la realización de este proyecto es de gran importancia.

En el presente estudio, se lograron obtener un total de 56 cepas de *Candida* spp. aisladas de líquidos estériles de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial, se considera es un buen número de aislados tomando en cuenta los criterios con los cuales fueron elegidos y la prevalencia de casos en México. En cuanto al género de los pacientes que se aislaron las cepas, no se tiene una gran diferencia entre el género masculino (53%) y el femenino (43%) lo cual nos indica que la prevalencia de la candidemia no tiene relación con el género. Por lo contrario, se encontró una diferencia bastante marcada entre los pacientes pediátricos (64%) y adultos (34%), lo cual pudiera deberse a que los primeros tienen un sistema inmune poco desarrollado, y como se mencionó al principio del documento estas infecciones acontecen principalmente en este tipo de pacientes. En cuanto a la fuente de aislamiento solo se obtuvieron las cepas de 2 fuentes: hemocultivo (96%) y líquido peritoneal (4%), el que solo se obtuvieran muestras de 2 fuentes fue debido a que solo se incluirían cepas de líquidos estériles, y que el hemocultivo fuera la principal fuente de aislamiento se debe a que por lo general el diagnóstico de la Candidemia se da principalmente por hemocultivo (Bonifaz, 2012). En lo referente al servicio de aislamiento se obtuvieron

mayor número de cepas de la UTIP (11 cepas) y la UCIN (11 cepas) lo cual nos indica que la Candidemia acontece mayormente en pacientes pediátricos con inmunodepresión.

En la identificación de los aislados clínicos de *Candida* spp. con el equipo BD Phoenix™ se encontró una mayor prevalencia de *C. albicans* (30.3%) lo cual coincide con reportes previos de otros autores (Forastiero, 2015), por otra parte, con el CHROMagar *Candida* se encontró una mayor prevalencia a *Candida* spp., lo cual pudiera estar relacionado a que éste método de identificación es más limitado en cuanto a las especies que logra identificar (solo 2 especies).

En las pruebas de susceptibilidad antifúngica se encontraron un total de 6 cepas resistentes (10.7% de resistencia total) a los azoles analizados: La cepa 735-H fue resistente a los 3 antifúngicos, la cepa 302-H fue resistente al fluconazol e itraconazol, las cepas 434-H, 1030-H y 581-H fueron resistentes al fluconazol y la cepa 1421-H fue resistente al itraconazol. El porcentaje de resistencia encontrado coincide con un estudio previo realizado en España (Aguilar, 2015) en donde se reportó una resistencia del 13.6%, lo cual nos indica que en el Estado de Durango el porcentaje de resistencia es similar al de otros lugares.

Después de realizar las amplificaciones y secuenciaciones de las regiones ITS correspondientes a cada cepa resistente se realizó el análisis molecular de cada secuencia mediante BLAST, lo cual nos dió como resultado 3 cepas de *C. glabrata* (302-H, 1421-H y 581-H), 2 cepas de *C. krusei* (434-H y 1030-H) y una cepa de *C. parapsilosis* (735-H). Al realizar las comparaciones de especies encontradas utilizando los diferentes métodos (Equipo BD Phoenix™, CHROMagar *Candida* y Molecular) (Tabla 9) se observó que solo una de las cepas (434-H) coincidió en el método molecular y el equipo BD Phoenix™, las otras fueron diferentes según el método utilizado. El análisis de identificación de especies nos indica que tanto el método por equipo BD Phoenix™ como el CHROMagar son poco confiables ya que tienen bajo porcentaje de identificación, en comparación al método molecular que tiene alrededor de 95% de confianza. Al verificar la especie de cada cepa se encontró que las cepas 302-H y 581-H eran *C. glabrata*, especie que tiene un mayor punto de corte para el fluconazol en comparación a las otras, lo cual ocasionó que ya no fuera considerada

una cepa resistente para este antifúngico, por lo que solo quedaron 5 cepas resistentes (302-H, 1421-H, 434-H, 1030-H y 735-H).

Al realizar la amplificación del gen *ERG11* se decidió que, por ser un gen relativamente grande, solo se amplificaría la zona del gen que abarcara los principales puntos de interacción con los azoles y las mutaciones relacionadas a resistencia que se habían reportado anteriormente (Figura 21). Después de amplificar y secuenciar el gen *ERG11* varias veces no se lograron obtener las secuencias completas ya que durante la secuenciación se tuvieron dificultades, por lo que se optó por hacer el análisis molecular con los datos de los fragmentos que se logró secuenciar de cada cepa. En el análisis molecular de los fragmentos del gen *ERG11* secuenciado de cada especie (Figura 24 a la 28) se encontraron varias mutaciones excepto para la cepa 434-H que no presentó mutaciones (Tabla 12). Al analizar las mutaciones encontradas solo se encontró una (G1303T) que había sido reportada anteriormente y que está relacionada a resistencia a los azoles en la cepa 735-H, de las otras mutaciones la mayoría presenta cambios de aminoácidos, excepto 4 (G483A, C1215T, C1275T, T1311G), por lo que estas mutaciones podrían estar relacionadas a la resistencia ya que podrían provocar cambios en la estructura tridimensional de la enzima y hacer que su sitio activo se modifique y los azoles ya no puedan ser afines a este. Para determinar si existen una asociación de las mutaciones identificadas en las cepas de *Candida* a la resistencia a los azoles se tendrían que hacer cepas mutantes y caracterizarla la susceptibilidad de estas cepas a los azoles.

## IX. CONCLUSIONES

- En la distribución de especies, para el total de los 56 aislados de *Candida* spp., se encontró con mayor prevalencia a *C. albicans* (30.3%) seguida de *C. tropicalis* (23.2%), *C. lusitaniae* (17.8%), *C. glabrata* (8.9%), *C. parapsilosis* (8.9%), *C. famata* (3.5%), *C. spp.* (3.5%), *C. krusei* (1.7%) y *C. lipolytica* (1.7%).
- En las pruebas de susceptibilidad a los azoles se obtuvo un 9% de resistencia en cepas *no-albicans* (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis*, 2 *C. krusei*).
- En los productos secuenciados del gen *ERG11* de las cepas *no-albicans* resistente analizadas, se encontraron varias mutaciones las cuales pudieran estar relacionadas a la resistencia a los azoles.

## X. PERSPECTIVAS

- Llevar acabo la clonación y secuenciación del gen *ERG11* de las cepas no-*albicans* resistente analizadas para hacer un análisis más completo de las secuencias de este gen e identificar que otras mutaciones presentan que puedan asociarse a la resistencia a los azoles.
- Realizar mutagénesis de sitio dirigido en cepas de *Candida* sensibles para comprobar si las mutaciones pueden ocasionar la resistencia a los azoles.

## XI. REFERENCIAS

**Aguilar G**, Delgado C, Corrales I, Izquierdo A, Garcia E, Moreno T, Romero E, Ferrando C, A. Crbonell J, Borrás R, Navarro D, Belda J. Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. BMC Rest Notes. 2015; 8:491.

**Arendrup MC**. *Candida* and Candidaemia Susceptibility and Epidemiology. Danish Medical Journal. 2013; 60: B4698.

**Ben-Ami R**, Denning D. Estimating the Burden of Fungal Diseases in Israel. IMAJ. 2015; 17: 374-379.

**Boğa C**, Bolaman Z, Çağırğan S, Karadoğan I, Özcan M, Özkalemkaş F, Saba R, Sönmez M, Şenol E, Akan H, Akova M. Recommendations for Risk Categorization and Prophylaxis of Invasive Fungal Diseases in Hematological Malignancies: A Critical Review of Evidence and Expert Opinion (TEO-4). Turk J Hematol. 2015; 32:100-117.

**Bonifaz A**. Micología medica básica. Tercera edición. Editorial Mc Graw Hill. 2010. Pp. 290-298.

**Bonifaz A**. Micología medica básica. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. 2012. Pp. 84-87.

**Cantón E**, Mazuelos E, Espinel A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología. 2007; 15: 1-8.

**Cardozo C**, Mensa J. Manejo de la candidiasis invasiva en el paciente no neutropénico. Rev Esp Quimioter. 2015; 28: 34-37.

**Chen K**, Wang Q, Pleasants R, Ge L, Liu W, Peng K, Zhai S. Empiric treatment against invasive fungal diseases in febrile neutropenic patients: a systematic review and network metaanalysis. *BMC Infectious Diseases*. 2017; 17: 159.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. (Approved standard. M27-A3).

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. (Document M27-S4).

**Corzo-Leon D**, Armstrong-James D, Denning D. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*. 2015; 58: 34-44.

**Cruz R**, Álvarez P, Provoste F, Ducasse K, González M, Wilson G, Díaz J. Enfermedad fúngica invasora (EFI) por hongos filamentosos en la Región de Valparaíso, Chile, desde la implementación del diagnóstico rápido de laboratorio. *Rev Chilena Infectol*. 2015; 32: 221-224.

**Cuenca M.** Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30: 257–264.

**Del Palacio A**, Villar J, Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2009; 26:1130-1406.

**Dignani MC.** Epidemiology of invasive fungal diseases on the basis of autopsy reports. *Prime Reports*. 2014; 6:81.

**Falagas ME**, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2010; 14: 954-966.

**Forastiero A**, Garcia-Gil V, Rivero-Menendez O, Garcia-Rubio R, Monteiro MC, Alastruey-Izquierdo A, Jordan R, Agorio I, Mellado E. Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. *American Society for Microbiology*. 2015; 59: 6975-6982.

**Fuentes M**, Hermosilla G, Alburquenque C, Falconer MA, Amaro J, Tapia C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en cepas clínicas chilenas de *Candida albicans*. *Antimicrobianos*. 2014; 31: 511-517.

**Ghannoum MA**, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12:501-517.

**Gołabek K**, Strzelczyk JK, Owczarek A, Cuber P, Ślemp-Migiel A, Wiczkowski A. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. *Acta Biochim Pol*. 2015; 62: 247-51.

**González GM**, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004-2007) surveillance study. *J Clin Microbio*. 2008; 46:2902-2905.

**González GM**, Treviño-Rangel RJ, Palma-Nicolás JP, Martínez C, González JG, Ayala J, Caballero A, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Velarde F, Ascencio EP, Tinoco JC, Vázquez JA, Cano MA, León-Sicairos N, González R, Rincón J, Elías MA, Bonifaz A. Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal

isolates in pediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 1-5.

**He X**, Zhao M, Chen J, Wu R, Zhang J, Cui R, Jiang Y, Chen J, Cao X, Xing Y, Zhang Y, Meng J, Deng Q, Sui T. Overexpression of Both ERG11 and ABC2 Genes Might Be Responsible for Itraconazole Resistance in Clinical Isolates of *Candida krusei*. *PLOS ONE.* 2015; 10: 0136185.

**Hoffman C**, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *El sevier Science Publishers.* 1987; 57: 267-272.

**Jawetz**, Melnick, Adelberg. *Microbiología médica.* 25ª edición. Editorial Mc Graw Hill. 2011. Pp. 647-649.

**Lafuente D**, Hernández F, De La Fuente N. Relevance of the Appropriate Control and Detection of Phytopathogens Fungi in Strawberries (*Fragaria* spp). 2015. Disponible en línea: <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/?p=175>.

**León C**, Ostrosky L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2014.

**Manzano-Gayosso P**, Méndez-Tovar L, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Méd Méx.* 2008; 144:23-26.

**Mellado E**, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; 20: 523-530.

**Ming-Jie X**, Jin-Yan L, Pei-Hua N, Shengzheng W, Ce S, Bing W, Yu-Xing N, Hai-Liang G. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. FEMS. 2013; 13: 386–393.

**Morschhauser J**. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta. 2002; 1587:240-248.

**Nejat Z**, Farahyar S, Falahati M, Khozani M, Hosseini A, Faiazy A, Ekhtiari M, Hashemi S. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Pattern of Non-albicans *Candida* Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis. Iranian Biomedical Journal. 2017; 1-9.

**Orberá T**. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 15-19.

**Parker J**, Warrilow A, Price C, Mullins J, Kelly D, Kelly S. Resistance to antifungals that target CYP51. J Chem Biol. 2014; 7: 143–161.

**Perea S**, López J, Kirkpatrick W, McAtee R, Santillán R, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson T. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2001; 45: 2676–2684.

**Pontón J**, Quindós G. Mecanismos de Resistencia a la terapéutica antifúngica. Med Clin (Barc). 2006; 126: 56-60.

**Quindós G**. Nosocomial candidemias and invasive candidiasis. Med Clin (Barc). 2010; 134: 17-19.

**Ruiz-Baca E**, Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Reyes-Montes MR, Toriello C. Fungal cell wall antigens for the diagnosis of invasive fungal infections. Nova Science Publishers, Inc. Fungal Cell Wall. *Cap. 8*. 2013; p. 207-208.

**Salazar Aranda R**, Granados Guzman G, Perez Meseguer J, M. Gonzales G, Waksman de Torres N. Activity of Polyphenolic Compounds against *Candida glabrata*. *Molecules*. 2015; 20:17903-17912.

**Sanglard D**, Oise Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino Acid Substitutions in the Cytochrome P-450 Lanosterol 14a-Demethylase (CYP51A1) from Azole-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates Contribute to Resistance to Azole Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1998; 42: 241-253.

**Santos D**, Carbonera L, Araújo A, Pires K, Baruffati a. Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species. 2016; 111: 192-199.

**White T**, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, Inc. *Cap. 38*. 1990; p. 315-322.

**Xu J**, Ramos AR, Vilgalys R, Mitchell TG. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:1214-1220.

**Xu Y**, Sheng F, Zhao J, Chen L, Li C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Arch Microbiol*. 2015.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Carta de aprobación del comité de ética del Hospital General 450.



**HOSPITAL GENERAL 450**  
DEPARTAMENTO DE  
ENSEÑANZA E INVESTIGACION



**COMITÉS DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**  
Asunto: Aprobación de Protocolo  
No. de Folio: 34  
Durango, Dgo., a 16 de Marzo del 2016

**Dra. Estela Ruiz Baca**  
INVESTIGADOR PRINCIPAL  
PRESENTE.

Por medio de la presente le informamos que posterior a la revisión de su protocolo de investigación intitulado: *"Susceptibilidad antifúngica y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia de las especies de candida aisladas de candidemias nosocomiales."* con número de folio 34 obtuvo el siguiente resultado:

APROBADO  APROBADO CON MODIFICACIONES  NO APROBADO

De acuerdo en que sea usted el coordinador de dicho trabajo, el cual podrá ser desarrollado bajo las normas internacionales de ética, y la buena práctica clínica en este Hospital.



**ATENTAMENTE.**



**DR. LUIS ENRIQUE HERRERA JIMENEZ**  
PRESIDENTE DE LOS COMITÉS DE INVESTIGACIÓN  
Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



---

Bvd. José Ma. Patóni No. 403  C.P. 34217 Durango, Dgo, Mex.  Email: [ensenanzahg450@gmail.com](mailto:ensenanzahg450@gmail.com)

## XIII. MEMORIAS

ISSN-1870-1388



### *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*

Órgano de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC,  
y del Consejo Mexicano de Certificación en Infectología AC.

<http://www.amimc.org.mx>



Núm. especial

VOL.37 SUPLEMENTO 2017

**XLII** Congreso Anual de la Asociación  
Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC.

Puebla, Puebla

24 - 27 de mayo de 2017

Centro de Convenciones William O. Jenkins

Indizada en IMBIOMED <http://www.imbiomed.com>

Revista registrada en Latindex, LILACS (Literatura Latinoamericana y de Caribe de la Salud), BIBLIOMEX, CENDS, Secretaría de Salud,  
Subdirección de Investigación IMSS, PUIS, Periódica, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias-UNAM; EMBASE, EXCERPTA MEDICA.

A5

005

**Co-circulación del Virus Dengue Zika y Chikungunya en pacientes con enfermedad febril aguda, residentes de una región endémica.** Andrés-Almaraz Verónica, Ovilla-Muñoz Marbella<sup>1</sup>, Santamaría Mirielle<sup>1</sup>, Rodríguez Damián<sup>1</sup>, Santacruz Clara<sup>1</sup>, González-Bonilla C<sup>1</sup>, Alpocho-Vanada Celis<sup>1</sup>, Martínez-Blanche Jesús<sup>1</sup>. Hospital Regional (Cuerpo) de la Revolución Mexicana. Investigaciones de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, IMSS.

**Objetivo:** Identificar infecciones por los virus Dengue (DENV), Zika (ZIKV) y Chikungunya (CHIKV) en pacientes con manifestaciones clínicas de enfermedad aguda febril y evaluar el desempeño de pruebas diagnósticas serológicas en fase aguda y convalecencia.

**Material y Métodos.**

Durante el periodo junio-diciembre de 2016, se practicó cuestionario de variables clínicas y sociodemográficas y se obtuvo muestra de sangre venosa durante la fase aguda de la enfermedad febril. Casos sospechosos de infección por virus Dengue, Zika, o Chikungunya, de acuerdo a definición operacional de caso establecido por SINAVE. En la mayoría de los casos se pudo obtener una muestra de sangre adicional a 15 y 30 días después de la primera toma. El suero fue almacenado a -20 °C con la extracción de ácidos nucleicos para detección de RNA de arbovirus mediante qPCR de acuerdo a los lineamientos del INREI y la determinación de NS1, IgM e IgG anti-DENV, IgM e IgG anti-ZIKV y anti-CHIKV mediante ELISA (fluorimétrico).

**Resultados.**

De un total de 109 muestras analizadas en fase febril, 47% fueron positivas para IgG anti-DENV y 7.5% positivas para IgG anti-CHIKV, reflejando la endemidad de dengue y la reciente circulación de CHIKV. La combinación qPCR, NS1 (DENV) y la seroconversión de IgM (ZIKV) permitió identificar 28 casos de dengue (26%), 21 casos de Zika (19%) y 9 casos de CHIKV (8%). En tres casos qPCR negativos para DENV y ZIKV no pudo confirmarse el diagnóstico por reactividad cruzada de IgM al día 0. En dos casos qPCR para ZIKV e IgM anti-DENV se sospecha de co-infección, aunque falta determinar seroconversión para ambos virus. Adicionalmente, se identificaron dos casos probables de co-infección por CHIKV (seroconversión IgM, IgM anti-DENV y anti-ZIKV). El 40% de las muestras restantes fueron negativas a los criterios anteriores. Por último, la mitad de los casos de dengue confirmados presentaron IgG anti-ZIKV en la convalecencia, mientras que todos los pacientes con Zika confirmado que fueron IgG+ a dengue en fase aguda (n = 7) seroconvirtieron a IgG anti-dengue.

**Conclusiones.**

Nuestros resultados son consistentes con la amplia circulación de ZIKV en México, la poca utilidad de la IgG para evaluar seroprevalencia de DENV y ZIKV, y el valor del muestreo en la convalecencia para evidenciar seroconversión.

A6

006

**Tipificación de beta-lactamasas en aislamientos de *Enterobacter* spp. obtenidos de pacientes pediátricos**

HERNÁNDEZ GUZMÁN ARACELI<sup>1,2</sup>, DE COLSA AGUSTÍN<sup>1</sup>, MERIDA-VIEYRA J., ARZATE-BARBOSA PATRICIA<sup>2</sup>, CAUICH SÁNCHEZ PATRICIA<sup>1</sup>, AQUINO ANDRADE ALEJANDRA<sup>3</sup>. (1) Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría (INP) (2) Laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Pediatría (3) Laboratorio de Bacteriología y Medicina del Departamento de Microbiología, ENCB-IPN, Ciudad de México.

**Objetivo.** Determinar los subtipos de beta-lactamasas presentes en aislamientos de *Enterobacter* spp. de pacientes pediátricos.

**Material y Métodos.** Se analizaron 25 aislamientos de *Enterobacter cloacae*: 6, de *Enterobacter aerogenes* y 1, de *Enterobacter* spp. obtenidos de pacientes del INP colectados en el periodo comprendido de febrero 2013 a enero 2015. Se analizaron los perfiles de susceptibilidad, y posteriormente se detectaron fenotípicamente beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) con la prueba de difusión de doble disco; así como carbapenemasas usando la prueba CarbaNP. Los genes que codifican las beta-lactamasas TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, VIM, IMP, KPC, NDM y OXA-48 se amplificaron por PCR. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y analizados con herramientas bioinformáticas.

**Resultados.** Todos los aislamientos fueron resistentes a ceftazidima y ceftiraxona, el 90% a aztreonam, 45% a cefepime, 50% a piperacilina/azobactam y el 19% a imipenem. La prueba fenotípica de BLEE fue positiva en 17 aislamientos y la prueba CarbaNP en cinco de ellos. En el 34.3% se detectó TEM; en el 23.3%, SHV; en el 31.2%, CTX-M-1 y en el 15.6% VIM. Los subtipos de beta-lactamasas encontrados fueron SHV-12 y SHV-11, CTX-M-15 y VIM-2.

**Conclusión.** La BLEE más frecuente en aislamientos de *Enterobacter* spp. resistentes a antibióticos beta-lactámicos es CTX-M-15 y en tanto que la carbapenemasa fue VIM-2.

A7

007

**Diarrea por *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enteropatógena multidrogo-resistentes en Jutepec Morelos**

ARELLANO-QUINTANILLA DORIS<sup>1</sup>, TAMAYO-LEGORRETA ELSA, LÓPEZ-GATELL HUGO, MEDINA-JULIAN ROSA MARIA, HERNANDEZ-FRANCO MARIA, HERNANDEZ-BONILLA FATIMA, SILVA-SANCHEZ JESUS, ALPUCHE-ARANDA CELIA.

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Laboratorio Estatal de Salud Pública, Servicios de Salud de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México. [santamayo@insp.mx](mailto:santamayo@insp.mx), [celia.aranda@insp.mx](mailto:celia.aranda@insp.mx)

**Objetivo:** Describir el perfil epidemiológico de enfermedad diarreica aguda (EDA) por *Salmonella* spp y *Shigella* spp y *E. coli* enteropatógenas, en el municipio de Jutepec Morelos.

**Métodos:** Se diseñó un sistema de vigilancia por conglomerados en tres centros de salud de Jutepec y el hospital general de Cuernavaca (referencia). A las personas con EDA se les tomó seroprevalencia. La identificación y susceptibilidad antimicrobiana se determinaron por pruebas convencionales y la detección de *E. coli* enteropatógena por PCR-multiplex. Se definió multiresistencia (MDR) si la bacteria fue resistente a tres o más familias de antibióticos.

**Resultados:** De junio 2015 a mayo 2016 acudieron 265 pacientes con EDA; el mayor número en verano, 31% en niños de 1 a 9 años, 11.3% en < 1 año. En 82 coprocultivos (31.3%) se identificaron las enterobacterias del estudio: *Shigella* en 9, 6 en < 5 años y 7 con resistencia a cotrimoxazol. *Salmonella* se identificó en 9 casos, 7 resistentes a nalidixica. 71 coprocultivos fueron positivos a *E. coli* enteropatógena y de estas 28.1% son MDR. El principal perfil MDR detectado fue AMP-NAL-SXT (75%), se encontró resistencia hacia ceftazidima de 9% y en el caso de ciprofloxacino fue de 15%. Un perfil MDR similar se encontró en las *E. coli* no patógenas (comensales) identificadas en los pacientes.

**Conclusiones:** La mayoría de los casos de EDA se presentaron en niños menores de 5 años, en su mayoría causada por *E. coli* enteropatógena, mostrando un perfil MDR de AMP-NAL-SXT en el 75% de los aislamientos y AMP-CAG-NAL-SXT en casi 25%, los antipépticos más comunes fueron DALC y EETC agregando que se está resurgiendo a las EPEC por alguno de estos. Las diarreas por *E. coli* EPEC se presentaron con cuadros de disenteria igual que las *Shigella*. Aunque los aislamientos de *Shigella* no se habían reportado con anterioridad, gracias al desarrollo avanzado del procedimiento de tona, arvio y número de muestra se lograron captar 9 casos, encontrando en su mayoría en niños menores de 5 años con cuadros de disenteria y una resistencia frecuente al cotrimoxazol.

A8

008

**Identificación de las variantes del gen *ERG11* y su asociación a la resistencia a los azoles de aislados clínicos de *Candida* spp. de una población del Estado de Durango.**

ARREDONDO-SÁNCHEZ ROSA ISELA<sup>1,2</sup>, TINOCO-FAVILA JUAN CARLOS<sup>1</sup>, VILLATANACA LOURDES<sup>1</sup>, MARTÍNEZ-AGUILAR GERARDO<sup>1</sup>, SALCIDO-GUTIÉRREZ LORENA<sup>1</sup>, LÓPEZ-RODRÍGUEZ ANGÉLICA<sup>1</sup>, SAUCEDO-MENDIOLA LETICIA<sup>1</sup>, RAMÍREZ-VALLÉS EDA G<sup>1</sup>, RUIZ-BACA ESTELA<sup>1</sup>. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Durango, México; Hospital General 450, Secretaría de Salud Durango (SSD), Durango, México; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México, D.F.; Hospital General zona No. 1 de Durango, Instituto Mexicana del Seguro Social (IMSS), Durango, México.

**Objetivo:** Identificar variantes del gen *ERG11* en *Candida* spp. aisladas de infecciones nosocomiales (IN) y su asociación a la resistencia a los azoles en una población del Estado de Durango.

**Material y métodos:** es un estudio observacional, ambispectivo, transversal, descriptivo. Se incluyeron cepas aisladas de líquidos corporales de pacientes que presentaron candidemias del Hospital Materno Infantil de Durango de Enero del 2012 a Agosto del 2016. Los aislados clínicos de *Candida* spp. fueron identificados a nivel de género y especie mediante el equipo BD Phoenix™ y CHROMagar. *Candida*. Para la determinación de la susceptibilidad antifúngica se siguió el protocolo de acuerdo a las recomendaciones del CLSI en su documento M27-S4, probando un total de 3 antifúngicos (fluconazol, itraconazol y voriconazol). Las cepas aisladas de *Candida* spp. resistentes se confirmo su identificación a nivel molecular (amplificación y secuenciación de la región ITS). Confirmada la especie de las cepas resistente, se identificó las variantes del gen *ERG11* mediante PCR y secuenciación.

**Resultados:** se lograron captar un total de 56 aislados clínicos de *Candida* spp. de los cuales 5 fueron resistentes a los azoles analizados: 2 *C. glabrata*, 2 *C. krusei* y 1 *C. parapsilosis*. Una cepa resultó resistente a los 3 antifúngicos (*C. parapsilosis*), dos cepas fueron resistentes al itraconazol (*C. glabrata*) y dos cepas fueron resistentes al fluconazol (*C. krusei*). En el análisis de la secuencia del gen *ERG11* de cada una de las cepas resistentes aisladas se encontraron mutaciones puntuales, las cuales pueden estar asociadas a la resistencia a los azoles.

**Conclusiones:** se observó una prevalencia de la resistencia a los azoles del 9% en especies de *Candida* no-*albicans*. Las mutaciones puntuales encontradas en el gen *ERG11* en las especies resistentes de *Candida* no-*albicans* analizados pueden estar asociadas a la resistencia antifúngica.



REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA DE DURANGO  
VOLUMEN I, COMPLEMENTO NO. 1, JULIO - DICIEMBRE 2017  
ORGANO OFICIAL DE LA SECRETARÍA DE SALUD DE DURANGO

# Memorias de la **I Jornada Nacional de Investigación en Salud** Durango 2017

## Contenido

Editorial, pág. 3  
Investigación básica, pág. 6  
Investigación Clínica, pág. 25  
Investigación en Biotecnología e Innovación, pág. 83  
Investigación en Ciencias Sociales y Humanidades, pág. 96  
Investigación en salud pública, pág. 120  
Casos clínicos, pág. 177



<http://salud.durango.gob.mx/es/saludconciencia>

## JN-CAR-IC-32. SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA A LOS AZOLES EN AISLADOS CLÍNICOS DE CANDIDA SPP. DE UNA POBLACIÓN DEL ESTADO DE DURANGO

Arredondo-Sánchez Rosa Isela<sup>1</sup>, Tinoco-Favila Juan Carlos<sup>2</sup>, Villa-Tanaca Lourdes<sup>3</sup>, Martínez-Aguilar Gerardo<sup>4</sup>, Salcido-Gutiérrez Lorena<sup>2</sup>, López-Rodríguez Angélica<sup>1</sup>, Saucedo-Mendiola Leticia<sup>2</sup>, Ramírez-Valles Eda<sup>4</sup>, Ruiz-Baca Estela<sup>4</sup>.

1. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Durango.

2. Hospital General 450, Secretaría de Salud Durango (SSD), Durango.

3. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

4. Hospital General zona No. 1 de Durango, Instituto Mexicana del Seguro Social (IMSS).

### INTRODUCCIÓN.

La candidiasis invasiva (CI) se considera la principal causa de morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados con compromiso inmune. Actualmente para el tratamiento de CI los azoles es la familia de antifúngicos más ampliamente usados. Con el incremento paulatino de la población en riesgo de contraer CI y el mayor uso de antifúngicos, se ha observado un aumento en la resistencia de las cepas de *Candida* spp., lo cual podría asociarse a falla terapéutica.

### OBJETIVO.

Determinar la prevalencia de resistencia a los azoles en aislados clínicos de *Candida* spp de una población del Estado de Durango.

### MATERIAL Y MÉTODO.

Es un estudio ambispectivo, transversal, descriptivo. Se incluyeron cepas aisladas de líquidos estériles de pacientes que presentaron candidemias del Hospital Materno Infantil de Durango de Enero del 2012 a Agosto del 2016. Los aislados clínicos fueron identificados a nivel de género y especie mediante

el equipo BD Phoenix<sup>TM</sup> y CHROMagar, *Candida*. Para la determinación de la susceptibilidad antifúngica se siguió el protocolo de acuerdo a las recomendaciones del CLSI en su documento M27-S4, probando un total de 3 antifúngicos (fluconazol, itraconazol y voriconazol).

### RESULTADOS.

Se capturaron un total de 56 aislados clínicos de *Candida*: 17 *C. albicans*, 13 *C. tropicalis*, 10 *C. lusitanae*, 5 *C. glabrata*, 5 *C. parapsilosis*, 2 *C. famata*, 2 *C. spp.*, 1 *C. krusei* y 1 *C. lipolytica*. En los análisis de susceptibilidad antifúngica se observaron 5 aislados resistentes a los azoles: uno a los 3 antifúngicos, dos al itraconazol y dos al fluconazol.

### CONCLUSIONES.

Se observó una prevalencia del 9% de resistencia a los azoles analizados. La especie de *Candida* que se aisló en mayor proporción fue *C. albicans* (30.3%).

### PALABRAS CLAVE.

*Candidiasis Invasiva, candida, azoles.*