



Universidad Autónoma de Coahuila
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

“Aplicación de la reacción en espiral de la polimerasa (PSR)
para la detección de especies del género *Candida* aisladas de
microbiota vaginal”

PRESENTA

QFB. Cindy Nataly del Río Arellano

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestría en Ingeniería Bioquímica

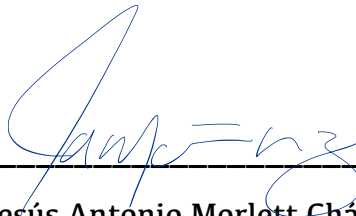
Torreón, Coahuila. Junio 2020.

**APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN ESPIRAL DE LA POLIMERASA
(PSR) PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*
AISLADAS DE MICROBIOTA VAGINAL**

Dirección de Tesis




Dra. Norma Margarita De la Fuente Salcido
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Coahuila
DIRECTOR



Dr. Jesús Antonio Morlett Chávez
Facultad de Ciencias Biológicas-Unidad Saltillo
Universidad Autónoma de Coahuila
CO-DIRECTOR

**APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN ESPIRAL DE LA
POLIMERASA (PSR) PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DEL
GÉNERO *Candida* AISLADAS DE MICROBIOTA VAGINAL**

Sinodales



**Dr. Nagamani Balagurusamy
PRESIDENTE**



**Dr. Mauricio Andrés Salinas Santander
SECRETARIO**



**Dr. Edgar Héctor Olivas Calderón
VOCAL**



**MC. José Cristóbal Castañeda Ramírez
VOCAL**

1- Resumen

Las infecciones por *Candida* son las micosis oportunistas más frecuentes a nivel mundial y *Candida albicans* el agente causal más común. En años recientes se ha reportado un incremento significativo en la frecuencia de cepas de *Candida* no *albicans* resistentes a los agentes antimicóticos. Lo anterior requiere la correcta identificación taxonómica de los miembros del complejo de *Candida* para comprender la epidemiología y la evolución de la resistencia antifúngica.

El objetivo de esta investigación fue implementar la técnica molecular de la reacción en espiral de la polimerasa (PSR) para identificar rápida, sensible y específicamente diversas especies del género *Candida* presentes en microbiota vaginal. Se comparó la especificidad y la sensibilidad de la técnica de PSR contra otros métodos microbiológicos (No automatizados –Chromoagar®- y automatizados –VITEK®-) o moleculares (PCR) utilizados tradicionalmente para la identificación rutinaria de levaduras.

Se logró estandarizar la extracción de DNA genómico de 51 cepas de *Candida* aislada de 51 pacientes. La metodología más eficiente fue la descrita por Sambrook y Russell (lisis celular por fenol-cloroformo), obteniéndose una concentración promedio de 2095.36 ng/μL de ADN. Mediante la técnica microbiológica automatizada (VITEK®) se identificaron 24 (47%) cepas como *Candida albicans*, 26(51%) como *Candida krusei* y 1(2%) como *Candida tropicalis*. Por técnica microbiológica con CHROMagar se identificaron 22 (43%) cepas como *Candida albicans*, 26 (51%) cepas como *Candida krusei*, 1 (2%) cepa como *Candida tropicalis* y 2 (4%) consideradas contaminaciones. La identificación molecular por PCR confirmó 24 (47%) cepas como *Candida albicans*, 26 (51%) como *Candida krusei* y 1 (2%) como *Candida tropicalis*. Al comparar las técnicas, CHROMagar *Candida* muestran una correlación del 98%, a diferencia del sistema VITEK-2 y la PCR muestran una similitud del 100%, por lo que se infiere que son específicos para la identificación de *Candida albicans*, *krusei* y *tropicalis*. La diferencia del 2% en la identificación por los dos primeros métodos puede atribuirse a la contaminación a la que están expuestos dichos métodos.

La estandarización de la PSR para el reconocimiento de intrón ITS2 del rADN de *Candida albicans* mostró resultados similares a los descritos en investigaciones reportadas anteriormente por Xiaoqun Jiang en el 2016 , logrando la eficaz identificación de *Candida albicans*, en 60 minutos a una temperatura constante de 65°C, sin la necesidad de utilizar un termociclador para la variación de gradientes de temperatura, pues con un indicador de pH se observaron los resultados positivos (amarillo) y negativos (rojo) de la reacción así como la confirmación de estos mediante un gel de electroforesis de los productos de reacción. Al analizar y comparar la técnica de PSR y PCR punto final podemos concluir que es posible aplicar la técnica de PSR para la identificación rápida y eficiente de *Candida albicans* presente en microbiota vaginal.

2- Abstract

Candida infections are the most frequent opportunistic mycoses worldwide and *Candida albicans* the most common causative agent. In recent years, a significant increase in the frequency of non-*albicans* strains of *Candida* resistant to antifungal agents has been reported. This requires the correct taxonomic identification of the members of the *Candida* complex to understand the epidemiology and evolution of antifungal resistance.

The objective of this research was to implement the molecular technique of the polymerase spiral reaction (PSR) to quickly, sensitively and specifically identify various species of the genus *Candida* present in the vaginal microbiota. The specificity and sensitivity of the PSR technique were compared against other microbiological (non-automated CHROMagar® and automated VITEK-2®) or molecular (PCR) methods traditionally used for routine yeast identification.

The extraction of genomic DNA from 51 strains of *Candida* isolated from 51 patients was standardized. The most efficient methodology was that described by Sambrook and Russell (phenol-chloroform cell lysis), obtaining an average concentration of 2095.36 ng / μ L of DNA. Using the automated microbiological technique (VITEK®), 24 (47%) strains were identified as *Candida albicans*, 26 (51%) as *Candida krusei* and 1 (2%) as *Candida tropicalis*. By microbiological technique with CHROMagar, 22 (43%) strains were identified as *Candida albicans*, 26 (51%) strains as *Candida krusei*, 1 (2%) strain as *Candida tropicalis* and 2 (4%) considered contaminations. Molecular identification by PCR confirmed 24 (47%) strains as *Candida albicans*, 26 (51%) as *Candida krusei* and 1 (2%) as *Candida tropicalis*. When comparing the techniques, CHROMagar *Candida* show a 98% correlation, unlike the VITEK-2 system and the PCR show a 100% similarity, so it is inferred that they are specific for the identification of *Candida albicans*, *krusei* and *tropicalis*. The difference of 2% in identification by the first two methods can be attributed to the contamination to which these methods are exposed.

The standardization of the PSR for the recognition of the ITS2 intron of *the Candida albicans* rDNA showed similar results to those described in research previously

reported by Xiaoqun Jiang in 2016, achieving the effective identification of *Candida albicans*, in 60 minutes at a constant temperature of 65 °C, without the need to use a thermocycler for the variation of temperature gradients, since with a pH indicator the positive (yellow) and negative (red) results of the reaction were observed, as well as the confirmation of these by means of a electrophoresis of reaction products. By analyzing and comparing the PSR and endpoint PCR technique, we can conclude that it is possible to apply the PSR technique for the rapid and efficient identification of *Candida albicans* present in the vaginal microbiota.