

Variabilidad molecular de aislamientos de *Candida spp.* por la técnica de polimorfismos de ADN amplificadas aleatoriamente (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) en mujeres de Armenia, Colombia

Molecular variation of *Candida spp.* isolates using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), from women in Armenia, Colombia

Alba Cecilia Ruiz¹, Diana Milena Calderón¹, Jorge Enrique Gómez¹

Resumen

Objetivos. Caracterizar las especies de *Candida* que colonizan el conducto vaginal y su relación con sintomatología en las pacientes a quienes se les hace citología vaginal en Armenia (Quindío) y establecer el mejor cebador para la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD).

Materiales y métodos. Se recolectaron 226 muestras de flujo vaginal de mujeres que asistían a citología rutinaria preventiva y se les realizó cultivo en medio de Sabouraud, prueba de tubo germinal y batería de asimilación de carbohidratos. Se probaron tres cebadores para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

Resultados. Se encontró una prevalencia de cultivos positivos en Sabouraud de 31,8% (77 de 226 muestras) con un predominio de *Candi-*

da albicans, que representó el 71% de las especies cultivadas (55 de 77 cultivos). La frecuencia de síntomas de vaginitis fue mayor en mujeres con cultivo positivo para levadura (93%) que en las que tuvieron cultivo negativo (37%). El mejor método de extracción de ADN fue congelamiento y descongelamiento, y lisis con liticasa. La técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico fue aplicada a 47 aislamientos, y entre tres cebadores utilizados, el OPA9 fue el que permitió obtener mayores polimorfismos. Los análisis por dendrogramas mostraron 6 nodos predominantes, entre los cuales dos nodos incluyeron sólo aislamientos que producían síntomas (nodo IV y nodo V). En el nodo V se encontró que todos los aislamientos de *C. albicans* eran del mismo centro de salud.

Correspondencia: Jorge E. Gómez, Grupo GEPAMOL, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío
Telefax: (+57-67) 460 168
gepamol2@uniquindio.edu.co

Fecha de recepción: 18/03/2008

Fecha de aceptación: 23/2/2009

¹ Grupo de Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Conclusiones. En conclusión, *C. albicans* predomina y produce síntomas en mujeres de Armenia y el método de amplificación aleatoria de ADN polimórfico con el cebador OPA9, permitió obtener polimorfismos suficientes para conformar agrupamientos de las cepas de *Candida*.

Palabras clave: *Candida*, vaginitis, levaduras, RAPD, polimorfismos, epidemiología molecular

Abstract

Objectives: To characterize the *Candida* species in samples of routine vaginal cytology in Armenia (Colombia) and their relationship with symptoms. Also, to select the adequate primer for a random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) applied to the *Candida* species to determine the level of genetic relation.

Materials and methods: A total of 226 samples of vaginal secretions were obtained in patients that assist for routine preventive vaginal cytology. The samples were cultured in Sabouraud and then germ tube assay and carbohydrates assimilation test were performed. Three primers were assayed to determine the best for a reproducible RAPD technique.

Results: The prevalence of Sabouraud positive cultures was 31.8% (77 of 226 samples) and *Candida albicans* was the predominant species, representing 71% (55 de 77 samples). Vaginitis symptoms were more frequent in women with positive Sabouraud cultures (93%) vs. women with negative Sabouraud cultures (37%). The best extraction method for DNA extraction was freezing and thawing cycles followed by enzymatic lyses with lyticase. In 47 isolates of *Candida* species, the best primer that resulted in significant polymorphisms was the OPA 9. A 95% similarity coefficient was obtained 6 clusters. Clusters IV

and V only included *C. albicans* isolates producing symptoms. In cluster V all the isolates were from the same consultation center.

Conclusions: *C. albicans* was the predominant yeast in Armenia and was related with a greater frequency of symptoms. The RAPD technique with OPA9 primer in Armenia, unravel genetic relations of *C. albicans* isolates that could be used for epidemiological studies.

Key words: *Candida*, vaginitis, yeast, RAPD, polymorphisms, molecular epidemiology

Introducción

Las levaduras oportunistas pertenecientes del género *Candida* son los agentes causantes de la candidiasis vaginal que, por su frecuencia y difícil tratamiento, se ha convertido en un problema sanitario de importancia ⁽¹⁾.

Se ha encontrado que cerca de 75% de las mujeres pueden llegar a tener un episodio de infección vaginal durante su vida y, de ellas, la mitad presentan, al menos, dos o tres episodios infecciosos en un año. Se estima que 15% de las mujeres sin factores predisponentes conocidos podrían tener episodios repetitivos en los tres meses siguientes al tratamiento ⁽¹⁾. En 5% de los casos la enfermedad se vuelve crónica y se convierte en una candidiasis vulvovaginal recurrente, la cual se establece cuando se diagnostican cuatro episodios de candidiasis a lo largo de un año. *Candida albicans* es la especie predominante causante de vaginitis, con una prevalencia que oscila entre 70% y 90% según los reportes; y otras especies, tales como *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, se encuentran en 5% a 10%. *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* se consideran patógenos emergentes asociados a candidiasis recurrente ⁽²⁾.

En Colombia, aunque no hay muchos estudios, los reportes indican que *C. albicans* es la especie de mayor aparición en candidiasis vulvovaginal, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* ⁽³⁾. A nivel mundial se han visto diferencias para cada región o país; sin embargo *C. albicans* sigue siendo la especie más aislada, no sólo en vulvovaginitis candidiásica, sino también a nivel sistémico ⁽¹⁾. Dado que nuestro reservorio de medicamentos contra *Candida* es muy limitado, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento.

El conocimiento de la variabilidad genética de *Candida* es un requisito para poder esclarecer las variaciones de los patrones de resistencia a agentes antifúngicos, y la patogenicidad de cepas y especies del género. La patogénesis de la candidiasis vaginal involucra la interacción de factores como la especie de *Candida* implicada, la microevolución y la sustitución de cepas saprófitas por otras virulentas, lo cual puede observarse en *C. albicans* y otras cepas que no son *C. albicans* ⁽²⁾.

Hasta el momento, sólo existe un reporte previo de tipificación molecular para el género en Colombia, el cual se hizo sobre aislamientos de *C. guilliermondii* obtenidos en un brote ocurrido en una unidad neonatal, por el método de huella digital por PCR ⁽⁴⁾. La biología molecular puede aportar información epidemiológica sobre cadenas de transmisión y la diseminación de cepas virulentas o resistentes a medicamentos.

De los métodos disponibles para esto, el de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) presenta una gran validez, ya que los resultados obtenidos nos permiten realizar comparaciones entre especies y dentro de una especie. Esta técnica ayuda a determinar el

grado de clonalidad dentro de una especie y las tendencias filogenéticas entre especies de los aislamientos, lo cual nos lleva a entender la dinámica epidemiológica del género.

Los objetivos del presente estudio fueron determinar la prevalencia y caracterizar las especies de *Candida* que colonizan el conducto vaginal y su relación con sintomatología, en las pacientes a quienes se les hace citología vaginal en Armenia (Quindío), y establecer el mejor cebador para la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

Materiales y métodos

Población de estudio

Se obtuvo un tamaño de muestra de 226 pacientes, calculado en el programa Statcalc de EpiInfo, versión 6 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Estados Unidos) a partir de un universo de 600 pacientes, que es el número que por año consulta para citología preventiva, a los diferentes centros de salud de primer nivel de atención de Armenia. El cálculo se realizó a partir de una frecuencia esperada de 40%, un resultado peor esperado de 35% y un intervalo de confianza de 95%.

El criterio de ingreso al estudio fue: mujeres con edades entre 15 y 55 años, que asistieron a los procedimientos de citología de diferentes centros médicos de Armenia, con síntomas (prurito, dolor y dispareunia) de candidiasis vaginal o sin ellos. Se tuvieron en cuenta criterios de exclusión tales como diagnóstico de VIH, cáncer, embarazo o que se encontraran en terapia con corticoides.

Los datos de las pacientes se consignaron en formularios de encuestas en las que se preguntaba por los signos (características del flujo vaginal) y síntomas, así como sobre epi-

sodios anteriores y medicamentos para tratarlos. Esto último se hizo con el fin de reconocer casos de candidiasis vulvovaginal recurrente. Con los datos obtenidos se creó una base de datos en Excel con la información completa de las encuestas, así como los resultados de las pruebas de laboratorio.

Análisis de las muestras de flujo vaginal

Se usaron las técnicas microbiológicas descritas previamente por otros autores en estudios similares ⁽⁵⁻⁷⁾. Las muestras fueron tomadas por el personal del centro de salud con escobillón estéril, el cual se depositó dentro de un tubo de ensayo con solución salina estéril. Al recibirse la muestra en el laboratorio y en presencia de mecheros, se tomaron los escobillones y se frotaron suavemente sobre placas de Petri con agar Sabouraud y cloramfenicol (0,5 g/L). Se hizo frotis para la observación directa y coloración de Gram para buscar cocobacilos y células guía. Si se observaban cocobacilos, se hacía test de amina.

Cada una de las cajas de Petri se incubó a 37°C por 8 días, o menos si había aparición temprana de colonias sugestivas de *Candida* spp. Posteriormente, para la identificación de los aislamientos, las colonias se sometieron a examen directo al microscopio. Si la morfología observada correspondía a blastoconidias, éstas eran repicadas en medio agar Sabouraud y cloramfenicol por aislamiento en estría múltiple.

Se hizo prueba de tubo germinal a todos los cultivos en los que hubo crecimiento de colonias; para ello, las colonias aisladas de cada una de las muestras se emulsionaron en 0,5 ml de suero humano y se incubaron por 2 horas en baño de maría a 37°C para, luego, observarlas en el microscopio con aumento de 100X.

La identificación bioquímica se hizo con los estuches comerciales *RapID Yeast Plus System*

(Remel, USA) y *API 20 C AUX* (BioMérieux, Francia), y se siguieron las indicaciones del fabricante. Para el caso de los aislamientos que el programa de identificación del estuche API 20C AUX determinó como correspondientes a *Cryptococcus laurentii*, con 44% de confiabilidad, se realizó la prueba de la ureasa; para hacerlo, las levaduras se sembraron en un medio de cultivo rico en urea y se incubaron durante 48 horas con observaciones periódicas, hasta visualizar viraje en la tonalidad del medio. Las tonalidades rosa o fucsia en los medios inoculados se consideran como pruebas positivas para la ureasa. Una vez identificadas las muestras, se tomó de cada una un inóculo de 4 colonias y se almacenaron en crioviales de 2 ml que contenían una solución de glicerol al 10% (glicerol al 87%, Merck, USA) en congelador a -70 °C (Revco, USA).

Cepas de referencia

Para el análisis filogenético entre las cepas obtenidas de pacientes, se utilizaron, además, las siguientes cepas de referencia de *Candida*, donadas gentilmente por la doctora Toubas del Laboratorio de Parasitología y Micología del Centro Hospitalario Universitario de Reims (Francia): *C. albicans* IP121580 – ATCC28516, *C. albicans* IP1332 – ATCC26275, *C. albicans* IP118079 – ATCC2091, *C. parapsilosis* M 0500396, *C. parapsilosis* M 0500506, *C. krusei* ATCC6258, *C. glabrata* IP2114993 – ATCC66032, *C. tropicalis* M 0500362, *C. tropicalis* M 0500390 y *C. dubliniensis* M 0500378.

Extracción y purificación del ADN de los aislados de *Candida* spp.

Se probaron tres diferentes protocolos de rompimiento de la pared para luego proceder a la extracción de ADN.

Protocolo A: rompimiento mecánico por agitación con perlas de vidrio; para esto, las levaduras se resuspendieron en 400 µl de solución tampón lisis (0,2 M NaCl; 0,4% SDS; 0,1 M tris hidroximetil-amino-metano clorhidrato pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8). Luego, se adicionaron 400 µl de fenol, pH 8,0, más perlas de vidrio de 0,5 mm, y se mezcló con una agitadora vorticial por 30 minutos. Este procedimiento se hizo por dos veces y luego se precipitó con etanol 2,5 vol.

Protocolo B: lisis de levaduras con 500 µl de solución tampón Tris- EDTA (TE) 1X y 0,5 µl de Triton 1X; se calentó en baño de maría por 20 minutos, se congeló a -20°C por 12 horas y se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C; luego se sometió a extracción con etanol.

Protocolo C: rompimiento químico de la pared celular con la enzima liticasa (Sigma, USA, ref L2524) con EDTA pH 8,0. Para esta última, la liticasa a una concentración inicial de 2.000 unidades/mg de proteína fue diluida y se utilizaron 40 U por cada muestra de ADN.

Luego de estos procesos, las muestras se procesaron con el estuche comercial *Wizard Genomics* (Promega, USA). En resumen, según lo indicado por los fabricantes, las levaduras se resuspendieron en 300 µl de agua destilada y enseguida se centrifugaron a 5.000g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de sobrenadante y se resuspendió en 293 µl de EDTA 50 mM con 7,5 µl de liticasa, y se incubó a 37°C por una hora. Después se centrifugó a 13.000g por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se adicionaron 300 µl de solución tampón para la lisis nuclear al botón obtenido y se pipeteó varias veces. Se adicionaron 100 µl de solución tampón de precipitación de proteínas y se mezcló con una agitadora vorticial durante 20 segundos y se dejó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó

a 13.000g por 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. Se adicionaron 300 µl de isopropanol y se invirtió varias veces; luego, se centrifugó a 14.000g por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar sobre papel absorbente. Después se lavó con 300 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 2 minutos a 12.000g. Se descartó el sobrenadante y el botón fue rehidratado con 70 µl de solución tampón de rehidratación de ADN y se almacenó a 2-8°C durante 24 horas. La concentración de ADN se estimó frente a un patrón de concentración conocido en electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, y la calidad, en relación con presencia de proteínas, se estableció por espectrofotometría.

Técnica de polimorfismos amplificados aleatoriamente (RAPD)

Se probaron los cebadores B03 (CATCCCCCTG), B02 (5'-CCTTGACGCA-3') y OPA 09 (GGGTAACGCC) sintetizados por Invitrogen (Estados Unidos) y utilizados previamente por otros autores^(5,6). Se probaron variaciones en las condiciones, como la concentración del ADN, de los iniciadores y de los pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como la electroforesis más apta para la visualización de los patrones de bandeo. En el siguiente cuadro se muestran las condiciones de la mezcla de PCR que se probaron con el fin de estandarizar la técnica basada en un trabajo previo⁽⁷⁾.

Se trabajó una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos y 40 ciclos cada uno, con una desnaturalización a 94°C por un minuto y tres diferentes condiciones de hibridización: 30°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto o 40°C por 1 minuto, y tres diferentes tiempos de extensión: 30 segundos, 1 minuto o 2 minutos.

Componente (unidades)	Modificaciones					
Cl2Mg (mM) (Invitrogen)	1,5	2	2,5	3	3,5	4
ADN molde (ng)	50	100	150	200	250	300
Taq polimerasa (U) (Invitrogen)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Cebador (μM) (Invitrogen)	1	1,5	2	2,5	3	3
dNTP (μM) (Invitrogen)	50	100	150	200	250	300
Agua ultrapura (Invitrogen)	según el volumen					
Solución tampón de la PCR (Invitrogen)	según indicaciones de la Taq					

Análisis filogenético

Para el análisis de los resultados obtenidos por la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico, las bandas individuales se definieron como presentes o ausentes (1 o 0) para cada aislamiento, aplicando el programa *UN SCAN IT*, version 5.1 (Silk Scientific Inc., Utah, USA). Los perfiles de amplificación aleatoria de ADN polimórfico evidenciados en gel se consideraron diferentes cuando se detectó, al menos, una banda polimórfica de ADN. La relación entre las muestras de ADN se estimó utilizando el coeficiente definido por Jaccard, $PS=a/(a+b+c)$, donde a es el número de bandas de ADN compartidas entre las cepas 1 y 2, b es el número de bandas de ADN presentes en 1 pero no en 2 y c es el número de bandas de ADN presentes en 2 pero no en 1.

La relación filogenética se determinó usando la estrategia de agrupaciones mediante el paquete del programa *NTSYSpc 2.0*. Para ello se construyó una tabla de datos (*NTedit*) con codificación binaria, en la que se asignaba el valor 1 si el espaciador estaba presente y el valor 0 si estaba ausente. Con la herramienta *Similarity*, la cual utiliza una matriz de semejanza por comparación de cepas (coeficiente DICE), se elaboró la representación gráfica de los dendrogramas de homología con la raíz UPGMA (*unweighted pair group method*

using arithmetic averages). La matriz se elaboró a partir de los datos electroforéticos obtenidos con el cebador OPA 9 eligiendo arbitrariamente un coeficiente de semejanza genética de 1,0 para representar cepas idénticas, uno de 0,80 a 0,99 para cepas muy similares y los de valores inferiores a 0,90 para cepas no relacionadas ⁽⁸⁾.

Análisis estadístico entre variables clínicas y microbiológicas

Los datos clínicos y microbiológicos se organizaron en una hoja de trabajo de Excel para luego ser importados a *Epilnfo*, versión 6 (CDC, Atlanta, 2004). Se analizó la relación existente entre las variables, como especie de *Candida* y presencia de síntomas, mediante el estadístico *odds ratio* (OR) y el cálculo de los intervalos de confianza del 95%. Para el caso de las prevalencias, se calcularon los porcentajes observados de especies así como los casos de colonización comensal y de candidiasis vaginal. Se usó la prueba de ji al cuadrado (χ^2) para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes.

Aspectos éticos

Se utilizó una encuesta con un consentimiento informado, siguiendo lo estipulado por el Artículo 15 del Decreto 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, el cual la pa-

ciente debió leer y aceptar antes de la toma de la muestra. El estudio se considera de riesgo mínimo, ya que se utilizaron muestras de flujo vaginal normal tomadas por personal calificado dentro de los programas de prevención de cáncer de cuello uterino; por lo tanto, este estudio no implicó muestras adicionales a las requeridas para este procedimiento específico.

Resultados

Prevalencia de vaginitis por *Candida*

Se encontró una prevalencia de cultivos positivos en Sabouraud de 31,8% (77 cultivos positivos entre 226 pacientes) en las muestras de flujo vaginal estudiadas (figura 1) con predominio de *C. albicans*, que representó el 71% (55 de 77) de las especies cultivadas (tabla 1). La frecuencia de los síntomas de vaginitis fue mayor en mujeres con cultivo positivo para la levadura (93%) que en las que tuvieron cultivo negativo (37%). Esta diferencia fue esta-

dísticamente significativa (OR=23,9; IC95% 8,6-71; p=0,0000000). En total, 56% de las pacientes con síntomas de vaginitis tuvieron cultivos positivos en medio de Sabouraud. En 77 pacientes con cultivo positivo para *Candida*, además, se encontró *Gardnerella* spp. en 27 (35%) y *Mobiluncus* spp. en 4 (5%); ninguna presentó *Trichomonas* spp.

En las muestras de flujo vaginal estudiadas, se observó una amplia aparición de especies diferentes de *C. albicans*, entre las que se encontraron *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. famata* y *Cryptococcus laurentii* (tabla 1). Se analizó la asociación entre la aparición de síntomas con las especies aisladas y se encontró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de *C. albicans* y la de otras especies de *Candida* con algún signo o síntoma específico (tabla 2).

Tabla 1. Número de aislamientos y porcentajes de las especies aisladas entre 226 pacientes en la ciudad de Armenia durante el periodo de diciembre 2004 a abril de 2005

Especies	Número de aislamientos	Porcentajes
<i>C. albicans</i>	55 ^a	71,4
<i>C. guilliermondii</i>	6	7,7
<i>C. parapsilosis</i>	4	5,2
<i>C. glabrata</i>	3	3,9
<i>C. laurentii</i>	2	2,6
<i>C. tropicalis</i>	2	2,6
<i>C. famata</i>	3	3,9%
<i>Rhodotorula</i> spp.	1	1,3%
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	1,3
Total	77	

a En dos pacientes no se incluyó el dato de síntomas; por eso no se incluyen en el análisis de la figura 1.

Para aceptar los resultados obtenidos, según el programa del estuche comercial API 20C AUX para la discriminación de especies, se tuvo en cuenta que los coeficientes de confiabilidad arrojados por el programa APIWEB fueran superiores a 85%. En el caso de los aislamientos de *C. laurentii*, el programa arrojó como resultado de la prueba varias especies, entre las cuales ésta fue la que obtuvo el más alto coeficiente de confiabilidad (50%). Los aislamientos que habían sido previamente identificados por el APIWEB como *C. laurentii*, resultaron positivos para ureasa, lo cual confirmó que sí pertenecían al género *Cryptococcus*. De acuerdo con los resultados obtenidos por identificación bioquímica usando el estuche comercial API AUX 20D se aisló, durante el presente estudio, un caso de *Trichosporon mucoides* con 92,8% de correspondencia.

Estandarización de la técnica de extracción de ADN del género *Candida* spp. y la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

De las tres técnicas de ADN ensayadas, sólo el ensayo con liticasa permitió obtener cantidades adecuadas para el análisis con amplificación aleatoria de ADN polimórfico. Luego de varios ensayos se establecieron las concen-

traciones óptimas de la reacción que permitían observar el número de bandas con mayor intensidad, así: Cl_2Mg 3,5 mM; cebador 1,5 μM ; dNTPs 0,3 mM cada uno. En el control negativo se incluyeron todos los componentes de la reacción de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico excepto el ADN molde y no se observó ninguna banda de amplificación, lo cual indica que no hubo amplificaciones inespecíficas en el ensayo. Las concentraciones de ADN mayores de 150 ng disminuyeron el número de bandas observadas, por lo que se utilizaron 100 ng de ADN en todos los experimentos. Referente a la utilización de la Taq ADN polimerasa, se observó un incremento del número de bandas al usar concentraciones de enzima mayores de 1 U, con un punto óptimo al utilizar 1,5 U en la mezcla total.

En cuanto a las condiciones de amplificación, para la etapa de desnaturalización no se hicieron modificaciones. En cambio, se probaron tres temperaturas diferentes de hibridización buscando optimizar las condiciones de unión del cebador. Se encontró que las temperaturas por encima de 40°C no generaban productos en ninguna muestra y se necesitó un tiempo mínimo de 1 minuto para obtener un patrón completo. Finalmente, las mejores condiciones fueron: una desnaturalización ini-

Tabla 2. Relación entre prueba de tubo germinal positiva, y presencia de signos y síntomas de candidiasis vaginal. Significancia estadística: $p < 0,05$

Signos y síntomas	OR	IC 95%	p
Flujo amarillento	1,22	0,42 - 3,50	0,36
Flujo blanquecino	0,92	0,34 - 2,50	0,44
Flujo hemorrágico	Indefinido	Indefinido	0,35
Olor fétido del flujo	1,22	0,42 - 3,50	0,36
Prurito	1,61	0,59 - 4,38	0,17
Hinchazón vaginal	2,22	0,44 - 11,03	0,26
Dispareunia	1,12	0,31 - 4,00	0,56
Placas vaginales	1,23	0,30 - 5,08	0,53
Candidiasis vaginal recurrente	1,78	0,34 - 9,14	0,26

cial a 94°C por 4 minutos, seguida de un ciclo adicional de 94°C por un minuto y, luego, 40 ciclos de hibridización a 35°C por un minuto, una extensión a 72°C por dos minutos y una extensión adicional final a 72°C por cuatro minutos. La reproducibilidad se confirmó utilizando las condiciones optimizadas de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico con cada una de las muestras, repitiendo el ensayo hasta tres veces durante el mismo día y en días diferentes (figura 2). El número de bandas y su posición se conservaron iguales de un día a otro.

Análisis de perfiles genéticos de amplificación aleatoria de ADN polimórfico y dendrogramas

El análisis mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico con los cebadores B03 (CATCCCCCTG) y B02 (TGCTATCCAGGCTGTGCTA) no permitió obtener amplificación. En cambio, con el cebador OPA9 hubo amplificación y, entonces, se pudo realizar la prueba de amplificación aleatoria de ADN polimórfico con 47 cepas de las 77 aisladas (figuras 3 y 4).

Los agrupamientos por dendrograma (figura 5) muestran que los aislamientos sintomáticos tienen un porcentaje mayor de aislamientos que tienden a agruparse o a ser más homogéneos (33%), mientras que en los aislamientos de pacientes no sintomáticos es menor el número de aislamientos que se agrupan (16%). Sin embargo, la diferencia entre estos porcentajes no alcanzó a ser estadísticamente significativa, posiblemente debido al tamaño de la muestra (test de Fisher de una cola, $p=0,57$). En el análisis del género *Candida*, se encontró que hubo perfiles de amplificación aleatoria de ADN polimórfico similares entre aislamientos de especies diferentes, como *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, es decir, la técnica no logró un nivel de resolución para la diferenciación absolu-

ta entre aislamientos de especies diferentes.

En el análisis de todos los aislamientos del género *Candida* se visualizaron aislamientos con perfiles idénticos a otro y que formaron un agrupamiento con valores de coeficiente de similitud genética superiores a 0,99. También, se encontraron 15 aislamientos con genotipo diferente pero relacionados y con valores del coeficiente de similitud genética cercanos a 0,95 y, de estos, dos correspondieron a las cepas de referencia *C. tropicalis* y *C. glabrata* que exhibieron un coeficiente de similitud genética menor de 0,90 (figura 5).

Al realizar el análisis del dendrograma (figura 5) teniendo como punto de corte una semejanza de 95%, se formaron 6 nodos predominantes. Hubo 9 aislamientos de *C. albicans* (32,1%) cuyos grupos incluyeron sólo aislamientos que producían síntomas (nodo IV y nodo V). En el nodo V se encontró, además, que todos los aislamientos de *C. albicans* eran del mismo centro de salud. Además, se visualizaron 3 aislamientos en el nodo VI, todos asintomáticos.

Discusión

Se encontró una gran frecuencia de síntomas de vaginitis en pacientes con cultivo positivo para *Candida* (56,6%), lo que concuerda con los reportados por Consolaro *et al.* en Brasil⁽⁹⁾. Sin embargo, la frecuencia de cultivos positivos de levadura en ellas fue de 56%, mucho mayor en nuestra población que en la de Brasil, donde en 161 mujeres, sólo 21,7% de aquéllas con vaginitis presentaron cultivos positivos para levaduras. Se observó que tanto *C. albicans* como otras especies de *Candida* se encuentran en pacientes con síntomas de vaginitis en la Armenia. Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado durante los últimos años, sobre un aumento considerable de las infecciones causadas por otras especies

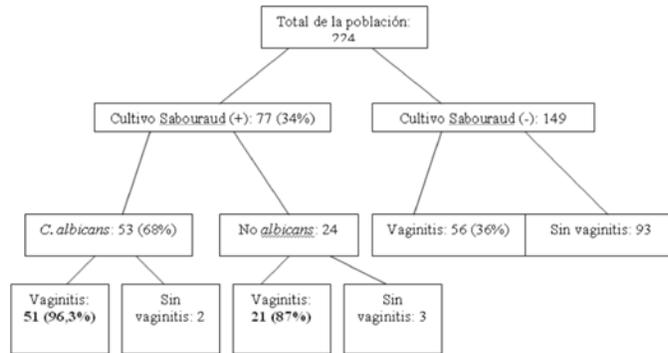


Figura 1. Relación entre síntomas y cultivo positivo para *Candida*. Resultados de los cultivos para levaduras (cultivo Sabouraud positivo) y asociación con síntomas de vaginitis en 224 pacientes con el dato de síntomas en la ciudad de Armenia

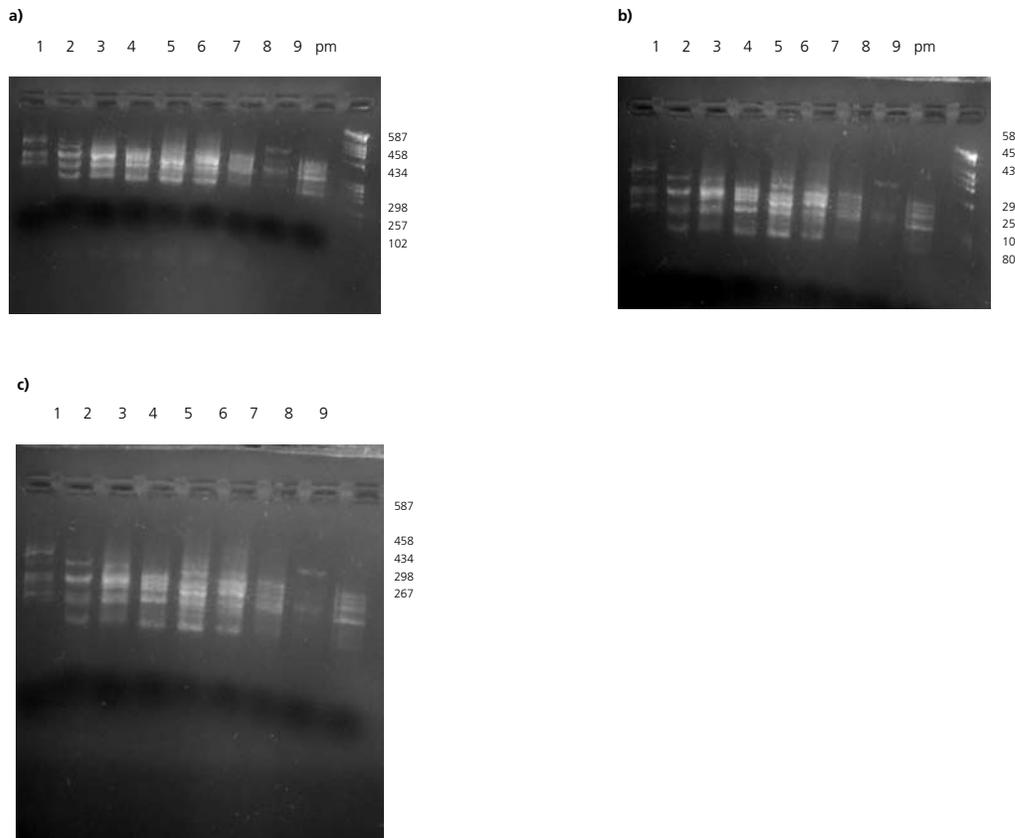


Figura 2. Reproducibilidad de condiciones de RAPD. Se analizó el mismo aislamiento clínico en días diferentes y usando la misma metodología. Resultado en día 1: a); día 2: b); día 3: c). Se usó el cebador OPA 09. Identificación de las líneas, 1: *C. albicans*; 2: *C. albicans*; 3: *C. dubliniensis*; 4: *C. albicans*; 5: *C. krusei*; 6: *C. albicans*; 8: *C. glabrata*; 9: *C. guilliermondii*, 10) pm: marcador de peso molecular. Los productos de la PCR fueron revelados por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% en solución tampón TBE.

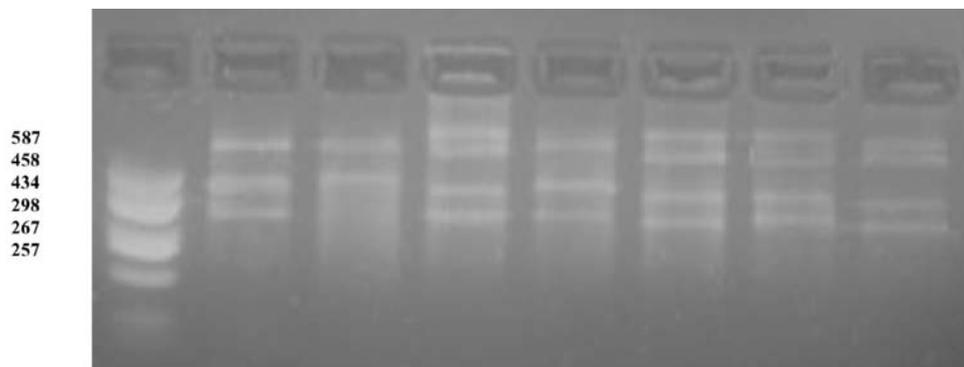


Figura 3. Perfiles de RAPD usando el cebador OPA 09 en siete cepas de referencia de *Candida* usadas en el estudio, donadas por la doctora Dominique Toubas del Laboratorio de Parasitología y Micología de Reims (Francia). MP: marcador de peso molecular; 1: *C. albicans* IP121580; 2: *C. albicans* IP 118079; 3: *C. albicans* IP 214992; 4: *C. dubliniensis* M500578; 5: *C. krusei* ATCC 6258; 6: *C. parapsilosis* M500506; 8: *C. glabrata* IP 214992; 9: *C. guilliermondii* 3948. Los productos de la PCR fueron revelados por electroforesis de agarosa al 2,5% en TBE.

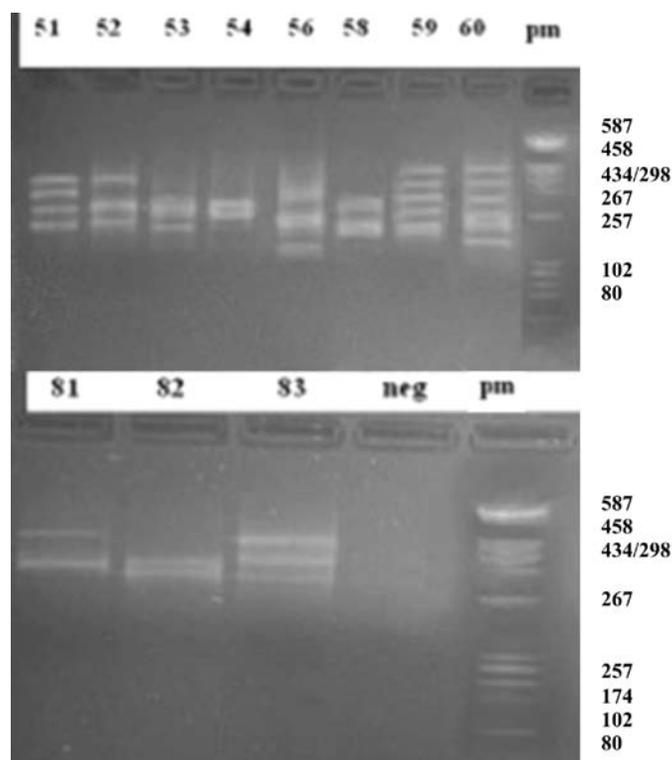


Figura 4. Perfiles de RAPD de siete aislados de pacientes con infección vaginal por cepas del género *Candida* usando el cebador OPA 09. 51: *C. glabrata*; 52: *C. guilliermondii*; 54: *C. albicans*; 56: *C. albicans*; 58: *C. albicans*; 59: *C. albicans*; 60: *C. albicans*. MP: marcador de peso molecular. Los productos de la PCR fueron revelados por electroforesis de agarosa al 2,5% en TBE.

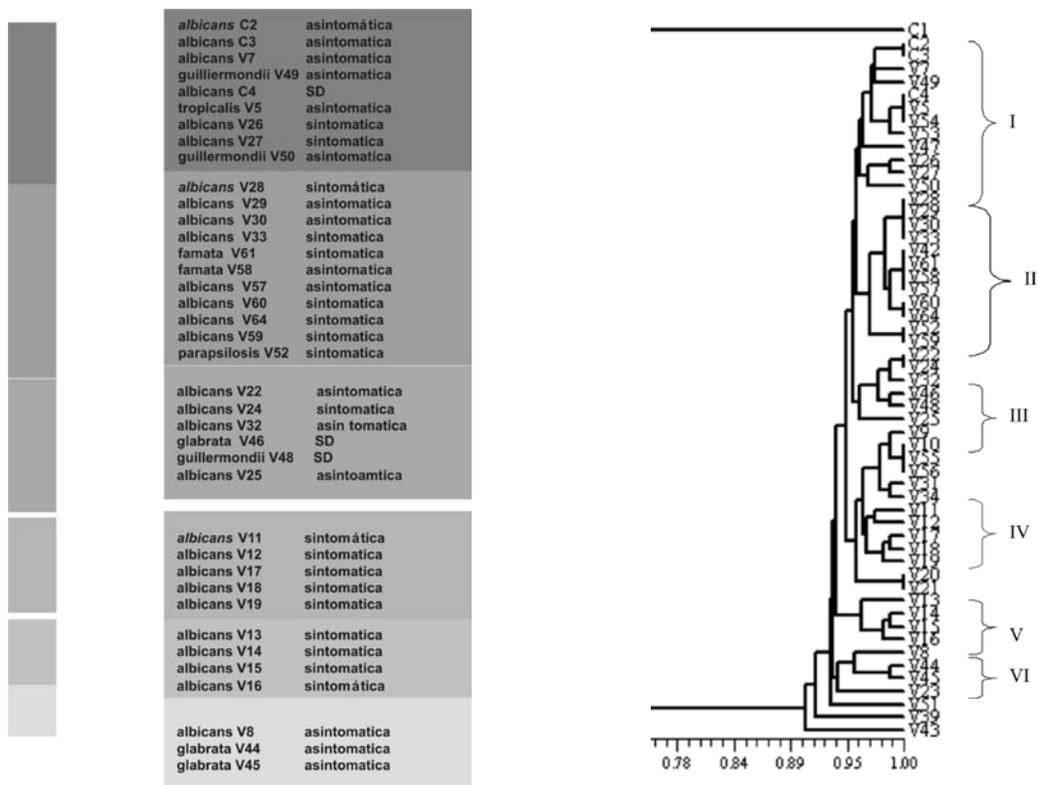


Figura 5. Dendrograma representativo de los agrupamientos de los aislamientos del género *Candida* de pacientes con vaginitis y sin ella. Los valores de la escala indican la distancia genética en porcentaje.

de *Candida* ^(1,9). En el presente estudio sólo 6,5% de las pacientes con cultivo positivo para levaduras eran asintomáticas. Según la literatura, los aislamientos de comensales se presentan con frecuencias superiores a 30% ^(1,2). Esto lleva a preguntarse si existe una mayor frecuencia de cepas virulentas circulando en la población estudiada.

Con respecto a los resultados obtenidos por Cardona *et al.* ⁽³⁾ y los obtenidos en el presente estudio, *C. albicans* continúa siendo la especie más frecuente, y los resultados divergen sólo cuando se observa *C. parapsilosis* y *C. krusei* en segundo y tercer lugar. En este trabajo se observó a las especies *C. guilliermondii* y *C. glabrata* en las mismas ubicaciones; se sabe que las especies del género presentan patrones de distribución diversos según el área

geográfica ^(1,2). Además de aislarse levaduras del género *Candida* spp., también se obtuvo un aislamiento del género *Rhodotorula* spp. en una paciente que refería síntomas de vaginitis. A pesar de esto, dicho aislamiento no puede considerarse como el agente causal de la enfermedad vaginal, pues este género no se ha reportado previamente como agente causal de vaginitis, y autores como Llovera *et al.* ⁽¹⁰⁾ la han descrito como aislamiento comensal de la mucosa vaginal.

La especie *C. laurentii* también se aisló en el presente estudio en dos ocasiones, en las que las pacientes referían sintomatología característica de infección vaginal. Sin embargo, se ha descrito como huésped ocasional; esto permite considerarlo en este aislamiento como un colonizador transitorio del conducto vaginal ⁽²⁾.

Otro hallazgo fue la presencia de *T. behrendi*, una levadura anamórfica con características específicas que van de micelios verdaderos a formas desarticuladas del tipo artroconidia. Habitualmente se le encuentra en infecciones profundas o asociada a infecciones de mucosas que colonizan el ano y la región perianal de hombres homosexuales⁽¹¹⁻¹³⁾. Según Makela *et al.*⁽¹¹⁾, *Trichosporon sp.* se puede encontrar de manera poco frecuente, en secreción vaginal, como no patógeno y en mujeres de origen afroamericano que presentan alteraciones en la flora vaginal con un incremento del pH.

En este trabajo, la amplificación aleatoria de ADN polimórfico fue el método de elección para correlacionar genéticamente los aislados de *Candida ssp.* obtenidos del flujo de mujeres con síntomas de vaginitis y sin ellos, dado que este método ofrece ventajas sobre otros métodos convencionales, a saber: sólo se necesitan pequeñas cantidades de ADN, se pueden obtener significativas diferencias genotípicas que permiten distinguir entre aislamientos de variadas fuentes, y es rápido comparado con otras técnicas de análisis de polimorfismos genéticos^(6-8,14,15). Los problemas de reproducibilidad de la técnica, básicamente dados por las bajas temperaturas de hibridación de los cebadores, no fueron limitantes, lo cual se evidenció en los resultados obtenidos del análisis por duplicado y triplicado, teniendo en cuenta un cuidadoso manejo del ADN y un seguimiento estricto del protocolo de amplificación y de la interpretación de resultados.

Sólo uno de los tres cebadores evaluados (OPA 9) permitió obtener perfiles de amplificación aleatoria de ADN polimórfico discriminatorios entre los aislados evaluados. Esto es intrínseco al principio del cebador seleccionado aleatoriamente y demuestra que un cebador utilizado en una población dada puede ser útil, pero en

otra población puede no tener el mismo resultado. Por ello, es necesario evaluar los cebadores de acuerdo con la población analizada. En ocasiones, es necesario evaluar una gran cantidad de cebadores antes de obtener uno que logre un poder discriminatorio adecuado para los fines de un estudio en particular⁽⁵⁻⁷⁾.

En contraste con los resultados obtenidos por Sansinoriano *et al.*⁽⁷⁾ para la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico, se requirió menos enzima Taq cuando se utilizó un paso adicional de desnaturalización, lo cual lo hizo menos costoso para nosotros. En este ensayo, cuando se incrementó la concentración del cebador, se disminuyó la intensidad de la banda de mayor tamaño y disminuyó la intensidad de las pequeñas. Estas diferencias pueden explicarse porque, al existir mayor cantidad del cebador en la mezcla, se aumenta la unión en sitios diferentes en el ADN. Cuando se utilizaron pequeñas cantidades de cebadores, no hubo amplificación en algunas de las muestras. En cuanto a la cantidad y calidad del ADN, en la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico se requieren pequeñas cantidades; sin embargo, es necesario conservar un buen grado de pureza para una buena reproducibilidad. En este trabajo se utilizó el método de extracción usando el estuche comercial *Wizard Genomics*, del cual se obtuvieron patrones electroforéticos de ADN libres de contaminación y en concentraciones aceptables.

La gran semejanza genética de los aislamientos en los dos agrupamientos sintomáticos, nos permite evidenciar un predominio clonal de las cepas circulantes en esta muestra de población y es un apoyo a la teoría de diseminación clonal de cepas virulentas de *Candida*⁽¹⁶⁾. Los estudios de epidemiología molecular han demostrado que diferentes personas pueden albergar especies de *Candida* con genotipos similares. Es

llamativo el nodo que agrupó aislamientos del mismo centro, especie y sintomatología, lo cual apoya lo reportado previamente que indica que un proceso de selección natural que podría favorecer la colonización por un genotipo específico con diseminación de tipo clonal ^(16,17).

En los dendrogramas se evidencia la formación de grupos que incluyen aislamientos con diferentes categorías clínicas (sintomáticas/asintomáticas). En lo que se refiere a las 12 cepas de *Candida* diferentes a *C. albicans*, todas fueron genóticamente diferentes unas de otras. Los resultados anteriores difieren de lo observado por Schmid *et al.* ⁽⁸⁾ en aislamientos de *C. albicans* a partir de flujo vaginal usando sonda Ca3, quienes encontraron que la mayoría de las otras cepas de *Candida* formaban un agrupamiento diferente al de *C. albicans*.

En este estudio se incluyó un número de aislamientos mayor a lo reportado en otros trabajos en nuestro país para el caso de la candidiasis vulvovaginal. Además, es valioso el hecho de que todos los aislamientos pertenecían a una misma área geográfica, lo cual resulta importante para el conocimiento epidemiológico regional. Los resultados de este trabajo son similares a los reportes obtenidos de la literatura, según los cuales mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico es posible obtener perfiles polimórficos que permiten realizar agrupamientos de cepas relacionadas ⁽¹⁸⁾. Se encontró un grupo formado por aislamientos del mismo centro de salud y que producían síntomas. Es necesario realizar estudios más amplios que incluyan un mayor número de aislamientos no sintomáticos, para examinar más de cerca las posibles relaciones entre estas cepas y la categoría clínica.

En conclusión, el presente estudio se constituye en el primer ensayo en una ciudad colombiana para ver la distribución y el grado de agrupa-

miento de cepas del género *Candida*, en pacientes con síntomas de infección vaginal y sin ellos. La estandarización de la técnica de extracción de ADN del género *Candida* spp. y la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), permitieron distinguir los diferentes fenotipos presentes en los aislamientos estudiados y encontrar agrupamientos de la población según sintomatología y homogeneidad con este cebador para aislamientos de un mismo centro de salud, lo cual apoya la hipótesis de una estructura clonal de la población para cepas de *Candida* que producen síntomas de vaginitis. Finalmente, es de interés estudiar las cepas con perfiles idénticos de amplificación aleatoria de ADN polimórfico y que producen sintomatología con otros marcadores genéticos.

Referencias

1. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet.* 2000;71:521-7.
2. Holland J, Young ML, Lee O, Chen CA. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. *Sex Transm Inf.* 2003;79:249-50.
3. Cardona-Castro N, Revankar GS, Ortiz P, Cuervo C, Kirkpatrick RW, McAtee KR, *et al.* Detección de proteinasa, tipificación del ADN y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de *Candida* de mujeres colombianas con candidiasis vulvovaginal. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:89-94.
4. Escandón P, Linares M, Castañeda E. Infección por *Candida guilliermondii* en neonatos en una clínica de tercer nivel en Bogotá. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2007;12:97-112.
5. Sandt C, Sockalingum G, Aubert D, Lèpan H, Lepouse C, Jaussaud M, *et al.* Use of Fourier-transformed infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol.* 2003;41:954-9.
6. Pinto MP, Resende AM, Koga-Ito YC, Tendler M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using random amplified polymorphic DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:147-52.
7. Sansiforiano ME, Rabasco A, Trancon-Martínez M, Parejo CJ, Mendoza D, Padilla AJ. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:65-9.
8. Schmid J, Herd S, Hunter P, Cannon R, Salleh Y, Samad S,

et al. Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patient and types of infection. *Microbiol.* 1999;145:2405-13.

9. Consolaro-López EM, Thâmara A, Albertoni C, Yoshida S, Mazucheli J, Peralta MR, *et al.* Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 2004;21:202-5.

10. Llovera-Suárez V, Perurena-Lancha MR. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. *Rev Cubana Med Trop.* 2004;56:21-5.

11. Makela PI, Leaman D, Sobel J. Vulvovaginal trichosporonosis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2003;11:131-3.

12. Ahmad S, Al-Mahmeed M, Zia UK. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol.* 2005;54:639-46.

13. Takashi-Sugita J, Nishikawa A, Shinoda T. Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1458-60.

14. Gallego FJ, Pérez MA, Núñez Y, Hidalgo P. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 2005;22:561-8.

15. Steffan P, Vazquez AJ, Boikov D, Chun X, Sobel JD, Akins AR. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2031-9.

16. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001;9:596-1.

17. Heitman J. Sexual reproduction and the evolution: review of microbial pathogens. *Current Biol.* 2006;16:711-25.

18. Pei-Pei C, Yee Lean L, Boon Chong T, Peng K. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microb.* 2003;52:657-66.