

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE ESPECIES DE *Candida* AISLADOS  
DE MUESTRAS DE SECRECIÓN VAGINAL**

**DAICY ARGENIS PLAZAS QUINTO  
SANDRA LIZETH ORDOÑEZ BONILLA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN**

**2005**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE ESPECIES DE *Candida* AISLADOS  
DE MUESTRAS DE SECRECIÓN VAGINAL**

**DAICY ARGENIS PLAZAS QUINTO  
SANDRA LIZETH ORDOÑEZ BONILLA**

**Trabajo de grado para optar el título de  
Bióloga**

**Director  
M.Sc. PATRICIA EUGENIA VÉLEZ**

**Asesores**

**M.Sc. FABIOLA EUGENIA GONZÁLEZ  
M.Sc. CRUZ MARINA TORRES  
M.Sc. WAYNER RIVERA  
Ph.D. PEDRO MORENO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN**

**2005**

Notas de aceptación

---

---

---

Director:

---

M.Sc. Patricia E. Vélez.

Jurado:

---

M.Sc. Luis Reinel Vásquez

Jurado:

---

M.Sc. Silvio Marino Carvajal

Fecha de sustentación: 8 de Noviembre de 2005

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Hilda Bonilla y Gentil Ordóñez, quiénes son la Bendición más bella que Dios me ha regalado, para ser los amores de mi vida.

A mis hermanos, por regalarme cinco sobrinos (hasta ahora) que son la luz que ilumina mi vida.

A mi madre, Maria Elcy Quinto mi angelito de la guarda y mi principal razón para cumplir todos y cada uno de mis sueños.

A mis hermanos, dos hermosos seres que Dios me ha regalado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Después de tantos, sacrificios y desavenencias, logramos cumplir con nuestra meta y lo menos que podemos hacer es darle un sentido “Gracias “...

A Dios, por poner en nuestro corazón, la sabiduría, la fuerza y la voluntad para aceptar que la adversidad hace parte de sus designios.

A nuestros padres, Maria Elcy Quinto, Hilda Bonilla y Gentil Ordóñez, quiénes con su apoyo incondicional han entregado lo mejor de sí, para mostrarnos todo su amor.

A nuestros hermanos, por hacer de la tolerancia y la paciencia las herramientas fundamentales para trabajar por una convivencia mejor.

A dos seres maravillosos, que en la culminación de ésta etapa, llegaron a nuestras vidas con una palabra de amor, para llenar nuestros corazones de felicidad.

A nuestra directora, Patricia Eugenia Vélez, por su apoyo incondicional y por aportar conocimientos útiles para nuestra vida personal y profesional.

A nuestros asesores:

Fabiola Eugenia González, quien con su apoyo incondicional y desinteresado, siempre nos tendió la mano, especialmente en momentos donde parecía no haber ninguna salida.

Wayner Rivera, Pedro Moreno y Cruz Marina Torres, por su valiosa colaboración y orientación en nuestro proceso de formación.

A Victoria Eljach, por su colaboración durante el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Maria Virginia Pinzón, por su colaboración en la toma de muestras.

A las auxiliares de Laboratorio, Clandia e Isabel, quienes con una sonrisa, paciencia y dedicación, hicieron más agradable nuestras jornadas de trabajo en el Laboratorio.

Y en general a todos aquellos que colaboraron académicamente en nuestro proceso formativo y porque no, agradecerle también a quienes no lo hicieron,

porque tal vez de haberlo hecho, hubiesen limitado nuestra adquisición de conocimientos.

A Daicy mi “amiguís” quien supo conocerme y aceptarme para caminar a su lado en ésta etapa tan importante de su vida.

A Sandra mi amiguita, por darme la oportunidad de compartir tantos momentos, por la transparencia de su corazón y por que por ella, puede conocer una grandiosa amistad.

A nuestros Jurados, por las observaciones hechas al trabajo, las cuales fueron de gran utilidad.

A los grupos de investigación BIOINESMI y BIMAC por toda su colaboración.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	14
INTRODUCCION	15
<b>1. MARCO TEORICO</b>	18
1.1 CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE <i>Candida</i>	18
1.1.1 Taxonomía	19
1.2 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE <i>Candida</i>	20
1.2.1 Aislamiento microbiológico	20
1.2.2 Identificación bioquímica	21
1.3. PATOGENICIDAD	23
1.3.1 Candidiasis vaginal	23
1.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	25
1.5 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA RÁPIDA DE FOURIER (FTIR)	27
1.6 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS ESPECTROS	30
1.7 REGIÓN DE FRECUENCIA DE GRUPOS	31
1.8 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN MICROBIOLOGÍA	33
1.9 DENDROGRAMA	33
1.9.1 Índices de afinidad	34
1.9.2 Clasificación	36
1.10 COMPONENTES PRINCIPALES	37
1.10.1 Representación en un hiperespacio	37
1.11 FRACTALES	39
1.11.1 Fractal	39
1.11.2 La Ley De Zipf	40
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	44
2.1 REACTIVOS	44

2.2	MATERIAL Y EQUIPOS	44
2.3	NORMAS DE BIOSEGURIDAD	45
2.4	OBTENCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Candida</i>	45
2.4.1	Tamaño de la muestra	45
2.4.2	Descripción de manejo y preparación de la muestra	46
2.5	TECNICA ESPECTROSCÓPICA CON TRANSFORMADA RAPIDA DE FOURIER	47
2.5.1	Calibración del espectro	47
2.5.2	Técnicas para la manipulación de la muestra sólida	47
2.6	Tratamiento estadístico	48
2.6.1	Asociación de variables	48
2.6.2	Análisis estadístico para análisis de componentes principales y dendrograma	49
2.6.2.1	Análisis de componentes principales	49
2.6.2.2	Dendrograma	50
2.6.3	Análisis por Ley de potencias: Ley de zipf	50
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
3.1	ASOCIACIÓN DE VARIABLES	52
3.2	ANÁLISIS DE COMPONENTE PRINCIPALES	55
3.3	DENDROGRAMA	58
3.4	ANÁLISIS POR LEY DE POTENCIAS :LEY DE ZIPF	61
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>
	ANEXOS	74

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Región de frecuencias de grupos funcionales encontrada en espectros infrarrojos microbianos	32
Tabla 2. Rangos espectrales para componentes principales	50
Tabla 3. Definición de variables	59
Tabla 4. Siete variables espectrales para 14 muestras	60

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Características morfológicas microscópicas de las especies más patógenas de <i>Candida</i> .	19
Cuadro 2. Especies y Sintomatología de las especies de <i>Candida</i>	54
Cuadro 3. Especies de <i>Candida</i> y su frecuencia en la población	54
Cuadro 4. Valores de las componentes principales estandarizadas, obtenidas de la matriz de varianza resultante de los datos originales de cada espectro.	55
Cuadro 5. Valores de D en orden descendente en el rango de 400-1600 cm <sup>-1</sup>	63
Cuadro 6. Valores "D" en los tres rangos espectrales	63
Cuadro 7. Valores "D" en el rango espectral 400-4000 cm <sup>-1</sup>	64

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Descripción de manejo y preparación de la muestra	47
Figura 2. Procedimiento por Espectroscopía Infrarroja por Transformada Rápida de Fourier en muestras microbiológicas.	48
Figura 3. Componentes principales 1 y 2	57
Figura 4. Componentes principales 2 y 3	57
Figura 5. Variables respecto a las intensidades del rango espectral 1900-800 $\text{cm}^{-1}$	59
Figura 6. Dendrograma siete variables espectrales de 14 muestras	60

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Consentimiento informado	74
Anexo B. Microfotográfica tubos germinativos <i>Candida spp</i>	75
Anexo C. Protocolo y resultados de la identificación Bioquímica de las especies de <i>Candida</i>	76
Anexo D. Espectros infrarrojo (a) <i>C. albicans</i> 1, (b) <i>C. parapsilosis</i> , (c) <i>C. tropicalis</i> .	78
Anexo E. Especies de <i>Candida</i> y su frecuencia en la población	78
Anexo F. Dendrograma rango espectral entre 1900 - 800 $\text{cm}^{-1}$ de 44 muestras.	79
Anexo G. Dendrograma rango espectral entre 1500 -1000 $\text{cm}^{-1}$ de 44 muestras.	79
Anexo H. Dendrograma rango espectral entre 1900 - 800 $\text{cm}^{-1}$ de 14 muestras.	80
Anexo I. Dendrograma rango espectral entre 1500 -1000 $\text{cm}^{-1}$ de 14 muestras.	80
Anexo J. Dimensión fractal "D" y Coeficiente de Correlación $R^2$	81

## GLOSARIO

**ABSORBANCIA:** relación que existe entre la concentración de la muestra y su capacidad de absorber radiación

**BACKGROUND O BLANCO:** registro de todos los elementos involucrados en el procesamiento de la muestra, con el fin de que se resten cuando se tome un espectro y obtener solamente la información de la muestra.

**BLASTOCONIDIAS o BLASTOSPORAS:** células ovoides germinativas producidas por gemación.

*Candida:* hongo levaduriforme patógeno oportunista que aparece como células aisladas de morfología oval o cilíndrica y que se multiplican por gemación.

**CANDIDIASIS:** infección primaria o secundaria capaz de comprometer cualquier tejido del organismo, provocada por hongos levaduriformes del género *Candida*

**DENDROGRAMA:** son gráficos ramificados que expresan la afinidad entre colectivos en relación con una escala gráfica.

**ESPECTRO:** resultado obtenido al desdoblar un haz heterogéneo de radiación electromagnética en sus distintos componentes de diferente longitud de onda.

**FRACTALES:** se deriva del adjetivo latino “fractus” que proviene del verbo latino “frangere” que significa romper o crear fragmentos irregulares.

**FTIR:** medición de la absorción de luz producida por la interacción de los grupos funcionales con energía radiante en el rango infrarrojo, en función de la longitud de onda con transformada rápida de Fourier.

**HIFAS:** células cilíndricas alargadas, que se disponen linealmente para constituir largos filamentos.

**LEY DE ZIPF:** revela una relación de jerarquías a diversas escalas, característica de las redes fractales.

**PSEUDOHIFAS:** son cadenas de células en gemación que no se desprenden y por eso forman una red ramificada parecida a las hifas verdaderas.

**TRANSMITANCIA:** es la fracción de la radiación incidente transmitida por la muestra.

## RESUMEN

Se considera que la candidiasis vulvovaginal es un problema universal, que afecta a millones de mujeres en todo el mundo; es una patología que aparece cuando el equilibrio entre los microorganismos que normalmente habitan en la vagina se pierde y la población de *Candida spp* aumenta, en relación con la de los otros microorganismos (Farinati, 2001); se conocen aproximadamente 250 especies de *Candida*, de las cuales son relativamente escasas las que afectan al ser humano, de éstas últimas es importante lograr una diferenciación que permita llevar a cabo una clasificación para diagnóstico y tratamiento adecuados, debido al incremento de especies que resultan ser más resistentes a tratamientos convencionales.

Las diferencias genéticas existentes entre microorganismos del mismo género pueden ser representadas esquemáticamente por dendrogramas, mostrando el grado de similitud que existe entre las diferentes especies utilizando la técnica de FTIR, la cual arroja información sobre la presencia de ciertos tipos de enlaces o grupos funcionales; el espectro despliega en una vía específica, una huella dactilar fenotípica y genética del microorganismo bajo estudio; existe una variedad de métodos para identificar levaduras de muestras clínicas que resultan dispendiosos y costosos, mientras que FTIR con bajos costos provee una alternativa rápida, exacta y fácil.

En esta investigación se llevó a cabo un muestreo de secreción vaginal de 201 pacientes, de las cuales fueron procesadas 43 que resultaron positivas para *Candida spp*, y un *Saccharomyces cerevisiae* identificado por pruebas bioquímicas, el cual fue usado como patrón de comparación.

Los espectros obtenidos fueron procesados estadísticamente, analizando componentes principales (ACP), con los que se obtuvo una diferenciación representativa y consistente hasta género, con Ley de Zipf se logró un agrupamiento de especies similar al reportado en la literatura, a partir del análisis del espectro total; con análisis de "clusters" (dendrogramas) se presentaron agrupamientos más definidos a partir de un reducido número de datos que representan los puntos espectrales más representativos. Con relación al análisis de variables dependientes, encontramos que el fenotipo con mayor frecuencia en la población fue *Candida albicans* 1(28/43) seguida por *Candida tropicalis* (5/43).

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son procesos muy frecuentes y motivo de consulta diaria en cualquier nivel asistencial, las mujeres padecen infecciones de localización genital, algunas provocadas por hongos del género *Candida*, que pueden encontrarse como flora normal en diferentes zonas del organismo humano, como son la boca, tubo gastrointestinal y vagina, en circunstancias adversas puede ocasionar en el organismo graves afecciones; *Candida spp* puede estar presente en secreción vaginal, sin ninguna manifestación sintomática indicando colonización, pero su presencia en algunos casos puede estar acompañada de algunos síntomas que indicarían una patología. De acuerdo a la literatura, existen aproximadamente 250 especies del género *Candida*, entre las cuales hay un número considerable de especies que son muy resistentes a los antifúngicos utilizados para tratamiento habitual (Healthcare, 2002).

Bajo ciertas condiciones que provocan un desequilibrio ecológico de la biota o flora del organismo humano y animal, estos microorganismos proliferan provocando una enfermedad llamada candidiasis que puede darse tanto a nivel superficial como profundo. La infección superficial afecta la capa córnea de la piel, pelos y uñas, las mucosas (oral, digestiva y vaginal) y semi-mucosas (zonas de contacto entre la piel y la mucosa, por ejemplo, en las comisuras de la boca, en la vagina y la región balano prepucial). Las enfermedades que comprometen los órganos nobles se denominan candidiasis profundas o sistémicas.

Se asume que el 75% de las mujeres sufrirán un episodio de candidiasis vaginal a lo largo de su vida, recidivando en al menos una ocasión, en el 40 a 50% de los casos (Fidel & Sobel, 1996). La presencia de *Candida* puede o no ocasionar

síntomas debido al estado del sistema inmunitario del individuo. Reconocer las diferentes especies del género *Candida* presentes en un individuo es de gran importancia, tanto para el personal médico como para las pacientes, esta información provee una visión amplia acerca del desarrollo y tratamiento que debe seguirse. Las diferencias fenotípicas existente entre las diferentes especies es un factor relevante que es conveniente tener en cuenta en ésta investigación.

Existen una variedad de métodos para identificar levaduras de muestras clínicas, entre las que se incluyen los métodos convencionales, como por ejemplo la observación directa, estudios morfológicos, la prueba de formación de tubo germinal, la utilización de carbohidratos, entre otras, las cuales resultan costosas y demoradas. La espectroscopía Infrarroja por Transformada Rápida de Fourier (FTIR), es una técnica nueva que provee una alternativa rápida, exacta y fácil sobre los métodos convencionales de identificación de los microorganismos, además con otras ventajas como la preparación mínima de muestra, pocos materiales consumibles, análisis automatizado que arroja datos útiles para realizar un análisis cualitativo y/o cuantitativo para diferenciación y clasificación fenotípica (Naumann, 2000).

Como todos los componentes celulares dependen de la expresión de pequeñas o grandes partes del genoma, incluyendo la epigénesis del huésped y el microorganismo, el espectro despliega en una vía específica una huella dactilar fenotípica y genética del microorganismo bajo estudio; por esta razón, cada microorganismo posee su propia lectura espectral lo que permite analizar el grado de heterogeneidad existente entre ellos, para lo cual se utilizó análisis estadístico de componentes principales, análisis de “clusters” (dendrograma) y análisis de potencias: Ley de Zipf.

Con la realización de este trabajo se pretendió caracterizar las diferentes especies de *Candida*, aisladas de secreciones vaginales, obtenidas de la población objeto

de estudio, con el fin de identificar cual es la especie más representativa o que se presenta con mayor frecuencia en ésta población, buscando además, realizar un análisis comparativo entre las diferentes especies, con el propósito de obtener las características espectrales que éstas comparten y así aportar herramientas para mejorar la identificación de éste tipo de microorganismos.

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Candida*

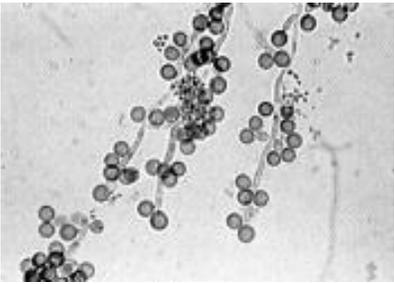
En el año de 1.839 Langenbeck descubrió el microorganismo del muguet (*C. albicans*), observándolo en forma de placas en las membranas mucosas de la boca y otros órganos en cadáveres, al momento de las autopsias. Gruby, en 1842, confirmó esta observación denominándola *Oidium albicans*, para el año 1.923 Burkhout la denominó *Candida*; terminología utilizada actualmente (Sosa ,2001).

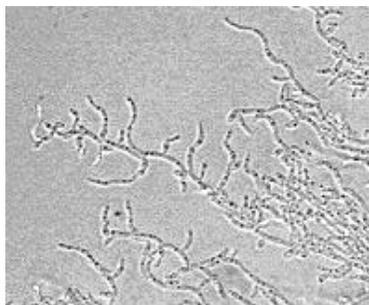
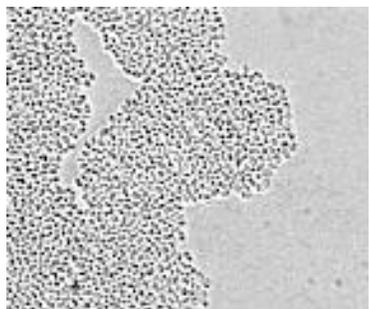
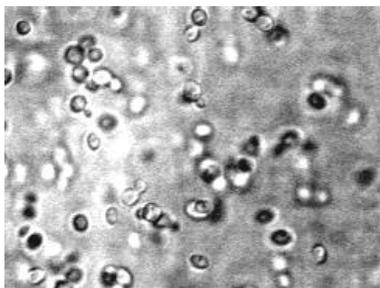
*Candida* es un hongo patógeno, oportunista por excelencia, aprovechando fácilmente cualquier condición anormal como ocurre en casos de inmunodeficiencias, diabetes, alcoholismo, que le permite desarrollarse de forma descontrolada, logrando entonces producir patologías serias. El género *Candida* lo forman hongos levaduriformes que aparecen como células aisladas, de morfología oval o cilíndrica y que se multiplican por gemación. Entre los representantes del género que producen patología en el ser humano, es el que se aísla con mayor frecuencia, y además, la especie de mayor virulencia e interés en patología humana es *C. albicans*; el resto de las especies, que pueden encontrarse como componentes de la flora normal o microbiota del organismo humano o también como flora transeúnte o transitoria, presentan menor virulencia y se aíslan con menos frecuencia (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, etc) (Lennette, 1982.). En el cuadro 1 se muestran las estructuras microscópicas características de cada una de las especies de *Candida* aisladas en este trabajo.

1.1.1 Taxonomía. Las 250(~) especies de levaduras del género *Candida* se encuentran ubicadas dentro del Reino Fungi, pertenecen al Phylum Ascomicota,

la Clase Hemiascomycetes, Orden Saccharomycetales y a la Familia Saccharomycetaceae.

**Cuadro 1. Características morfológicas microscópicas de las especies más patógenas de *Candida***

Morfología microscópica:	Vista microscópica
<b><i>Candida albicans</i></b>	
<p>Clamidosporas pueden ser numerosas, individuales o en racimos. Difícilmente se desarrollan a 35°C.</p> <p>[Tomado:www.medscape.com/viewarticle/463953_11]</p>	
<p>Blastosporas usualmente numerosas. Con frecuencia están agrupados en racimos densos a intervalos regulares a lo largo de las pseudohifas</p> <p>[Tomado:www.medscape.com/viewarticle/463953_11]</p>	
<b><i>Candida tropicalis</i></b>	
<p>Blastosporas en menor número que en <i>C. albicans</i>, usualmente individuales o en pequeños racimos y distribuidos en forma más espaciada que los de <i>C. albicans</i>.</p> <p>[Microfotografías referencia Diagnóstico microbiológico. KONEMAN, Elmer y et al. pag 460 ]</p>	

<p><b><i>Candida parapsilosis</i></b></p> <p>Micelio generalmente delicado, con formación de colonias satélites con aspecto de fósforos cruzados. Escasos blastosporos individuales o en cadenas cortas.</p> <p>[Microfotografías referencia Diagnóstico microbiológico. KONEMAN, Elmer y et al. pag 460 ]</p>	
<p><b><i>Candida glabrata</i></b></p> <p>Presentan formas individuales ovoides, incapaces de formar pseudohifas oseudomicelio o, como máximo, pueden formar una cadena corta de levaduras ovoides.</p> <p>[Tomado: <a href="http://www.medmicro.wisc.edu/.../images/c_glabrata.html">www.medmicro.wisc.edu/.../images/c_glabrata.html</a>]</p>	
<p><b><i>Candida pelliculosa</i></b></p> <p>Presenta formas individuales ovoides o alargadas, pseudomicelio ausente o abundante, contienen de 1-4 ascosporas en forma de sombrero</p> <p>[Tomado: <a href="http://www.pfdb.net/html/species/s50.htm">http://www.pfdb.net/html/species/s50.htm</a>]</p>	

## 1.2 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE *Candida*

1.2.1 Aislamiento microbiológico. El medio habitual de aislamiento para levaduras es el agar de Saboureaud, sin antibióticos. Puede usarse en planos inclinados o placas, según la muestra. Los medios suplementarios son los que contienen

antibióticos. Especialmente útiles, entre éstos últimos son la misma base de Saboureaud más cloranfenicol y cicloheximida. Además de éstos medios, se venden comercialmente diversos medios de agar como los cromogénicos. *Candida spp* crecen a 37 °C en 24 horas en forma de colonias redondas de color blanco cremoso (Koneman, 1983; Lennette, 1982).

*Candida spp* puede ser identificada por la prueba del tubo germinal; la cual consiste en observar la presencia del tubo germinal, que es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre; y como complemento de identificación se encuentra la prueba de clamidosporas cuyo fundamento es observar células redondas u ovals (6 -12  $\mu\text{m}$  de diámetro) y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales. Su producción es característica y diagnóstica de *C. albicans* (Casal, 1981), también puede hacerse una identificación presuntiva de esta especie si se observa la formación de grupos compactos de blastoconidias, a intervalos regulares, a lo largo de la pseudohifa (Linares & Solis, 2001).

1.2.2 Identificación bioquímica. Antes de medir cualquier reacción bioquímica es esencial purificar los cultivos de levadura. Esto debe hacerse, aunque la contaminación no sea inmediatamente aparente, pues un contaminante oculto puede alterar notablemente los resultados. Las reacciones bioquímicas útiles para la identificación de levaduras son:

1. Asimilación de hidratos de carbono: determina la capacidad de una levadura para utilizar un hidrato de carbono, como única fuente de carbono en un medio químicamente definido. Para llevar a cabo ésta prueba existen dos opciones, la primera consiste en realizar un montaje conocido como Auxonograma convencional, que se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrogenocarbonatos o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes

necesarios para su desarrollo y la segunda es una galería API 20 C AUX, basada en la inoculación de la levadura en un medio mínimo semisólido y éstas sólo se reproducen, si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente, permitiendo identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático (Linares & Solis, 2001).

2. Asimilación de KNO (equivalente reducción de nitrato): Determina la capacidad de una levadura para utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno; se usa como medio base carbono de levadura de Wickerham; y nitrato de potasio y peptona (control +) se usan como fuentes de nitrógeno de la prueba (Koneman, 1983; Lennette, 1982).

3. Reacciones de fermentación (producción de gases): la única evidencia segura de fermentación de hidratos de carbono por levaduras, es la producción de gas y por ello deben emplearse inserciones de tubos de Durghan para la detección del gas. El medio basal empleado incluye peptona, extracto de levadura e indicador púrpura de bromocresol; el pH se ajusta a 7.0. Los hidratos de carbono comúnmente empleados son: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa y trehalosa (Koneman, 1983; Lennette, 1982).

Las pruebas antes mencionadas son procesos dispendiosos y de larga duración, que no proporcionan una identificación rápida dificultando un diagnóstico oportuno y por lo tanto un tratamiento adecuado.

### 1.3 PATOGENICIDAD

*Candida* es el principal hongo patógeno del ser humano; es una levadura que vive normalmente en las mucosas: boca, tracto intestinal y vagina. Es común que se instale en la boca de los bebés o en la vagina de las embarazadas. En las mucosas de una persona sana, *Candida* puede vivir sin causar enfermedades. Sin embargo, en personas inmunodeprimidas, o en aquellas que tienen largos tratamientos con antibióticos de amplio espectro, se puede disparar a infección del epitelio mucoso, pasar a la corriente sanguínea y llegar a los órganos (Skoog, 1994).

*Candida* es un hongo dimorfo que puede encontrarse en dos diferentes estados. Las esporas (blastosporas) constituyen el fenotipo para la extensión, diseminación y transmisión. Constituyen una forma resistente del hongo y estarían asociados con las colonizaciones asintomáticas. Por otro lado, los micelios son las formas germinativas: este fenotipo tiene capacidad invasora tisular y ocasiona la sintomatología propia de la infección (Ferrer, 2000).

1.3.1 Candidiasis vaginal. Es una infección vaginal causada más comúnmente por el hongo *C. albicans*. Una circunstancia que se debe tener en cuenta, es que no todas las *Candidas* son *albicans*; la modificación en el patrón epidemiológico de *Candida* observada en los últimos años, certifica el incremento en la presencia de especies no *albicans*, que por lo general son más resistentes a los tratamientos convencionales: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* entre otras. Los síntomas más comunes son: secreción vaginal anormal, varía de una secreción blanca ligeramente acuosa a un flujo blanco espeso y abundante, ardor, prurito, fisuras labiales, enrojecimiento y/o inflamación de la piel de la vulva, edema, excoriaciones, relaciones sexuales y micción dolorosas, éstos síntomas aparecen cuando el equilibrio, entre los microorganismos que normalmente habitan en la vagina se pierde y la población de *Candida spp* aumenta, en relación con la de los otros microorganismos ( Farinati, 2001).

Esto sucede cuando el ambiente en la vagina presenta ciertas condiciones favorables, que permiten que *Candida* crezca y se nutra. Un medio ambiente que dificulte la supervivencia de otros microorganismos, puede igualmente ocasionar un desequilibrio que conlleva a la infección por levaduras. La infección por levaduras se puede presentar después de un tratamiento con antibióticos (especialmente con tetraciclinas), prescritos con otro fin terapéutico. Los antibióticos cambian el equilibrio normal entre los organismos que habitan la vagina, inhibiendo el crecimiento de las bacterias protectoras que normalmente tienen un efecto antimicótico (Panizzo *et al*, 1999).

Esta infección es común en mujeres que toman anticonceptivos orales que contienen estrógenos y en mujeres embarazadas. Esto se debe al aumento de los niveles de estrógeno en el organismo. El aumento del nivel hormonal ocasiona cambios en el ambiente vaginal, que lo hacen perfecto para el crecimiento y la nutrición del hongo. La candidiasis vaginal no se considera una enfermedad de transmisión sexual, sin embargo, del 12 al 15% de los hombres que tienen contacto sexual con una persona infectada desarrollan síntomas como prurito y erupción en el pene. Como los síntomas y signos no constituyen elementos específicos para el diagnóstico de la candidiasis vulvovaginal, el error diagnóstico puede ser frecuente y se transforma en la causa más importante del fracaso terapéutico. Si se tuviera que mencionar la causa del fracaso terapéutico se debería decir que el diagnóstico erróneo es el más común. Es primordial individualizar a las pacientes e instaurar el tratamiento de acuerdo a ello. (LLorente, 2003).

La Candidiasis Vulvovaginal Recurrente (CVVR), definida como cuatro o más episodios anuales, se presenta en al menos el 5% de las mujeres que han experimentado un episodio de Candidiasis Vulvovaginal Primaria Esporádica (CVVPE). Se ha venido observando en estudios recientes el aumento del número de aislamientos correspondientes a especies de *Candida no-albicans* como

agentes etiológicos de vaginitis, particularmente en la CVVR. La importancia de realizar cultivo e identificación de los aislados, radica en el hecho de que algunas especies de *Candida* son resistentes naturales a ciertos imidazoles, como por ejemplo *C. krusei*, que es resistente natural al fluconazol, mientras que otras levaduras como *C. tropicalis* y *C. glabrata* presentan una mayor resistencia a los azoles en general. Se piensa que el uso previo de imidazoles, especialmente el fluconazol, podría efectuar una selección de estas especies resistentes, e incluso podría inducir a la aparición de cepas mutantes de *C. albicans* resistentes a la terapia. (Panizzo *et al*, 1999).

#### 1.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los métodos espectroscópicos son un conjunto de técnicas que se basan en la absorción o emisión de radiaciones electromagnéticas por resonancia de un sistema constituido por átomos. Una de las técnicas más utilizadas es la espectroscopía infrarroja que se basa en la medición de la absorción de luz producida por la interacción de los grupos funcionales con energía radiante en el rango infrarrojo, en función de la longitud de onda.

La región del infrarrojo es una zona del espectro electromagnético, correspondiente a frecuencias que van desde valores inferiores a las frecuencias del visible hasta valores cercanos a las frecuencias más altas de microondas y radas. La radiación infrarroja incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 12800 y los  $10^{-1}$ , lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a 1000  $\mu\text{m}$ . El espectro infrarrojo puede subdividirse en: cercano, medio y lejano. Generalmente, se considera la región infrarroja cercana desde 12800 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  (0,78 a 2,5  $\mu\text{m}$ ); la parte media esta comprendida entre los 4000 y 200  $\text{cm}^{-1}$  (2.5 a 50  $\mu\text{m}$ ) y la región infrarroja lejana de 200 - 10  $\text{cm}^{-1}$  (50 a 1000  $\mu\text{m}$ ). En la región del infrarrojo medio aparecen las bandas de absorción debidas a las vibraciones fundamentales de la molécula, siendo esta región una de las más empleadas (Koneman, 1983).

La espectroscopía infrarroja tiene una gran aplicación en el análisis cuantitativo y cualitativo. Su principal utilización ha sido en la identificación de compuestos orgánicos, que proporcionan una huella única, con unas características que se distinguen fácilmente de los modelos de absorción del resto de compuestos, sólo los isómeros ópticos absorben exactamente de la misma forma. En el análisis cuantitativo, su elevada selectividad a menudo hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesaria una separación previa (Koneman, 1983).

La absorción de radiación infrarroja se limita así en gran parte a especies moleculares, para las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos espacios vibracionales y rotacionales. Para absorber radiación infrarroja una molécula debe experimentar un cambio neto en el momento bipolar, como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Solo en estas circunstancias, el cambio eléctrico alternante de la radiación puede interaccionar con la molécula y causar así cambios en la amplitud de algunos de sus movimientos.

La energía necesaria para provocar un cambio a nivel rotacional es muy pequeña y corresponde a radiaciones de  $100 \text{ cm}^{-1}$  o menores ( $\lambda > 100 \mu\text{m}$ ). La absorción para los líquidos o sólidos en la región del infrarrojo está dada por choques e interacciones intramoleculares, que causan el ensanchamiento de las líneas, resultando un espectro continuo.

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no están exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente, como consecuencia de multitud de diferentes tipos de vibración. Pueden distinguirse dos tipos de vibración: la detención, la cual supone un cambio continuo en la distancia intra-atómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos; y la de flexión, las cuales se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión. En una molécula que contiene

más de dos átomos, pueden tener lugar todos los tipos de vibraciones (Skoog, 1994).

En IR la molécula era irradiada con una sola frecuencia de luz infrarroja por vez, para obtener una buena información espectral debían realizarse mucho barridos para obtener un buen espectro, éste procedimiento llevaba mucho tiempo porque existe una gran cantidad de frecuencias, ahora gracias al algoritmo de la transformada de Fourier, que aporta una nueva técnica a la espectroscopía IR, conocida como espectroscopía Infrarroja por Transformada Rápida de Fourier (FTIR), puede irradiarse una molécula con cada frecuencia de luz infrarroja a la vez y obtener un espectro perfecto.

### 1.5 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA RÁPIDA DE FOURIER (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada rápida de Fourier, utiliza una técnica interferométrica, es decir que cuenta con un interferómetro, mediante el cual la radiación policromática pasa a través de la muestra y va hacia un detector con la intensidad y el tiempo como factores básicos, además cuenta con una computadora digital para procesar los datos espectrales.

Las celdas de absorción empleadas deben tener superficies ópticamente planas y ser de material transparente al infrarrojo para que éstas y los materiales de soporte de la muestra utilizados no absorban la radiación infrarroja (bromuro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de plata o bromuro de plata). Las celdas de espesor fijo son apropiadas para análisis cualitativo; para análisis cuantitativo se emplean celdas de 0,1 a 1 mm de espesor.

FTIR cuenta con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), que posee una placa portamuestra unida a un cristal de Selenuro de Zinc (ZnSe), Germanio

(Ge) o diamante. El ATR es rápido en los tiempos de análisis y de fácil limpieza (Naumann, 2000; Vreeswijk *et al*, 2003).

FTIR es un instrumento indispensable como fuente de datos estructurales de sustancias y aportan un gran caudal de información en relación con las estructuras de las moléculas. Un espectro es una imagen, es la huella dactilar de cada compuesto. La espectroscopía infrarroja se ocupa del análisis de materiales o sustancias de distinta composición química e igual forma cristalina, como un todo sin necesidad de separarlas. Así entonces, los microorganismos, como toda célula, se componen de una variedad de diversos compuestos. La espectroscopía infrarroja da la información detallada sobre la composición de células intactas y un espectro infrarrojo proporciona características del estado del microorganismo (Orsini *et al*, 2002; Timmins *et al*, 1998).

FTIR ha sido catalogada como una gran técnica para el estudio de macromoléculas biológicas y de complejos sistemas biológicos como tejidos y células. Una investigación extensa de muestras de células bacteriales de diferentes especies ha sido realizada por Naumann y colaboradores, estos autores muestran que las huellas dactilares obtenidas por FTIR, son altamente específicas y que diferentes métodos estadísticos pueden ser utilizados para analizar el espectro. Ellos hacen posible la caracterización de microorganismos a diferentes niveles de subespecie.

Es una técnica que provee una alternativa rápida, exacta y fácil sobre los métodos convencionales de identificación de los microorganismos, en esta investigación de las células intactas de microorganismos en espectroscopia infrarroja, son notables algunas ventajas y desventajas entre las que encontramos:

1. Es un método uniformemente aplicable a todos los microorganismos que pueden crecer en un cultivo; la biomasa requerida puede ser poca, una sola colonia tomada directamente del plato de cultivo, es suficiente para hacer una

lectura o una medición de su espectro. Los resultados son obtenidos en pocos minutos, después de obtener la muestra adecuadamente del cultivo puro.

2. Los resultados son obtenibles dentro del trabajo de un día en un marco clínico, incluyendo aislamiento, cultivo e identificación.

3. La detección, enumeración, clasificación e identificación se pueden integrar en un solo instrumento.

4. La espectroscopía infrarroja puede clasificar microorganismos a muy diferentes niveles de discriminación taxonómica, fuera de una preselección de cepas por otro criterio taxonómico.

5. En contraste con las otras técnicas, la espectroscopía infrarroja es útil para identificar niveles de cepa, género y especie.

6. Estas ventajas hacen el método aplicable a una identificación muy rápida de patógenos; investigación epidemiológica de estudios caso, tamizaje de patógenos, control higiene, elucidación de cambio de infecciones, terapia control y detección de infecciones recurrentes; caracterización y tamizaje del desarrollo de microorganismos, procesos de control biotecnológico, control de calidad microbiológica en las industrias farmacéuticas y de alimentos y mantenimiento de colección de cepas.

7. La detección *in situ* de componentes de la célula es posible al igual que el monitoreo y caracterización de resistencia a drogas e interacción droga - célula.

8. Solo se pueden analizar microorganismos obtenidos de un cultivo puro.

9. La clasificación e identificación están basadas en el análisis de la huella dactilar espectral. Información específica en uno o solo unos pocos componentes específicos presentes en la célula, generalmente no está disponible.

10. Resultados estables pueden ser obtenidos siempre y cuando los parámetros microbiológicos (medio de cultivo, tiempo de cultivo y temperatura) sean controlados estrictamente.

11. La aceptación de la técnica por la comunidad dependerá de si la información obtenida mediante los espectros es por lo menos similar a la obtenida por otras técnicas, como las técnicas genéticas moleculares.

12. La fortaleza de la técnica consiste en su habilidad para establecer diferencias entre microorganismos, muy rápidamente entre niveles de especie; clasificaciones a nivel de género pueden no ser relevantes en todos los casos (Naumann, 2000).

## 1.6 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS ESPECTROS

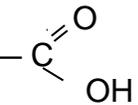
Como es habitual en los gráficos, la ordenada corresponde a una escala lineal de transmitancia, que es la fracción de la radiación incidente transmitida por la muestra y la abscisa mide linealmente los números de onda en unidades de  $\text{cm}^{-1}$ . Mediante microordenadores, con un programa capaz de presentar la señal de salida en una variedad de formatos, tales como transmitancia frente a longitud de onda, y absorbancia, es decir la relación que existe entre la concentración de la solución y su capacidad de absorber radiación, frente a un número de onda o longitud de onda. La preferencia por la escala lineal de números de onda en espectroscopía infrarroja, se debe a la proporcionalidad directa que hay entre ésta magnitud y la energía o la frecuencia. La frecuencia de la radiación absorbida es a su vez la frecuencia de la vibración molecular, que es en realidad la responsable del proceso de absorción. En los espectros de infrarrojo la mayoría de los datos

útiles desde el punto de vista cualitativo, aparecen en números de onda inferiores a los  $2000\text{ cm}^{-1}$  (Naumann, 2000. Skoog, 1994).

## 1.7 REGIÓN DE FRECUENCIA DE GRUPOS FUNCIONALES

Las bandas de absorción observadas en la región infrarroja mediana, aproximadamente entre  $800$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$ , surgen principalmente de los elementos de vibración fundamental y en el grupo de elementos de frecuencia pueden ser asignadas en particular a grupos funcionales. En longitudes de onda menores a  $1400\text{ cm}^{-1}$  las bandas IR que surgen de las vibraciones fundamentales tienden a no alargarse, tal vez por su estructura y sus elementos fuertemente acoplados, los cuales son difíciles para analizar. La interpretación espectral de moléculas biológicas, está basada principalmente en el análisis de estructuras conocidas, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos, que constantemente están presentes en diferentes cantidades y en una amplia diversidad en células microbianas. Las regiones de frecuencia de grupos funcionales encontrada en espectros infrarrojos microbianos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Región de frecuencias de grupos funcionales encontrada en espectros infrarrojos microbianos.

Numeración de bandas	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
	3500	O-H de grupos hidroxilo
	3200	N-H (amida A) de proteínas
1	2959	C-H (asim) de -CH <sub>3</sub>
	2934	C-H (asim) de >CH <sub>2</sub>
2	2921	C-H (asim) de >CH <sub>2</sub> de ácidos grasos
	2898	C-H → C-H metionina
3	2872	C-H (asim) de -CH <sub>3</sub>
4	2852	C-H (asim) de >CH <sub>2</sub> ácidos grasos
5	1741	> C=O esteres
	1715	> C=O esteres
		RNA/DNA.— 
	~1695	Componentes Banda Amida I
	~1685	Resultado antiparalelo de
	~1675	Hojas y pliegues β
6	~1655	Amida I de estructuras α- hélice
7	~1637	Amida I de estructuras hojas β
8	1548	Amida II
9	1435	Banda "Tirosina"
10	1468	C-H de >CH <sub>2</sub>
11	~1400	C=O (sim) of COO <sup>-</sup>
	1310- 1240	Componentes de proteínas banda Amida III
12	1250-1220	P=O (asim) de >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> Fosfodiesteres
13	1200-900	C-O-C, C-O dominado por vibraciones de anillos de carbohidratos.
	1085	P=O (asim) de >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	720	C-H de >CH <sub>2</sub>
	900-600	"región huella dactilar"

<sup>a</sup> Adaptado por Naumann et al<sup>(6)</sup>

Asim = asimétrico; sim = simétrico;

(Tomado Naumann, 2000)

## 1.8 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN MICROBIOLOGÍA

El espectro infrarrojo de células microbianas intactas es ampliamente específico, como huellas dactilares, las cuales son usadas para diferenciar, clasificar e identificar diversas especies y cepas microbianas, es por esto que el espectro infrarrojo microbiano, es también utilizado para detectar *In situ* componentes intracelulares o estructuras tales como, inclusión de cuerpos, materiales almacenados y endosporas, monitoreo y cuantificación metabólica relacionada con CO<sub>2</sub> en relación a varios sustratos diferentes y caracterización de crecimiento dependiendo de la interacción célula-droga. La información característica útil para la caracterización microbiana, está generalmente distribuida sobre la región completa del espectro electromagnético. El espectro característico puede ser extraído sistemáticamente del amplio y complejo perfil espectral, aplicando mejores técnicas de resolución y métodos patrón de reconocimiento, como factor de análisis y análisis de “*cluster*”. Aplicaciones adicionales surgen por medio de un microscopio de luz adaptado al espectrómetro infrarrojo. El espectro infrarrojo de microcolonias, contiene menos de 10<sup>3</sup> células que han sido obtenidas de un cultivo resembrado especialmente para obtener una muestra para IR. Usando un computador que controla las ordenadas x, y, al mismo tiempo, se define que la tarea fundamental del análisis microbiológico a saber, es que la detección, enumeración y diferenciación de microorganismos están integradas en un solo equipo. La eficiencia de FTIR en la identificación de microorganismos ha sido demostrada en estudios en los que se ha comparado con técnicas moleculares (Naumann, 2000; Vreeswijk *et al*, 2003; Sandt *et al*, 2003).

## 1.9 DENDROGRAMA

Los principales caracteres utilizados en taxonomía, la variación de su importancia a lo largo del tiempo y su utilidad para cada sistema de clasificación hacen importante la utilización de dendrogramas. La necesidad de una clasificación taxonómica fue señalada convincentemente en 1970 por Savory: “encontramos

animales tan diferentes en el mundo que no podemos tratarlos separadamente e incluso, si quisiéramos hacerlo, la tarea estaría más allá de la capacidad de la mente y de la memoria humana. La clasificación nos viene impuesta por las limitaciones del cerebro”. En el contexto en que se expresa Savory y en el de muchos otros autores, el concepto de clasificación biológica está restringido al agrupamiento de organismos en taxones - desde el Phylum hasta el género y la especie - por sus atributos estructurales (Margalef, 1982).

Los taxónomos empíricos, no pueden proporcionar una explicación causal para el hecho de ser capaces de agrupar las especies de acuerdo con “relaciones” o “afinidades”. Cuando Strickland (1840) definió afinidad como “la relación que hay entre dos o más miembros de un grupo natural, o en otras palabras, una coincidencia en caracteres esenciales”, dejó las palabras clave, “natural” y “esencial”, sin definir. Darwin vino a rellenar ese hueco y mostró por qué hay grupos naturales y por qué comparten caracteres “esenciales”. Hay dos tipos de relaciones que se pueden utilizar para hacer un agrupamiento general, a saber, la “asociación por semejanza” y la “asociación por contigüidad”, siendo conocida la primera generalmente como “sistemática” y la segunda como “taxonomía” (López & Pérez, 1999).

El análisis de dendrogramas a partir de espectros obtenidos por espectroscopía de infrarrojo, hace posible el estudio de similitud existente entre las diferentes especies de *Candida*.

1.9.1 Índices de afinidad. Las afinidades entre especies se pueden calcular de modo diverso. Si se tienen censos, se puede calcular el coeficiente de correlación, lo cual requerirá ordinariamente la transformación previa de los datos (generalmente transformación logarítmica) para normalizarlos. En taxonomía numérica se suele normalizar cada distribución, haciendo la media  $x = 0$  y la variancia  $s^2 = 1$ . Si se emplean estimaciones de abundancia según una escala aproximadamente logarítmica, dichas cifras se pueden utilizar directamente en el

cálculo de correlaciones. Las matrices de correlación sirven para elaboración posterior de los datos, pero no están libres de crítica. Especies raras, con muchos ceros, pueden dar correlaciones excesivamente altas si por azar coinciden. El coeficiente de correlación estadístico entre dos variables,  $x$ ,  $y$ , es igual a la covariancia dividida por la media geométrica de las varianzas.

$$r = \frac{\sum (\bar{x} - x) (\bar{y} - y)}{\sqrt{\sum (\bar{x} - x)^2 \sum (\bar{y} - y)^2}}$$

donde  $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ , denotan las medias de  $x$ ,  $y$ .

Expresión de las afinidades: las afinidades mutuas entre una serie de colectivos, se expresan en forma de una matriz cuadrada y simétrica, por lo que basta con representar solamente la mitad. Se exceptúa el caso de afinidades calculadas sobre la información o la diversidad, que son diferentes según el colectivo del que se parta en la comparación y que dan una matriz no simétrica (Margalef, 1982).

Cambiando filas y columnas se puede conseguir aproximar en la representación los colectivos que tienen mayor afinidad. Generalmente se emplean símbolos convencionales en lugar de los valores numéricos. El resultado de este proceder son los diagramas generalmente denominados de enrejado. Otra representación apropiada consiste en escribir los nombres de los colectivos que se comparan a una distancia inversamente proporcional a su afinidad y señalar ésta por medio de líneas. Semejante representación es muy apropiada para destacar las afinidades entre las especies. Los gráficos ramificados (dendrogramas) expresan la afinidad entre colectivos en relación con una escala gráfica, trazando las uniones entre pares de colectivos o entre un colectivo y el resultado de fusionar varios colectivos semejantes, a la altura correspondiente del índice de afinidad usado, que puede ser un  $x^2$ , coeficiente de correlación o aumento de información. En los dendrogramas se suelen indicar las especies —o, en general, aquellas características— que contribuyen más a cada divergencia. Para proceder de manera correcta hay que rehacer los cálculos para cada grupo después de una fusión. En general se trata de representar en un plano relaciones en un espacio de tres o más dimensiones o incluso en un espacio no métrico (Margalef, 1982).

1.9.2 Clasificación. Los procedimientos mencionados proporcionan una estimación de la diferencia entre las entidades que se van a clasificar, o permiten agrupar caracteres redundantes, con lo que se facilita cualquier procedimiento de estimación de afinidades; pero no pueden proporcionar directamente una clasificación. Algunas clasificaciones implican decisiones subjetivas. Si se tiene, por ejemplo, un dendrograma, se puede proceder de dos formas, adoptar cierto límite para la separación de grupos, trazando una línea horizontal por cierto valor de la escala, considerando luego tantos grupos como secciones queden colgando, o fijar arbitrariamente un número «conveniente» de grupos, y luego mover arriba o abajo la línea de sección, hasta que su intersección dé precisamente dicho número.

En los procedimientos de representación en un espacio multidimensional se ha mencionado la posible delimitación de enjambres que, naturalmente, se identificarían con grupos en cualquier clasificación. Pero la tarea de reconocerlos es difícil, y los procedimientos para ir desglosando sucesivamente grupos muy compactos son complicados. Algunas técnicas simples pueden empezar buscando el elemento que está más próximo a los demás (por ejemplo, aquél para el cual es mínima la suma de las distancias a todos los otros, o máxima la suma de los cuadrados de su correlación). Este elemento puede considerarse como la cabeza del primer-grupo y unir a él todos aquellos que distan de él una distancia inferior a cierto límite fijo (decisión personal). Extraído este grupo, conviene rehacer los cálculos con todos los elementos restantes y proceder otra vez de la misma manera; o bien, fijarse en el elemento que está más distante del primero y a su alrededor cristalizar otro grupo (Margalef, 1982).

Las diferencias estructurales encontradas y que han sido representadas en el dendrograma pueden determinar cuáles son las especies que podrían afectar a una población, dependiendo de la similitud de una especie y otra, es decir, que tan lejos o cerca se encuentre la una de la otra.

## 1.10 COMPONENTES PRINCIPALES

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí. Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (habrá, pues, que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones). Esto no siempre es fácil, y será de vital importancia el conocimiento que el experto tenga sobre la materia de Investigación.

1.10.1 Representación en un hiperespacio. Se considera un espacio de muchas dimensiones, cada una de las cuales represente una característica medible del ecosistema, o de la muestra que se ha estudiado en representación del mismo, dicha muestra, viene definida por un punto. Dos muestras de igual composición concurren en un mismo punto y se puede aceptar que los puntos representativos, están tanto más próximos cuanto mayor afinidad existe entre las muestras que se consideren. Esta representación tiene muchas ventajas adicionales. Una de ellas, es que consiente la representación espectral de las características de las muestras. Si la muestra se inicia con un individuo de determinada especie, se representa por el valor 1 del eje que corresponde a la especie mencionada, siendo 0 los valores en todos los demás ejes. El proceso de ir ampliando la muestra, añadiendo individuos de la primera especie o de otras especies, hace que el punto representativo de la muestra se aleje del origen de coordenadas y se mueva, más o menos, hacia las zonas que corresponden a una diversidad mayor. Al situar una muestra queda definida su diversidad. El estudio de las afinidades entre muestras se convierte en la estimación de las relaciones de proximidad entre los puntos respectivos. Es de suponer que distintas muestras obtenidas de una misma

comunidad formen como una nube densa, por estar próximos unos a otros los puntos correspondientes y de esta forma, la afinidad entre dos comunidades se reducirá a estimar la distancia entre los centros de gravedad de las nubes de puntos respectivos. Si dichas nubes tienen un volumen común, en que se superponen, el problema será menos fácil de resolver y se puede reducir, en todo caso, a una comparación de variancias. Otra ventaja grande de esta representación es que sucesivos estados de un mismo sistema se representan por una serie de puntos. Si el sistema fluctúa, dichos puntos forman una nube, nube que puede ser más compacta o más amplia y tenue, según el tipo de fluctuación a que el sistema está sometido. La sucesión se representará por una trayectoria más seguida. (Margalef, 1982).

Si se continúa con la consideración de un hiperespacio en el que se representa la composición de muestras diferentes de ecosistemas, es obvio que si dos especies tienen correlación perfecta entre sí, en el sentido de que, por ejemplo, siempre 2 individuos de la primera acompañan a un individuo de la segunda, sobre el plano definido por las dos dimensiones que representan a las mencionadas especies, todos los puntos se encontrarán alineados, de manera que es posible sustituir aquellas dos dimensiones por una sola, consiguiendo una simplificación en la representación de las distribuciones. Es decir, cuando existe constancia en la correlación entre diferentes parámetros, su representación se simplifica. En realidad, la correlación entre distintos parámetros nunca vale uno y la simplificación se convierte en un procedimiento estadístico relativamente complicado (Margalef, 1982).

El análisis de componentes principales constituye un recurso muy útil y requiere también el uso de computadores, porque supone un número muy elevado de operaciones de cálculo.

## 1.11 FRACTALES

El matemático griego Euclides, que vivió alrededor del año 300 a. C., escribió “Los Elementos” una de las obras más conocidas de la literatura mundial. En ella se presenta de manera formal, el estudio de las propiedades de líneas, planos, círculos, esferas, triángulos y conos, etc; es decir, de las formas regulares.

Las ideas de Euclides constituyen una considerable abstracción de la realidad. Por ejemplo, supone que un punto no tiene tamaño; que una línea es un conjunto de puntos que no tienen ni ancho ni grueso, solamente longitud; que una superficie no tiene ancho, de acuerdo con Euclides, no tiene tamaño, se le asigna una dimensión nula o de cero. Una línea tiene solamente longitud, por lo que adquiere una dimensión igual a uno. Una superficie no tiene ancho, por lo que tiene dimensión dos. Finalmente, un cuerpo sólido, como un cubo, tiene dimensión tres. De hecho, en la geometría euclidiana las únicas dimensiones posibles son las que corresponden a los números enteros: 0, 1, 2 y 3.

Los fractales fueron concebidos aproximadamente en 1.890 por el francés Henri Poincaré. Sus ideas fueron extendidas más tarde fundamentalmente por dos matemáticos también franceses, Gaston Julia y Pierre Fatou, hacia 1.918. Se trabajó mucho en este campo durante varios años, pero el estudio quedó congelado en los años 20. El estudio fue renovado a partir de 1974 en IBM y fue fuertemente impulsado por el desarrollo de la computadora digital. El Doctor Benoît Mandelbrot de la Universidad de Yale en 1.977, con sus experimentos de computadora, es considerado como el padre de la geometría fractal. En honor a él, uno de los conjuntos que él investigó fue nombrado en su nombre.

1.10.1 Fractal. Es un objeto geométrico de estructura irregular, aparentemente caótica. Mandelbrot observó, que estos objetos estaban presentes en muchos procesos y formas de la naturaleza.

La dimensión fractal, es el grado de fracturación del sistema o la estructura, y sirve para determinar que tan simple o complejo es su comportamiento o patrón, por tanto la dimensión fractal, es también una medida de la complejidad. Una dimensión fractal, puede ser entera como la dimensión euclidiana o fraccionaria; esto significa que una estructura con una dimensión fractal, así se encuentre entre la recta y el plano, si se acerca a 2 es casi un plano y si se acerca a 1 es casi una recta, de esta manera es posible medir la complejidad de diferentes fenotipos de microorganismos.

La definición matemática se basa en la dimensión de Hausdorff (D), que es una extensión de las dimensiones a una dimensión genérica no entera. Siendo  $D = \frac{\ln(N)}{\ln(1/L)}$ , con N, representando el número de partes en que se divide y L el factor que escala respecto del generador. A partir de esto se dice que un conjunto posee estructura fractal si su dimensión de Hausdorff es mayor que la euclídea.

1.11.2 La Ley De Zipf. Los espectros de absorción infrarroja son curvas muy complejas ricas en información. Cada banda característica de absorción está dada por un grupo funcional de una molécula que absorbe energía a una longitud de onda determinada.

A fin de cuantificar estos espectros se ha propuesto emplear una ley de potencia, para determinar la escalaridad de los espectros. La razón es que en los espectros observados se pueden apreciar pocas bandas con altas frecuencias de absorción y muchas bandas con bajas frecuencias de absorción. Estas distribuciones son típicas de un comportamiento escalar, por lo cual se pensó en que una ley de potencia, debería permitir describir matemáticamente bien la complejidad encontrada en los espectros. Una de las leyes de potencia más empleada es la ley empírica de Zipf, creada por George Kipling Zipf, quien descubrió que si se contaba el número de veces que se usa cada palabra en distintos textos en inglés, y se ordenan de más frecuente a menos frecuente, se cumple que la frecuencia de

la palabra  $i$ -ésima, multiplicada por " $i$ " es igual a una constante que depende del texto escogido (Zipf, 1949, Mandelbrot, 1983).

Esta ley ha demostrado su gran utilidad para cuantificar un sinnúmero de distribuciones en la naturaleza y las actividades humanas. Por ejemplo, la ley de Zipf ha demostrado su utilidad práctica para categorizar items de diferentes tipos, ya sean, número de habitantes por ciudades, ingresos salariales (Mandelbrot, 1983), adaptación viral (Vargasa et al., 1999), repertorios del sistema inmune (Burgos & Moreno-Tovar, 1996), genes de importancia para la clasificación del cáncer (Lin & Yang, 2002), tamaño y distribución de las empresas en los EE.UU. (Axtell, 2001), entre otras aplicaciones.

Dada la utilidad práctica de este abordaje, en esta investigación se utilizó la Ley de Zipf para modelar y clasificar los espectros de absorción al infrarrojo de las muestras de *Candida spp.*

En esta investigación, cada absorbancia obtenida a partir de un espectro de infrarrojo, se divide entre el número total de absorbancias, para obtener su frecuencia relativa y de esta manera, la frecuencia de cada absorbancia que aparece en la investigación.

Ahora se enlistan las absorbancias, colocando en primer lugar aquella que aparece con la mayor frecuencia; en segundo lugar la absorbancia con el segundo valor de frecuencia, y así sucesivamente. Al lugar que ocupa una absorbancia se denominará rango de la absorbancia. Suponga que una absorbancia con la frecuencia más alta, ocupará el primer lugar y por tanto tendrá el primer rango y la absorbancia con la frecuencia siguiente ocupará el segundo rango y así sucesivamente.

En diferentes estudios se encuentra que existe una relación entre la frecuencia y su rango. En efecto, mientras mayor sea el rango, menor será la frecuencia con la que aparece. La frecuencia del rango depende en forma inversa (porque disminuye a medida que el rango aumenta) de la primera potencia del rango. Si denotamos con la letra  $f$  la frecuencia y con la letra  $r$  al rango, entonces la relación matemática es que  $f$  depende de  $r$  como  $(1/r)$ . Este resultado se llama la ley de Zipf. Se sabe que esta dependencia es precisamente la misma que se obtiene para otros fenómenos que recibe el nombre de dependencia  $(1/f)$ , o ley de potencias; en este caso la potencia  $-1$ , matemáticamente hablando. Lo que implica un comportamiento autosimilar, esto significa el grado en el cual el proceso o la estructura escalan, dando una relación entre las dos variables, rango y absorbancia.

La Ley de Zipf, también da la dependencia de la frecuencia de ocurrencia de una acción con respecto al número de acciones que se usen, o sea, a la amplitud de la investigación. Mientras menor número de muestras tenga la investigación, mayor será la frecuencia de la acciones en los primeros rangos.

Una de las formas de entender el origen de la Ley de Zipf, ha sido considerar los lenguajes que han sido producidos por el cerebro humano, generando su estructura. Se ha realizado el análisis de modelos dinámicos de lingüística, lo que ha permitido hacerse algunas ideas acerca de la forma como procesa la información un agente biológico, como el cerebro humano. Esta dinámica presenta comportamientos caóticos, lo que no debería ser extraño, porque una de las características de un régimen caótico es que puede generar variedad, mientras que cuando está dentro del régimen periódico, o regular, se produce la confiabilidad. La variedad permite que haya innovación, mientras que la estabilidad permite que haya orden.

La consecuencia de construir el lenguaje, con una dinámica que produzca un régimen caótico, es que la estadística que resulta con respecto a las palabras

sigue la Ley de Zipf, lo que quiere decir que la dimensión fractal de modelos dinámicos de la lingüística, se adapta bien en la estimación fractal al mundo de la biología, por ejemplo el sistema inmune, tejidos, órganos y sistemas biológicos son fractales, dando lugar a comportamientos caóticos (Burgos, Moreno, 1995-1996).

Cabe destacar, que no se encuentran reportes en la literatura donde se utilicen análisis por ley de Zipf, para identificación de microorganismos a partir de datos espectrográficos. Considerándose éste como un trabajo pionero en esta área.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 REACTIVOS

Agar Saboureaud: se disolvió 65 gr por litro de agua destilada.

Cloranfenicol: se disolvió 0.052 gr por litro de medio Saboured.

Suero humano: obtenido a partir de sangre total centrifugada a 1000 rv/s por 15 minutos.

Azul de lactofenol

Alcohol antiséptico

Bromuro de Potasio (KBr)

### 2.2 MATERIALES Y EQUIPOS

Materiales:

Hisopos estériles

Guantes

Tapabocas

Especulos desechables

Cubre y porta objetos

Cajas de petri

Tubos ensayo

Pipetas y puntas

Mecheros

Asas recta y circular

Mortero

Equipos:

Cámara de Flujo Laminar Telstar BV -100. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca.

Incubadora Thelco serie 22AD2. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca.

Microscopio Nikon Alphaphot 2 YS2-H. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca.

Espectrofotómetro infrarrojo Genesis FTIR mattson (ATI), modelo 240 resolución ( $4000\text{ cm}^{-1}$ -  $400\text{ cm}^{-1}$ ). Laboratorio de Organometálica, Departamento de Química. Universidad del Cauca.

### 2.3 NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Para la correcta manipulación de las muestras fué necesario tener en cuenta los siguientes requerimientos: Uso de ropa adecuada, guantes desechables y tapabocas. Los residuos fueron descartados cuidadosamente mediante incineración (normas de bioseguridad CDC de Atlanta de 1994).

### 2.4 OBTENCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Candida*.

Éste estudio se realizó con muestras de secreción vaginal, teniendo en cuenta que en éstas pueden encontrarse varios tipos de levaduras, como por ejemplo *Candida*, *Trichosporum* y *Saccharomyces* (Buscemi, 2004; Lopez, 2004), éstos microorganismos crecen con características macroscópicas iguales por lo que se hace necesario diferenciar correctamente el genero, ya que el tratamiento varía de acuerdo al microorganismo.

2.4.1 Tamaño de la muestra. A partir del programa EpiInfo, se determinó el tamaño de muestra, el cual fué de 201, Las muestras de exudado vaginal fueron obtenidas

de mujeres sintomáticas y asintomáticas en edad fértil (18–35 años), de las cuales 43 muestras resultaron positivas para *Candida*. Estas se colectaron de pacientes que asistieron a consulta ginecológica en la Institución Prestadora de Salud Comfacauca, por personal capacitado, manteniendo las normas de bioseguridad antes descritas; para la toma de las muestras se solicitó el consentimiento informado (Anexo A).

**Nota:** En el análisis final de las muestras el número total fué de 44, ya que se incluyó una muestra adicional, aislada a partir de una de las muestras de secreción vaginal, que fué identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se usó como control en los resultados de las pruebas.

2.4.2 Descripción de manejo y preparación de la muestra. Para la toma de la muestra se realizaron los siguientes pasos: se introdujo en el canal vaginal un espéculo, con un hisopo estéril se obtuvo la muestra de secreción vaginal, se codificó el material obtenido y se sembró inmediatamente en un medio de cultivo (agar Sabouraud + cloranfenicol). Las muestras se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C por 24 horas; al observar crecimiento positivo, caracterizado por la presencia de colonias blancas, cremosas, lisas y brillantes se procedió a efectuar su identificación. Se realizó un montaje, con una colonia del cultivo mas una gota de Azul de Lactofenol, y se observó al microscopio para determinar si eran hongos del género *Candida* (presencia de blastoconidias), para los resultados positivos se resembró hasta obtener un cultivo puro. De igual forma se realizó el montaje para prueba de tubo germinal, en el cual se emulsionó una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano, se incubó a 35 °C durante 2 h y finalmente se depositó una gota de la emulsión sobre un porta objetos y se visualizó a x40 y x100 (Anexo B), (Véase Figura 1). Todas las muestras fueron identificadas bioquímicamente por API 20C AUX (Anexo C).



**Figura 1. Descripción de manejo y preparación de la muestra**

## 2.5 TÉCNICA ESPECTROSCÓPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

2.5.1 Calibración del espectro. Se comprobó regularmente la exactitud de la calibración del instrumento. Generalmente, se registra el espectro de una película de poliestireno de 0,05 mm de espesor, que muestra un conjunto de bandas características bien definidas, con las que puede calibrarse o comprobarse la escala de longitudes de onda del espectrofotómetro (Naumann, 2000).

2.5.2 Técnicas para manipulación de la muestra sólida. Cada vez que se llevó a cabo el procedimiento de la toma de espectros, se acondicionó asépticamente el equipo, para evitar falsos positivos, mediante la limpieza exhaustiva de sus partes, con alcohol antiséptico; el mortero donde se trata la muestra también fue debidamente desinfectado.

El primer paso es usar un “blanco” que consiste en mezclar KBr con Agar Sabouraud, se homogenizó y prensó manualmente. Con el equipo de infrarrojo se registró el “background” o “blanco” que sirve de base para la toma de los demás espectros.

La muestra de la cepa se cualifica con 150  $\mu\text{g}$  de KBr; con una microespátula se homogenizó y ésta mezcla se sometió a un prensado manual, con el fin de obtener una excelente película, para proceder a tomar el espectro de FT-IR, de esta misma forma se procedió a tomar las 44 muestras totales, con dos repeticiones cada uno para un total de tres lecturas, para evitar posibles errores. De cada espectro se obtuvo 1868 datos en el rango de  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 2).



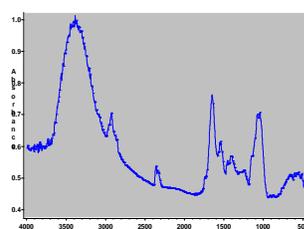
a) Maceración de la muestra con KBr



b) Prensado de la muestra



c) Montaje de la muestra en el equipo



d) Espectro infrarrojo obtenido

**Figura 2. Procedimiento por Espectroscopía Infrarroja por Transformada Rápida de Fourier en muestras microbiológicas.**

## 2.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

2.6.1 Asociación de variables. Se identificó asociación entre la variable de interés (fenotipos de *Candida*), con la vaginitis, edad, estado civil, nivel de educación,

métodos de planificación, estado gestacional, mediante la prueba de Chi cuadrado de Pearson con un nivel de significancia de 0.05, con el paquete estadístico SSPS, versión 10, calculando frecuencias, porcentajes y análisis bivariados.

2.6.2 Análisis estadístico para análisis de componentes principales y dendrograma. Este análisis se realizó, utilizando el programa Kyplot, el cual proporciona un conjunto integral de análisis y visualización de datos, dentro de los que incluye los obtenidos del espectro; el análisis se llevó a cabo a partir de la información obtenida de la Intensidad (absorbancia) y Longitud de Onda, como se explica a continuación:

- Obtención de los valores del total de los puntos, que indican Absorbancia y Longitud de onda para cada espectro.
- Se normalizaron los datos llevándolos a un punto máximo común entre los 44 espectros, para trabajar con la totalidad de las muestras en los mismos términos numéricos (Anexo D).

2.6.2.1 Análisis de componentes principales. Para los espectros que fueron tomados para cada una de las muestras, se realizó un análisis multivariado por el método de análisis de componentes principales; por la capacidad del programa los datos espectrales se dividen en siete rangos (Véase tabla 2), para medir diferentes características de las regiones utilizando el programa Kyplot 2.0, el cual arroja un reducido número de datos, que representan los valores más representativos de cada muestra con respecto a las demás. Los diferentes rangos se trataron de la misma forma; se obtuvieron cinco componentes principales de los cuales CP1, CP2 y CP3, presentan un porcentaje acumulado muy alto, mientras que CP4 y CP5 acumulan un porcentaje bastante bajo y por ello se graficaron los resultados teniendo en cuenta las componentes 1, 2 y 3 (Véase cuadro 5).

**Tabla 2. Rangos espectrales para componentes principales**

Número	Rango	
0	495.6	730.87
1	669.16	900.58
2	890.94	1105
3	1091.5	1322.92
4	1299.77	1536.98
5	1536.98	1778.04
6	1770.32	2009.45
7	1999.81	2231.23

2.6.2.2 Dendrograma. Todas las muestras se analizaron por medio del programa Kyplot, con la herramienta de análisis de “clusters” considerando los rangos espectrales 1900 - 800  $\text{cm}^{-1}$  y 1500 - 1000  $\text{cm}^{-1}$  éstos fueron medidos igualmente y fué aplicado el algoritmo de Ward’s (Naumann *et al*, 2000).

2.6.3 Análisis de potencias Ley de Zipf. Con este tipo de análisis, se quiere ver que tan compleja es una serie de datos, en éste caso se quiere ver las diferencias mínimas que existen en el comportamiento molecular de los diferentes fenotipos.

Para llevar a cabo el procedimiento de Ley de Zipf, se debe tener una serie de datos, que en este caso fueron las absorbancias; luego se organizan de mayor a menor, para calcular su frecuencia de ocurrencia y continuar asignando a cada absorbancia un rango, donde el valor superior tiene el rango uno, el valor que le sigue el rango dos y así sucesivamente.

Como el valor del coeficiente de correlación se altera de forma importante ante la presencia de un valor extremo, como sucede con la desviación típica, conviene realizar una transformación de datos que cambia la escala de medición y modera el efecto de valores extremos (como la transformación logarítmica).

El coeficiente de correlación ( $r$ ), mide solo la relación con una línea recta. Dos variables pueden tener una relación curvilínea fuerte, a pesar de que su correlación sea pequeña. Por tanto, cuando se analicen las relaciones entre dos variables, se deben representar gráficamente y posteriormente se calcula el coeficiente de correlación. El valor del coeficiente de correlación es independiente de cualquier unidad usada para medir las variables y es:

$$r = \sqrt{(r)^2}$$

En la interpretación del coeficiente de correlación  $r$ , los valores próximos a 1 indican una correlación fuerte y positiva; los valores próximos a  $-1$  indican una correlación fuerte y negativa. Valores próximos a cero indican que no hay correlación lineal. Así mismo, si se eleva al cuadrado el coeficiente de correlación se obtiene el coeficiente de determinación. El  $r^2$  indica el porcentaje de la variabilidad de la muestra.

A los rangos y a las absorbancias se les calcula el logaritmo natural, se grafican los datos y se saca una regresión con tendencia lineal, donde se calcula la ecuación de la línea recta  $y = mx + b$  y se calcula  $r^2$ , representando "x" el rango y "y" la absorbancia.

El número que multiplica a  $x$  (pendiente) en la ecuación de la línea recta, se usa para obtener el valor del inverso que multiplica a  $x$ , este valor se grafica con el fin de calcular la tendencia de los datos. Así, a medida que el valor del inverso que multiplique a  $x$  aumente, la escalaridad de los datos y la dimensión fractal es más compleja (Prado, 2004).

El anterior procedimiento se aplicó a todo el espectro de  $400-4000 \text{ cm}^{-1}$  y luego se dividió en tres rangos de  $400 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1601 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  y  $2801 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ; con el fin de determinar cual es el rango más informativo en la identificación de los diferentes fenotipos de *Candida*.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ASOCIACIÓN DE VARIABLES

De las 201 pacientes con consentimiento informado que proporcionaron muestra de secreción vaginal para cultivo, resultaron 43 muestras positivas para *Candida*; el 62.7% de las pacientes (27/43) presentaron síntomas por candidiasis vaginal y 37.3% (16/43) habían sido colonizadas por especies del género *Candida*, caracterizada por la ausencia de síntomas, siendo esta población más susceptible a desarrollar infección en comparación al resto de la población total, encontrando que *C. albicans* 1 es la especie más relacionada con vaginitis en un porcentaje de 41.8%, mientras que las especies no *albicans*, acumulan un porcentaje de 20.9 % que se distribuye así, *C. tropicalis* con 9.3% y en porcentajes más bajos *C. albicans* 2 y *C. parapsilosis* con 4.6% y *C. glabrata* 2.4%. *C. albicans* fué clasificada como 1 y 2 por la base de datos (V3.0) con la ayuda del catálogo analítico, por medio del programa de identificación API® 20 C AUX.

Se comparó la sintomatología en las especies *albicans* 1, con la sintomatología de las demás especies encontradas y se observó que no hay significancia, lo que indica que la presencia de un fenotipo en particular no implica la presencia de determinados síntomas y viceversa (Véase cuadro 2).

Se identificaron los diferentes fenotipos, encontrando que el fenotipo con mayor frecuencia en la población fué *C. albicans* 1 (28/43), seguida por *C. tropicalis* (5/43); se destaca en este trabajo la importancia del aislamiento de *C. pelliculosa* que no ha sido reportada en la literatura en este tipo de muestras, la cual también fué utilizada para los análisis fenotípicos (Véase cuadro 3), (Anexo E).

Según el estudio realizado por Buitrón en el año 2002, las especies del género *Candida* más frecuentes, como responsables de la candidiasis vaginal, cervicovaginal y vulvovaginal son *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*, la presencia de una u otra de estas especies varía según el país, por ejemplo *C. krusei* se ha reportado en Colombia y Brasil, donde no se aísla *C. glabrata*; a diferencia de los resultados encontrados en este trabajo en el que se aisló *C. glabrata* y no se encontró *C. krusei*, por lo que son necesarios más estudios sobre este tema en Colombia; en Estados Unidos se aísla *C. glabrata* en 10% de las pacientes, a diferencia de *C. albicans*, cuyo aislamiento corresponde a 90% de los casos. En México *C. albicans* predomina, de igual forma, ésta especie se aisló en mayor porcentaje en este estudio; por esto es importante la identificación de la especie para saber qué microorganismo predomina en una zona, lo que conllevaría implicaciones terapéuticas; según Gorke, en el año 2002, durante los últimos años se han producido dos hechos posiblemente interrelacionados entre sí: un significativo aumento de frecuencia de detección de especies no *albicans* y una mayor tasa de recurrencias de los episodios de vulvovaginitis. De hecho, el incremento de especies no *albicans*, ha sido observado fundamentalmente en los episodios recurrentes. Ello ha sido relacionado con una generalización de terapias inadecuadas (automedicación), la erradicación de *C. albicans* puede causar una selección de especies resistentes a diferentes agentes de uso común; por esta razón, es importante resaltar la importancia de identificar las especies de *Candida*, para evitar a futuro posible emergencia de nuevos fenotipos y complicaciones terapéuticas, ya que en este estudio se aisló un nuevo fenotipo, *C. pelliculosa*, que no ha sido reportado en muestras de secreción vaginal.

*Candida spp* está distribuida aleatoriamente en la población estudiada, independientemente de la edad, estado civil y nivel de educación. En éste estudio, en las muestras positivas para *Candida*, se encontró un alto porcentaje en el uso de métodos de planificación (67.4 %) y pacientes en estado gestacional (34.8 %), lo cual podría estar relacionado con los reportes hallados en la literatura, donde se

afirma que estos son factores de riesgo para la presencia de *Candida* (Ferrer, 2000; Issler, 2001; Barrenetxea, 2002).

**Cuadro 2. Especies de *Candida* y su sintomatología**

<b>Especie (s)</b>	<b>Sintomática</b>	<b>Asintomática</b>
<i>C. albicans 1</i>	18 (41.8)	10 (23.3)
Otras especies	9 (20.9)	6 (14.0)
Total	27(62.7)	16(37.3)
P <sup>a</sup> *	0.391	

\*Significancia estadística establecida por prueba de Ji<sup>2</sup> (SPSS 10)

**Cuadro 3. Especies de *Candida* y su frecuencia en la población.**

Especies de <i>Candida</i>	Frecuencia	Porcentaje
<i>C. albicans 1</i>	27	65.1
<i>C. tropicalis</i>	5	11.6
<i>C. albicans 2</i>	4	9.3
<i>C. parapsilosis</i>	3	7.0
<i>C. glabrata</i>	2	4.7
<i>C. pelliculosa</i>	1	2.3
Total	43	100.0

### 3.2 ANÁLISIS DE COMPONENTE PRINCIPALES

**Cuadro 4. Valores de las componentes principales estandarizadas, obtenidas de la matriz de correlación resultante de los datos originales de cada espectro**

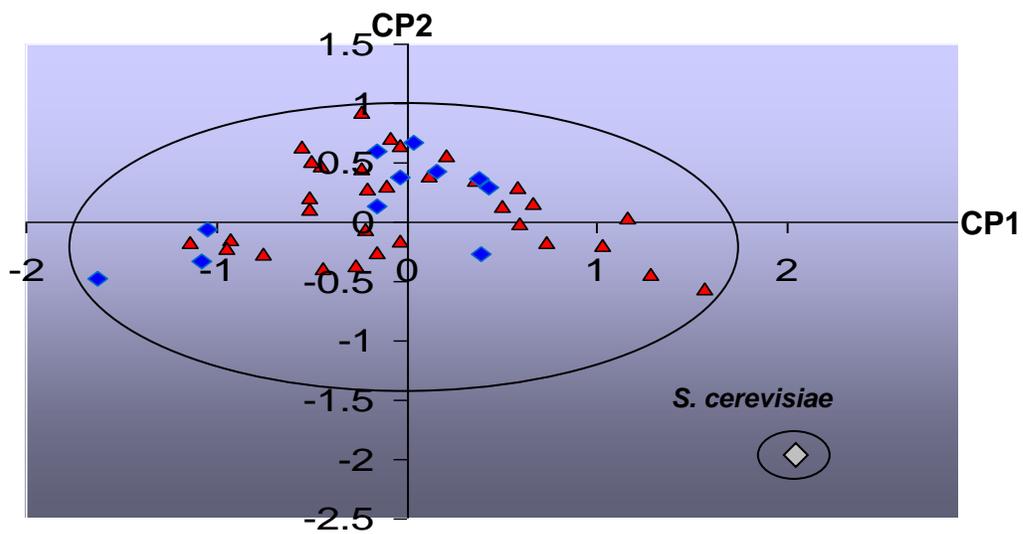
Código	CP1	CP2	CP3	Especies
1	0.36	0.36	-0.07	<i>C. albicans</i> 1
11	-0.04	0.38	-0.03	<i>C. parapsilosis</i>
22	0.66	0.16	-0.24	<i>C. albicans</i> 1
23	-0.21	0.29	0.44	<i>C. albicans</i> 1
25	0.58	0.3	0.46	<i>C. albicans</i> 1
34	-0.55	0.63	0.25	<i>C. albicans</i> 1
43	-0.24	0.45	-0.05	<i>C. albicans</i> 1
44	0.21	0.56	0.04	<i>C. albicans</i> 1
46	0.73	-0.17	-0.45	<i>C. albicans</i> 1
47	0.38	0.36	0.23	<i>C. pelliculosa</i>
50	-1.14	-0.17	-0.27	<i>C. albicans</i> 1
55	-1.08	-0.33	-0.53	<i>C. tropicalis</i>
69	-0.03	0.64	0.17	<i>C. albicans</i> 1
72	-0.45	0.47	-0.32	<i>C. albicans</i> 1
73	-0.27	-0.36	1.02	<i>C. albicans</i> 2
75	0.5	0.13	0.21	<i>C. albicans</i> 1
79	-1.05	-0.06	-0.23	<i>C. glabrata</i>
85	-0.22	-0.06	0.5	<i>C. albicans</i> 1
88	-0.93	-0.15	-0.07	<i>C. albicans</i> 1
91	0.43	0.3	0.45	<i>C. parapsilosis</i>
92	-0.24	0.93	-0.42	<i>C. albicans</i> 1
93	-0.44	-0.39	0.34	<i>C. albicans</i> 1
101	-1.62	-0.48	0.06	<i>C. tropicalis</i>
106	2.05	-1.97	0.24	<i>Saccharomyces</i>
116	1.57	-0.56	-0.36	<i>C. albicans</i> 2
124	-0.76	-0.27	0.49	<i>C. albicans</i> 2
134	-0.51	0.11	-0.4	<i>C. albicans</i> 2
137	-0.95	-0.23	-0.2	<i>C. albicans</i> 1
139	-0.09	0.7	0.06	<i>C. albicans</i> 1
145	-0.16	0.14	0.41	<i>C. glabrata</i>
158	1.03	-0.2	-0.15	<i>C. albicans</i> 1
159	0.59	-0.01	-0.44	<i>C. albicans</i> 2
160	1.15	0.03	-0.18	<i>C. albicans</i> 1
162	-0.04	-0.16	0.16	<i>C. albicans</i> 1
164	-0.16	-0.25	1.09	<i>C. albicans</i> 1
165	-0.51	0.21	-0.43	<i>C. albicans</i> 1
179	0.39	-0.27	-0.64	<i>C. parapsilosis</i>
181	0.16	0.43	0.11	<i>C. tropicalis</i>
183	-0.5	0.51	0.03	<i>C. albicans</i> 1
184	0.03	0.67	0.08	<i>C. tropicalis</i>
186	1.28	-0.44	-0.06	<i>C. albicans</i> 1
189	-0.15	0.59	-0.27	<i>C. tropicalis</i>
193	-0.11	0.3	-0.32	<i>C. albicans</i> 1
197	0.12	0.39	0.13	<i>C. albicans</i> 1

A partir del tratamiento estadístico ACP se grafica utilizando las componentes 1, 2 y 3 porque son las componentes que explican el mayor porcentaje acumulado de la varianza; mientras que las componentes 4 y 5 acumulan un porcentaje menor al 1% lo que las hace menos apropiadas para éste análisis, puesto que no refleja diferencias importantes, por ésta razón solo se presentan los resultados obtenidos a partir de las componentes principales 1 y 2; 2 y 3 (Véase figura 2 y 3) (Naumann *et al*, 2000).

En la gráfica se aprecia una agrupación de datos y la ubicación independiente de un *S. cerevisiae*, que es un microorganismo que suele presentarse en muestras de secreción vaginal y cuyas características micro y macroscópicas son similares al género *Candida*, por lo cual fué identificado con certeza sólo hasta las pruebas bioquímicas (Buscemi *et al* ,2004; Lopes, 2004).

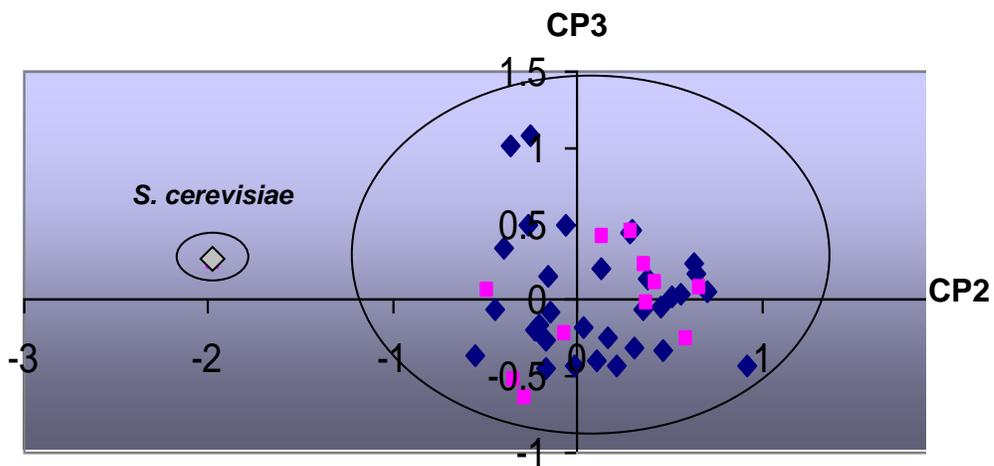
Demostrándose con esto, que la información obtenida de los espectros tomados, permitió evidenciar la diferencia entre espectros de especies de *Candida* y al menos otro género como es el *Saccharomyces*.

ACP fué aplicado utilizando la normalización de los datos del espectro inicial en el rango espectral de 500 - 2200  $\text{cm}^{-1}$  longitud de onda. Se distinguieron dos nubes ubicadas arriba y abajo representando exclusivamente el género *Candida* y *Saccharomyces* respectivamente. Éste resultado puede ser causado por que estos organismos, difieren en sus componentes estructurales y moleculares. Por lo tanto se comprueba que el análisis de componentes principales permite realizar una identificación exacta a nivel de género.



*C. albicans* ▲ *C. no albicans* ◆ *S. cerevisiae* ◇

Figura 3. Componentes principales 1 y 2



*C. albicans* ◆ *C. no albicans* ■ *S. cerevisiae* ◇

Figura 4. Componentes principales 2 y 3

### 3.3 DENDROGRAMA

Se eligió el rango espectral más representativo, de acuerdo al reporte realizado por Naumann en el año 2000, el cual es de  $1900 - 800 \text{ cm}^{-1}$ ; en este rango, para las 44 muestras, no se encontró agrupamientos distintivos entre las diferentes especies (Anexo F); debido a esto se disminuyó el rango de  $1500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  sin obtener una diferenciación de agrupamiento (Anexo G); se disminuyó el número de muestras a 14, dentro de las que se incluyó, un número homogéneo para representar a cada especie en los rangos antes mencionados, en el cual se observó agrupación en algunas especies pero no una agrupación consistente (Anexo H, I).

Debido a la inconsistencia de agrupamiento encontrada en los análisis para los dos grupos de rangos manejados (totales y reducidos), se hizo necesario implementar una estrategia, con la cual se identificaron siete variables representativas del espectro, con las intensidades de absorción más significativas; logrando una representación del rango espectral de  $1900 - 800 \text{ cm}^{-1}$  en un reducido número de valores, teniendo en cuenta los parámetros que se muestran a continuación, es decir los puntos espectrales más representativos (Véase figura 4); la tabla 3 muestra las variables a partir de las cuales se definieron los cocientes de las intensidades donde los puntos más altos incluyen a los más pequeños, la tabla 4 presenta los resultados finales y la figura 5 muestra esquemáticamente la similaridad existente entre las especies.

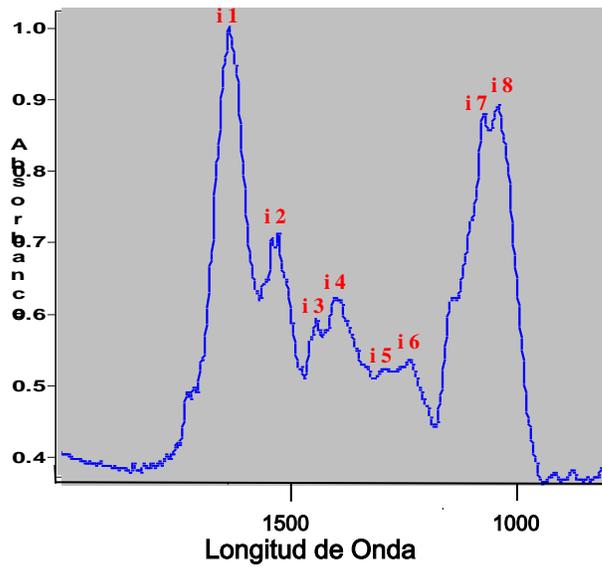


Figura 5. Variables respecto a las intensidades del rango espectral de 1900 - 800  $\text{cm}^{-1}$

Tabla 3. Definición de variables

Variables	Intensidades
1	$i1 / i8$
2	$i8 / i7$
3	$i1 / i2$
4	$i6 / i5$
5	$i4 / i3$
6	$i7 / i6$
7	$i4 / i5$

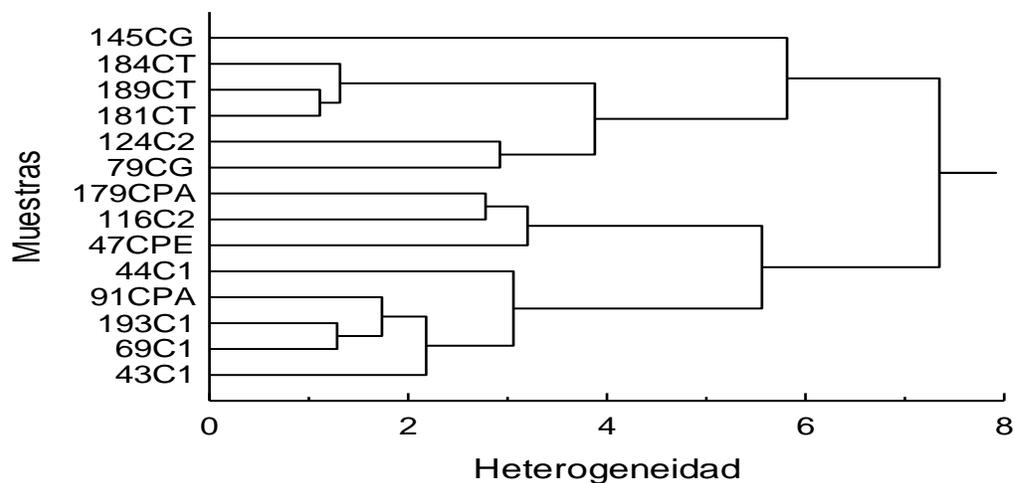
**Tabla 4. Siete variables espectrales de 14 muestras de especies de *Candida***

Variables	Códigos especies de <i>Candida</i>						
	1C1	2C1	3CPE	4C1	5CG	6CPA	7C2
1	1.04	1.04	1.13	1.05	1.21	1.05	1.11
2	1.02	1.03	0.99	1.02	1.02	1.02	1.00
3	1.32	1.36	1.24	1.39	1.47	1.31	1.17
4	1.02	1.05	1.03	1.03	1.06	1.03	1.01
5	0.99	1.06	0.98	1.03	1.04	1.01	1.01
6	1.66	1.53	1.51	1.58	1.6	1.44	1.28
7	1.04	1.04	1.13	1.05	1.21	1.05	1.11

	8C2	9CG	10CPA	11CT	12CT	13CT	14C1
1	1.27	1.38	1.20	1.11	1.16	1.12	1.07
2	0.98	0.97	1.03	0.99	0.98	1.00	1.03
3	1.43	1.27	1.31	1.31	1.33	1.36	1.33
4	1.05	1.05	1.02	1.04	1.05	1.05	1.02
5	1.00	0.95	1.03	1.04	1.02	1.03	1.02
6	1.52	1.48	1.34	1.56	1.58	1.61	1.57
7	1.27	1.38	1.20	1.11	1.16	1.12	1.07

C1: *Candida albicans*1, C2: *Candida albicans*2, CPE: *Candida pelliculosa*, CG: *Candida glabrata*, CPA: *Candida parapsilosis*, CT: *Candida tropicalis*



C1: *Candida albicans*1, C2: *Candida albicans*2, CPE: *Candida pelliculosa*, CG: *Candida glabrata*, CPA: *Candida parapsilosis*, CT: *Candida tropicalis*

**Figura 6. Dendrograma siete variables espectrales de 14 muestras**

En el grupo de datos totales (44), con las siete variables no se obtuvieron resultados satisfactorios, mientras que en el grupo de datos reducidos (14), se presentaron agrupamientos más definidos y aun más estables en las especies *C. tropicalis* y *C. albicans* 1. En el dendrograma se formaron 2 “cluster”, el primero muestra la heterogeneidad entre las especies *C. tropicalis* y *C. glabrata*, el segundo entre las especies *C. albicans* 1, *C. parapsilosis* y *C. pelliculosa*. La especie *C. albicans* 2 no presenta un agrupamiento definido, ya que se encuentra en los dos “clusters”, probablemente por que al ser una variedad de *C. albicans* no se encuentra bien definida su ubicación y tal vez tiene relaciones estructurales y moleculares con las otras especies.

En un estudio realizado por Naumann en el año 2000, se reporta una agrupación directa entre las especies *C. tropicalis* y *C. glabrata*, similar a la presentada en las muestras analizadas en éste trabajo, del mismo modo, se presenta una relación más cercana entre *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, mientras el dendrograma de este estudio, muestra una relación más directa entre *C. albicans* y *C. parapsilosis*, debido probablemente a que ambas comparten características morfológicas similares como la producción de tubos germinativos.

Estos resultados, aunque permitieron obtener una información útil para los objetivos de éste estudio, pudieron variar de la reportada en la literatura debido tal vez a la capacidad del programa utilizado para el análisis, puesto que éste solo permite analizar un limitado número de datos y el espectro arroja un amplio número de ellos.

#### 3.4 ANÁLISIS DE LEY DE POTENCIAS: LEY DE ZIPF

Con base en la Ley de Zipf, numeral 2.6.3, se obtuvieron los valores inversos a X (D) con su respectivo coeficiente de correlación (R), el cual fué mayor de 0.8 para 99.2 % del total de las muestras; encontrando valores próximos a 1 que indican una correlación fuerte y positiva (Anexo J). En los datos obtenidos para D, de las

muestras de las mismas especies en diferentes pacientes, se observaron algunas diferencias que podrían estar relacionadas con la epigénesis de donde fueron aisladas, posiblemente debido a que cada paciente tiene un comportamiento sexual, antecedentes clínicos y hábitos entre otros, que influirían en la expresión diferencial de los genes y por tanto en la expresión fenotípica de los microorganismos.

Se aplicó el análisis al espectro total, que va de 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  para comparar el total con otros rangos. Para lograr un análisis más detallado que permitiera conocer cual es el rango más informativo, éste fue dividido en tres rangos así: 400-1600  $\text{cm}^{-1}$ , 1600 - 2800 y 2800 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; determinando que el rango más estable e informativo, en la identificación de los diferentes fenotipos de *Candida*, es el rango de 400 -1600  $\text{cm}^{-1}$ (cuadro 5) esto debido a que se encontró una distribución entre las especies, similar a la reportada en la literatura por Naumann en el año 2000, en la cual se presenta una relación de similaridad entre la especies *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, que a su vez se asemejan a *C. albicans*, con la diferencia de que *C. glabrata*, en este estudio, no presenta igual similaridad. Lo anterior, debido probablemente a que los datos que se obtuvieron de *C. glabrata*, presentaron inconsistencias ya que su valor D, en el rango de 400 -1600  $\text{cm}^{-1}$ , es mucho más bajo que el dato que se presenta en el rango de 1600 - 2800  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que las demás especies presentan valores D, más homogéneos en estos mismos rangos. Esto podría ser explicado porque el número de muestras pertenecientes a ésta especie fué menor que el obtenido de las demás. El rango más inestable fué 2800 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  en el que se observan grandes diferencias en la dimensión fractal, con respecto a los otros rangos (cuadro 6).

**Cuadro 5. Valores de D en orden descendente en el rango de 400-1600 cm<sup>-1</sup>**

Especies	400-1600 cm <sup>-1</sup>
<i>C. tropicalis</i>	-6.1430337
<i>C. parapsilosis</i>	-6.93683792
<i>C. pelliculosa</i>	-7.23596902
<i>C. albicans 2</i>	-7.38994342
<i>C. albicans 1</i>	-7.49014231
<i>C. glabrata</i>	-8.5575086
<i>S. cerevisiae</i>	-26.452229

**Cuadro 6. Valores “D” en los tres rangos espectrales**

Especies	Rangos espectrales		
	400-1600 cm <sup>-1</sup>	1600-2800 cm <sup>-1</sup>	2800-4000 cm <sup>-1</sup>
<i>C. albicans 1</i>	-7.27198903	-7.21934	-19.769247
<i>C. tropicalis</i>	-6.1430337	-5.352165	-3.35683003
<i>C. albicans 2</i>	-8.49471383	-8.339738	-5.47003645
<i>C. parapsilosis</i>	-6.93683792	-6.243062	-3.80153055
<i>C. glabrata</i>	-8.5575086	-6.106811	-4.06016922
<i>C. pelliculosa</i>	-7.23596902	-7.299307	-5.2446342
<i>S. cerevisiae</i>	-26.452229	-53.357	-24.6216827

Al realizar el promedio total de los rangos espectrales, se obtiene una relación de agrupamiento entre las especies *C. albicans 1* y *2*, *C. pelliculosa* con *C. glabrata* y estas a su vez con *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, resultado consistente con las relaciones de similaridad reportadas por Naumann en el año 2000, en las que hay agrupamiento entre *C. parapsilosis* y *C. glabrata* y estas a su vez con *C. tropicalis* y todas las anteriores con *C. albicans*. *C. pelliculosa* no se encuentra reportada en la literatura y en este estudio se observó una relación de similaridad con *C. glabrata* quizá porque comparte una característica morfológica como lo es la ausencia de pseudohifas (Véase cuadro 7)

**Cuadro 7. Valores “D” en el rango espectral 400-4000 cm<sup>-1</sup>**

Especies	Rango espectral 400-4000 cm <sup>-1</sup>
<i>C. tropicalis</i>	-4.95067628
<i>C. parapsilosis</i>	-5.66047667
<i>C. glabrata</i>	-6.24149622
<i>C. pelliculosa</i>	-6.59330335
<i>C. albicans 2</i>	-6.88760211
<i>C. albicans 1</i>	-11.2976432
<i>S. cerevisiae</i>	-34.8103045

La especie que presenta mayor dimensión fractal es *C. tropicalis* y por lo tanto podría considerarse, como la más compleja de las especies no *albicans* aisladas en éste estudio. Esto podría considerarse debido a que ésta especie ocasionó la sintomatología propia de la infección en mayor porcentaje. Por otra parte, entre las especies no *albicans*, *C. pelliculosa* presentó menor dimensión fractal, probablemente porque se trata de un fenotipo emergente que no ocasiona síntomas en vagina.

#### 4. CONCLUSIONES

En la población estudiada, el 62.7 % presentaron infección vaginal por especies del género *Candida* y el 37.3 % de la población muestra mayor susceptibilidad a desarrollar infección, porque presenta *Candida* spp en forma de esporas (blastosporas) las cuales constituyen el fenotipo para la extensión, diseminación y transmisión sin manifestación de síntomas.

Generalmente la candidiasis vaginal está acompañada de signos y síntomas característicos como: secreción vaginal anormal, prurito y eritema, pero no existe una relación directa entre la sintomatología y la presencia de un fenotipo en particular, lo que indica que un cuadro clínico no determina la presencia de un fenotipo específico.

De la población analizada en éste estudio, las especies aisladas fueron *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, coincidiendo con los hallazgos obtenidos en otros estudios; sin embargo, en este trabajo se aisló *C. pelliculosa* que es una especie que no ha sido reportada para muestras de secreción vaginal y podría tratarse de un fenotipo emergente (Fidel & Sobel, 1996; Okungbowa, 2003).

Del género *Candida* hay varias especies, las más patógenas en éste estudio son *C. albicans* y *C. tropicalis* que coinciden con las halladas en estudios realizados en otros países, según el país puede presentarse una especie diferente, además de las mencionadas, demostrándose la variabilidad de éstas entre las diferentes regiones geográficas del mundo, mostrando la importancia para saber qué microorganismo predomina en una zona, ya que no todos los fenotipos de

*Candida spp* responden de igual forma a los tratamientos habituales (Buitron, 2002).

Existen varios métodos de análisis estadístico que permiten caracterizar especies de microorganismos, a partir de datos obtenidos de espectros por FTIR (Naumann *et al*, 2002); la utilización del análisis por “componentes principales” de las muestras de *Candida spp* de secreción vaginal, produjo una clasificación consistente a nivel de género, mostrándose como una herramienta efectiva, que permitió crear un patrón comparativo en el momento de diferenciar microorganismos, ya que podrían encontrarse otros hongos levaduriformes como *Saccharomyces* y *Rhodotorula*.

*Saccharomyces cerevisiae* no hace parte de la flora normal de la vagina, aunque en algunos estudios ha sido reportado su aislamiento en secreción vaginal (Buscemi *et al*, 2004); el crecimiento de las levaduras es macro y microscópicamente similar, lo cual puede ocasionar falsos positivos en el momento de llevar a cabo una identificación, como sucedió en este estudio en el que se definió el género de este microorganismo sólo hasta que se realizaron las pruebas bioquímicas, lo cual hace necesario implementar nuevas herramientas de identificación mas eficientes en cuanto a sensibilidad, tiempo y costos.

Con la clasificación representada en el análisis de “clusters” (dendrograma), no se obtuvo un resultado de agrupamiento consistente, puesto que las especies que son similares bioquímicamente, como en el caso de *C. albicans* 1 y 2, se distribuyen en “clusters” diferentes, por lo que se hizo necesario utilizar algunas estrategias estadísticas para mejorar el agrupamiento, sin embargo a pesar de las estrategias, se concluye que es conveniente utilizar un programa que permita analizar un gran número de datos como los que se obtienen a partir del espectro infrarrojo.

Los datos obtenidos a partir de FTIR proveen una gran cantidad de información, por lo que se utilizó un análisis por Ley de Zipf, mediante el cual fué posible

caracterizar fenotípicamente las especies de *Candida* al lograr analizar el grado de complejidad entre los espectros de las diferentes especies, permitiendo una clasificación acorde a la reportada por Naumann en el año 2000, demostrando que el análisis por Ley de Zipf es una nueva herramienta aplicable a los estudios para clasificación.

## 5. RECOMENDACIONES

Ampliar estudios en este campo, con el propósito de implementar las técnicas utilizadas, para mejorar la eficiencia en la identificación de microorganismos de importancia clínica en pro de la comunidad en general.

Para el análisis de “*clusters*” (dendrogramas), se hace necesario contar con programas más avanzados que permitan el manejo de un mayor número de datos.

Implementar el análisis de potencias por ley de Zipf, como herramienta para estudios de clasificación de microorganismos, ya que esta provee un análisis de información consistente.

## BIBLIOGRAFIA

AXTELL, Robert L. Zipf Distribution of U.S. Firm Sizes 7 SEPTEMBER 2001 VOL 293 SCIENCE [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

BARRENETXEA Gorka. Vulvovaginitis candidiásica. Revista Iberoamericana de Micología, Clínica Quirón Bilbao y Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Vizcaya, España, 2002. 19 p.22-24.

BLACKWELL M. Introductory Mycology. Fourth edition. EEUU, 1996.

BUITRÓN, Rafael et al Estudio de especies de *Candida* no *albicans* y su relación con candidiasis vulvovaginal recurrente. Ginecología y Obstetricia México, 2002. Vol. 70(9) p.431-436.

BURGOS, Javier y MORENO, Pedro. Zipf - scaling behavior in the immune system. Biosystems. Colombia: Elsevier Science, 1996.

BUSCEMI Luis; ARECHAVALA, Alicia y NEGRONI, Ricardo. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. Revista Iberoamericana de Micología, Unidad de Micología y Unidad Bacteriología, Buenos Aires Argentina, 2004. 21: p.177-181

CASAL M y LINARES MJ. Comparations of six media for production of chlamidospore by *Candida albicans*. Mycopathologia, 1981. p.125-128.

DOUGLAS, Julia. Medical Importante of Biofilms in *Candida* Infections. [en línea]. Revista Iberoamericana de Micología. División de infecciones e inmunidad, Universidad de Glasgow, 2002.

ELLIS, David; BROADHURST, David y KELL, Douglas. Rapid and Quantitative Detection of Microbial Spoilage of Meat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Machine Learning. [en línea]. American Society for Microbiology. , 2002. Vol 68, N° 6.

FARINATI, Alicia. Candidiasis vulvovaginal. [en línea]. Gineconet.com, 2001.

FERRER, Javier. Vaginal Candidiasis: epidemiological and etiological factors. International Journal of Gynecology & Obstetrics, Chair and Service of Obstetrics and Gynecology, Hospital Central de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain, 2000.

FIDEL, Paul y SOBEL, Jack. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clinical Microbiology Reviews. Division of infectious diseases, Wayne State University School of medicine, Detroit, Michigan, 1996. p.335-348.

FRIDKIN, Scout K y JARVIS, Wuilliam. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. [en línea] American Society for Microbiology, Clinical Microbiology Reviews, 1996. Vol. 9, N°4.

GUARRO, Joseph, GENE, Josepa y STCHIGEL, Alberto developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews. Unitat de Microbiología, Universitat Rovira I Virgili Spain, 1999. p.454-500.

Incidencia de las Infecciones Cérvico-Vaginales en Pacientes de consulta externa en el Hospital Univalle [medline]. Unidad de Ginecología y Obstetricia Hospital Universitario Univalle Departamento de Ciencias Médicas Universidad del Valle, 2002. Disponible en Internet:  
<http://www.univalle.edu/investigacion/journal/journal9/pag5.htm>

Infección vaginal por *Candida* [medline]. VeriMed Healthcare Network: Universidad de Pensilvania, centro medico de Filadelfia, 2002. Disponible en Internet:  
<http://www.buenasalud.com/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=3395&ReturnCatID=4>.

ISSLER J. Infecciones del tracto genital inferior. Revista de Postgrado de la Cátedra Via Medicina N° 102, 2001. p.21-38.

KIRSCHNER, C y D. Naumann, FT-IR Microscopy: A Rapid Method for Classifying Microorganisms. Spectroscopy of Biological Molecules, 1999. p.557-558.

KNEIPP, Janina; BEEKES, Michael y NAUMANN, Dieter. Molecular Changes of Preclinical Scrapie can be Detected by Infrared Spectroscopy. [en línea] . Society for Neuroscience. The Journal of Neuroscience, 2002. Vol 22(8).

KONEMAN, Elmer. Diagnostico microbiológico. Buenos Aires. Panamericana, 1983. p.437.

LENNETTE, Edwin. Microbiología Clínica. 3 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1982. 1237p.

LIN W. and YANING Yang Z. (2002) Zipf 's Law in Importance of Genes for Cancer Classification Using Microarray Data. J. Theor. Biol. 219 p.539-551.

LINARES María José y SOLÍS Francisco. Identificación de levaduras. Revista Iberoamericana de Micología, España. 2001. p. 1-18.

LÓPEZ, Emilio y PÉREZ, Gonzalo. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenético. [medline]. Universidad de Alcalá. 1999. Disponible en internet: <http://entomologia.rediris.es/index.htm>.

LOPES, Márcia et al Correlation of species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Revista Iberoamericana de Micología, 2004. p.202-205

LLORENTE, Jose. La micosis o infecciones por Hongos. [en línea] , MK 3 S.L. © 2003, Dsalud.com.

MANDELBROT, B. (1988). *Los objetos fractales*. Tusquets editores. Barcelona.

MANTSCH, Henry. Vibrational Spectroscopy an Medicina: an alliance in making. [en línea]. Elsevier Science. Vibrational Spectroscopy. [www.elsevier.com/locate/vibspec](http://www.elsevier.com/locate/vibspec), 2002.

MAQUELIN, K. et al Vibracional Spectroscopic Studies of Microorganisms. Handbook of Vibrational Spectroscopy, p. 1-27, 2002.

MARGALEF, Ramon. Ecología. Ediciones Omega. Barcelona, 1982.

MOREIRO, Antonio. Aplicaciones al análisis automático del contenido provenientes de la teoría matemática de la información: [en línea], anales de documentación N ° 5, 2002, p. 273-286.

NAUMANN, Dieter et al. Classification and identification of enterococci a comparative phenotypic, Genotypic, and Vibracional spectroscopic Study. [en línea] . American Society for Microbiology. Journal of Clinical Microbiology, 2002. Vol.41, N°1.

----- Infrared Spectroscopy and Infrared Microscopy - New Diagnostic Potentials for Microbiological Analysis. Biotec '94 Tagungsband, S. 30 1995.

-----Infrared Spectroscopy in Microbiology. Enciclopedia of Analytical Chemistry. [en línea] , Ed. R.A. Meyers, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000. p. 102 -131

OKUNGBOWA, Francisca. The distribution frequency of *Candida* species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. Rev Iberoam Micol, 2000. p.360-63

ORSINI, F; VILLA, A, AMI, D y DOGLIA, S. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. [en línea]. Elsevier Science. Journal Microbiology Methods, 2000.

<http://fisica.bicocca.mi.infn.it/it/ricerca/homepages/BIOFIS/snb2002/doglia.pdf>

PANIZZO, María Mercedes; PÉREZ, Carmen y MANISCALCHI, María Teresa. Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida* sp. y serotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y recurrente. Departamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas. 1999.

PRADO HOYOS, Carlos Andrés. Análisis de degradación del ADN por FT-IR con aplicación potencial a las ciencias forenses. 2004. Trabajo de grado. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

¿Puede *Candida* más que la ciencia? [medline]. Copyright 2000-2002 Bibliomed Holdings LLC. Disponible en Internet:

<http://www.medicina.unal.edu.co/ist/revistasp/v2n1/rev17:htm>.

REISS, Erol y MORRISON, Christine. Nonculture Methods for Diagnosis of Disseminated Candidiasis. [en línea]. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology, Vol.6, N°4. 1993.

SANDT, D; SOCKALINGUM, TOUBAS, D y AUBERT, D. FTIR Spectroscopy as a tool for typing microorganisms. [en línea]. Laboratorio de Parasitología-micología. Francia.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12324312&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12324312&dopt=Abstract)

SANDT, C *et al.* Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for Typing of *Candida albicans* Strains Isolated in Intensive Care Units. American Society for Microbiology Journal of Clinical Microbiology, 2003. 41 (3) p.954-959.

SKOOG, Douglas. Análisis Instrumental. 4 ed. Madrid. McGraw-Hill, 1994. 908p.

SOSA, Lucio Manuel. Revisión *Candida albicans*. Universidad Central de Venezuela. 2001

STANIER Roger; ADELBERG, Edward e INGRAHAM Jhon. Microbiología. 4 ed. Barcelona: Reverté, 1984. 820p.

THINGO, N; KIRSCHNER Y NAUMANN, D. FTIR Microspectrometry: A New Tool for Characterizing Micro-organisms. [en línea]. Robert Koch-Institute, Berlin, Germany. <http://midas.rki.de/workshop/poster02.html>. 2000.

TIMMINS, Eadaoin; ALSBERG, Bjorn y GOODACRE, Royston. "et al."Rapid Differentiation of Closely Related *Candida* Species and Strains by Pirolysis-Mass spectrometry and Fourier Transform- Infrared spectroscopy. [en línea]. American Society for Microbiology. Journal of Clinical Microbiology. 1998.

TINTELNOT, Kathrin et al. Evaluation of phenotyp. Marked for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*. [en línea]. American Society for Microbiology.. Journal of Clinical Microbiology. Vol 38, Nº 4, 2000.

VARGASA, J.M., STEPHENS C. R., WAELBROECKB H. y ZERTUCHEC Federico (1999). Symmetry breaking and adaptation: evidence from a `toy model' of a virus. BioSystems

VREESWIJK VAN et al. Prospective Study on the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal pathogens Recovered from Blood Cultures. [en línea]. American Society for Microbiology.. Journal of Clinical Microbiology. Vol 4, Nº1, 2003.

WENNING M, SEILER H y SCHERER S. Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. [PubMed indexed for Medline] . Appl Environ Microbiol V. 68 Nº 10, 2002.

ZIPF, George K. Human behavior and the pinciple of least effort. 1949.

## ANEXO

### Anexo A. Consentimiento Informado

PROYECTO DE INVESTIGACION: **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE ESPECIES DE *Candida* AISLADOS DE MUESTRAS DE SECRECIÓN VAGINAL**

Universidad del Cauca

Usted esta siendo invitada a participar en un estudio llevado a cabo por estudiantes de la Universidad del Cauca. El estudio será realizado de Julio a Octubre de 2004. Con los objetivos de caracterizar fenotípicamente especies de *Candida* aislados de muestras de secreción vaginal, determinar susceptibilidad a la colonización y patogenicidad por estas especies en la población estudio y Construir un dendrograma para determinar parentescos entre los diferentes fenotipos de *Candida*. Por tanto con el presente documento escrito se pretende informar a usted acerca del procedimiento que se le practicará.

**JUSTIFICACION:** la candidiasis es una infección que aparece cuando el equilibrio entre los microorganismos que normalmente habitan en la vagina se pierde y la población de *Candida* aumenta en relación con la de los otros microorganismos. El conocimiento de la incidencia de las diferentes especies de *Candida* en la población a estudiar permitirá llevar a cabo medidas preventivas y de control, y de ésta manera contribuirán a mejorar la calidad de vida de la población.

**PROCEDIMIENTO:** Se tomara una muestra de exudado vaginal, procedimiento de riesgo mínimo, para realizar un cultivo en la búsqueda de la presencia de alguna especie perteneciente al género *Candida*.

**RIESGOS:** La participación en el estudio no le representa riesgo, pues la toma de la muestra se realizara por personal capacitado en esta actividad.

**BENEFICIOS:** Si el resultado es positivo para *Candida*. El medico tratante la evaluara y le podrá iniciar tratamiento farmacológico adecuado para la especie de *Candida* especifica además recibirá un seminario de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por infecciones por *Candida*.

**GARANTIA DE RECIBIR RESPUESTA A CUALQUIER PREGUNTA:** Si usted tiene alguna pregunta o reclamo puede comunicarse con el medico que lo entiende en la entidad.

**CONFIDENCIALIDAD:** El resultado de su examen citológico será anexado a su historia clínica. Escriba SI o NO en el espacio en blanco: se me ha informado en un lenguaje claro y sencillo\_\_\_\_\_. También comprendo que en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo solicitar la revocación de este consentimiento y eximir al doctor e investigador de mi atención. Por ello, manifiesto que estoy satisfecha con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos explicados.

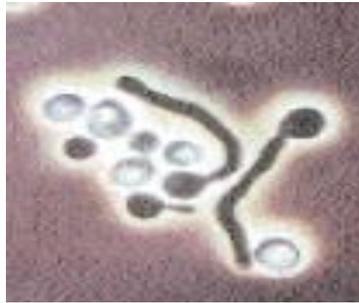
**DECLARAN:** Que el doctor: \_\_\_\_\_ identificado con CC. No \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ con registro medico No: \_\_\_\_\_ me ha explicado y suministrado la siguiente información sobre la toma de la muestra para el examen citológico para la identificación de especies del género *Candida*.

En tales condiciones **ACEPTO:** Firma paciente \_\_\_\_\_

Firma medico \_\_\_\_\_

Firmado en la ciudad de \_\_\_\_\_ a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Anexo B. Microfotografía tubos germinativos *Candida spp***



(Tomada: Identificación de levaduras. Linares, 2001)

## Anexo C. Protocolo y resultados de la identificación Bioquímica de las especies de *Candida*

### API 20C AUX

#### Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
2. Transferir 100 µl (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar evitando la formación de burbujas.
3. Llenar las cúpulas con la suspensión anterior evitando la formación de burbujas y creando un nivel horizontal para generar resultados correctos.
4. Incubar a 30 °C durante 48-72 h.

#### Lectura e interpretación

Se observó el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el control indica una reacción positiva que se anotó en la hoja de resultados. En esta última, los diferentes nutrientes están separados en grupos de tres y se adjudicó a cada uno, en caso de ser positivo, un valor diferente: 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar. Sumando cada triplete se obtuvo un número de siete cifras que constituyó el perfil numérico. La identificación se realizó mediante el Programa Informático de Identificación suministrado por Biomerieux. Los resultados que se obtuvieron en éste estudio se presentan en una tabla a continuación.

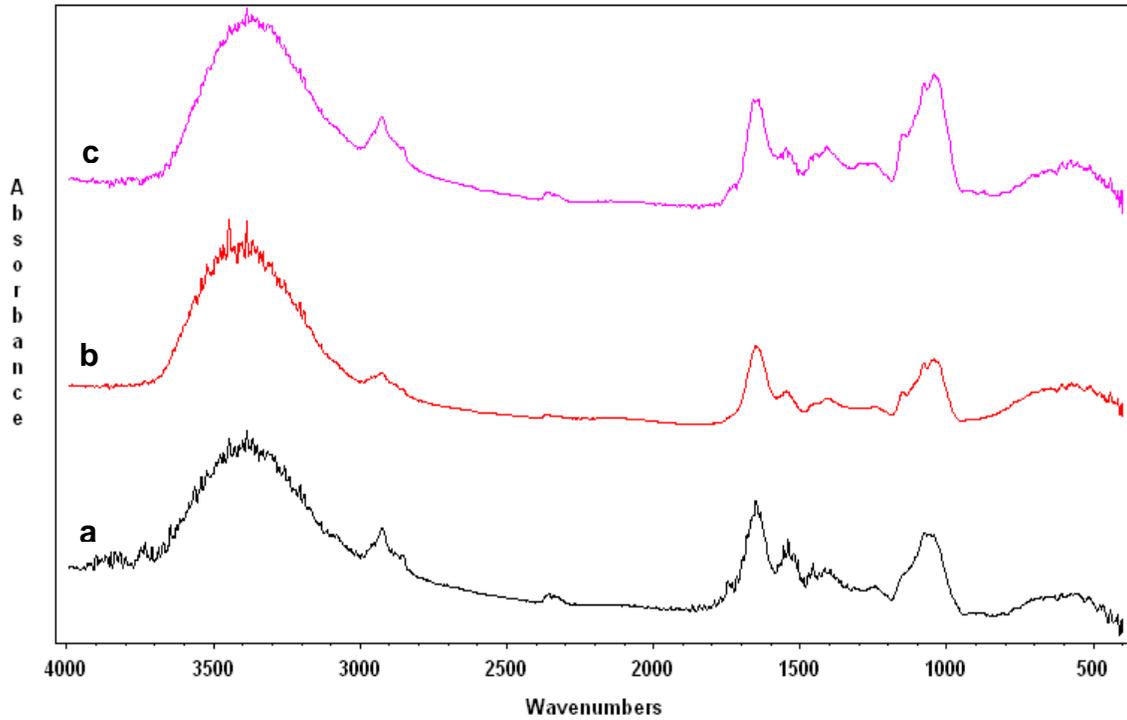
### Hoja de resultados

<b>api® 20C AUX</b>	CE 07221 C	REF. : _____ / _____ / _____ Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :	 BIOMÉRIEUX																																																														
48 h	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td> </tr> </table>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	72 h	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td><td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">-</td><td style="text-align: center;">+</td> </tr> </table>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+																				
-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+																																													
-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+																																													
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">GLU</td><td style="text-align: center;">GLY</td> <td style="text-align: center;">2KG</td><td style="text-align: center;">ARA</td><td style="text-align: center;">XYL</td> <td style="text-align: center;">ADO</td><td style="text-align: center;">XLT</td><td style="text-align: center;">GAL</td> <td style="text-align: center;">INO</td><td style="text-align: center;">SOR</td><td style="text-align: center;">MDG</td> <td style="text-align: center;">NAG</td><td style="text-align: center;">CEL</td><td style="text-align: center;">LAC</td> <td style="text-align: center;">MAL</td><td style="text-align: center;">SAC</td><td style="text-align: center;">TRE</td> <td style="text-align: center;">MLZ</td><td style="text-align: center;">RAF</td><td style="text-align: center;">Hyphae/ Pseudo- Hyphae</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">2</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">5</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">6</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">6</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">1</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">7</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">4</td> </tr> </table>	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphae/ Pseudo- Hyphae	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	2			5			6			6			1			7			4			Imprimé en France / Printed in France
0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphae/ Pseudo- Hyphae																																													
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4																																													
2			5			6			6			1			7			4																																															
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :												Ident. / Ταυτοποίηση : <b>165</b>																																																					

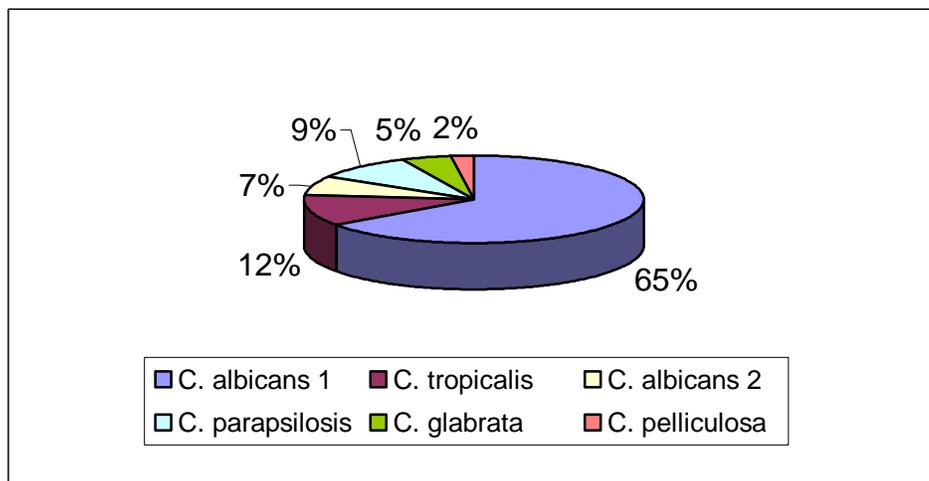
## Resultados identificación bioquímica de las especies de Candida

Código de identificación	Especies
2576174	<i>C. albicans</i> 1
6776175	<i>C. parapsilosis</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1
6576174	<i>C. albicans</i> 1
2176174	<i>C. albicans</i> 1
2566174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1
6444134	<i>C. pelliculosa</i>
2476174	<i>C. albicans</i> 1
2556174	<i>C. tropicalis</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2566174	<i>C. albicans</i> 1
2542134	<i>C. albicans</i> 2
6576170	<i>C. albicans</i> 1
2000040	<i>C. glabrata</i>
6546174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2756135	<i>C. parapsilosis</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2542174	<i>C. tropicalis</i>
2000034	<i>S. cerevisiae</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 2
2542134	<i>C. albicans</i> 2
2542134	<i>C. albicans</i> 2
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2576170	<i>C. albicans</i> 1
2000044	<i>C. glabrata</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2542034	<i>C. albicans</i> 2
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2566174	<i>C. albicans</i> 1
2566174	<i>C. albicans</i> 1
6656175	<i>C. parapsilosis</i>
2542174	<i>C. tropicalis</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2552174	<i>C. tropicalis</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2542174	<i>C. tropicalis</i>
2576174	<i>C. albicans</i> 1
2576174	<i>C. albicans</i> 1

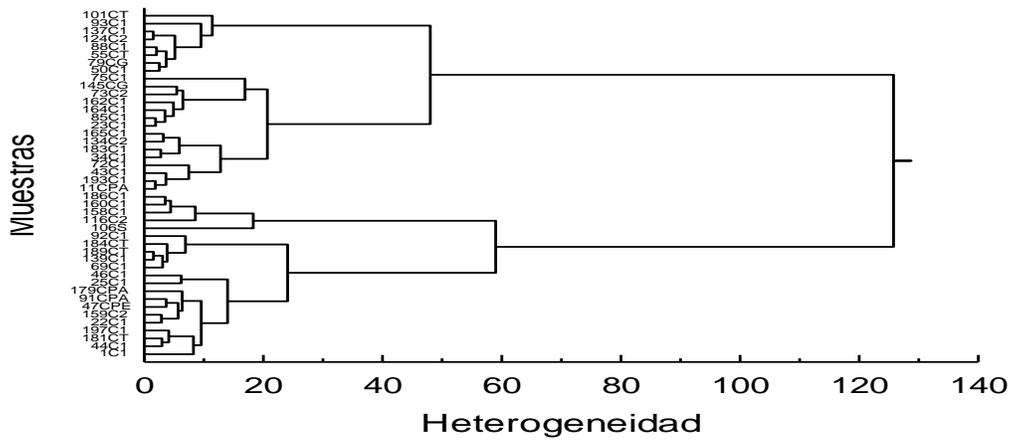
**Anexo D. Espectros infrarrojo (a) *C. albicans* 1, (b) *C. parapsilosis*, (c) *C. tropicalis*.**



**Anexo E. Especies de *Candida* y su frecuencia en la población**

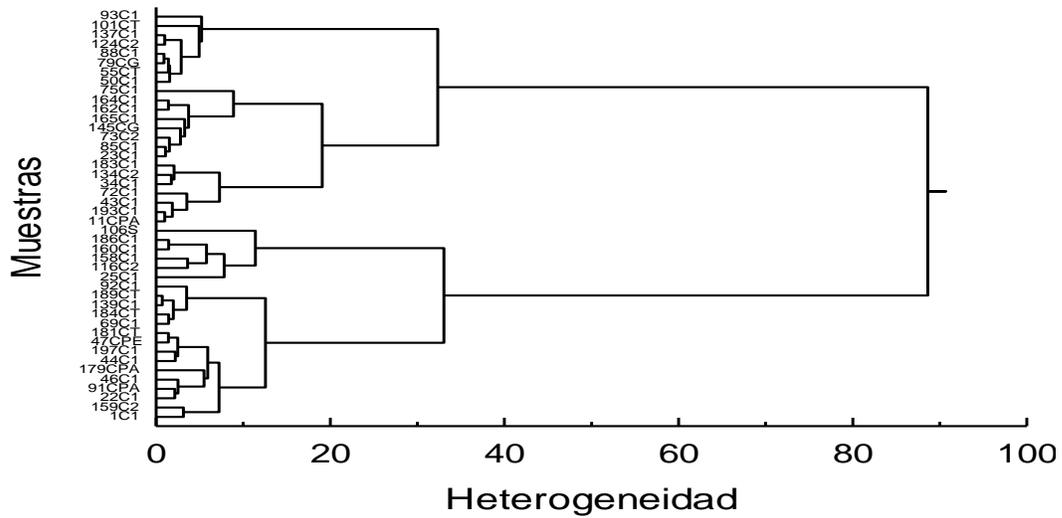


### Anexo F. Dendrograma rango espectral entre 1900- 800 $\text{cm}^{-1}$ de 44 muestras



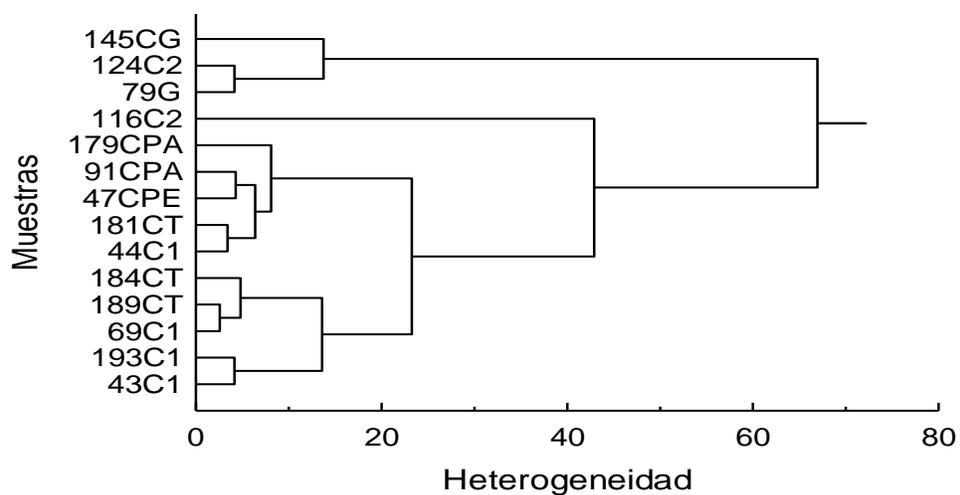
C1: *Candida albicans* 1, C2: *Candida albicans* 2, CPE: *Candida pelliculosa*, CG: *Candida glabrata*, CPA: *Candida parapsilosis*, CT: *Candida tropicalis*

### Anexo G. Dendrograma rango espectral entre 1500-1000 $\text{cm}^{-1}$ de 44 muestras



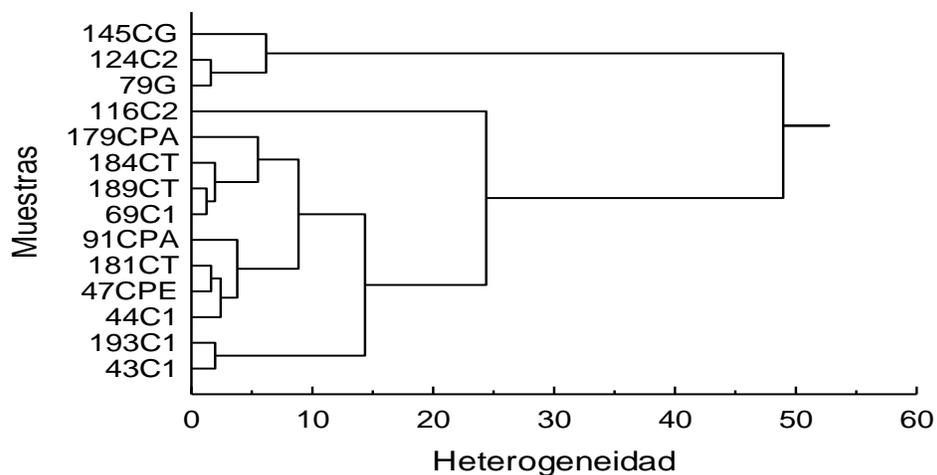
C1: *Candida albicans* 1, C2: *Candida albicans* 2, CPE: *Candida pelliculosa*, CG: *Candida glabrata*, CPA: *Candida parapsilosis*, CT: *Candida tropicalis*

**Anexo H. Dendrograma rango espectral entre 1900 - 800 cm<sup>-1</sup> de 14 muestras.**



C1: *Candida albicans* 1, C2: *Candida albicans* 2, CPE: *Candida pelliculosa*, CG: *Candida glabrata*, CPA: *Candida parapsilosis*, CT: *Candida tropicalis*

**Anexo I. Dendrograma rango espectral entre 1500-1000 cm<sup>-1</sup> de 14 muestras.**



C1: *Candida albicans* 1, C2: *Candida albicans* 2, CPE: *Candida pelliculosa*, CG: *Candida glabrata*, CPA: *Candida parapsilosis*, CT: *Candida tropicalis*

**Anexo J. Dimensión fractal “D”, Coeficiente de Determinación (R<sup>2</sup>) y Coeficiente de Correlación (R)**

Muestras	400-1600 cm <sup>-1</sup>			1600-2800 cm <sup>-1</sup>			2800-4000 cm <sup>-1</sup>		
	D	R <sup>2</sup>	R	D	R <sup>2</sup>	R	D	R <sup>2</sup>	R
<i>C. albicans</i> 1	-3.337	0.242	0.492	-6.262	0.95	0.975	-3.761	0.784	0.885
	-10.22	0.681	0.825	-8.803	0.903	0.95	-4.039	0.893	0.945
	-5.747	0.923	0.96	-6.262	0.95	0.975	-3.761	0.784	0.885
<i>C. albicans</i> 1	-7.262	0.788	0.888	-5.596	0.959	0.979	-3.498	0.864	0.929
	-6.549	0.836	0.914	-6.406	0.936	0.967	-2.181	0.887	0.942
	-7.782	0.903	0.95	-7.605	0.963	0.981	-4.789	0.798	0.893
<i>C. albicans</i> 1	-6.435	0.73	0.854	-6.333	0.937	0.968	-1.828	0.862	0.929
	-5.643	0.796	0.892	-3.846	0.961	0.98	-2.246	0.935	0.967
	-7.502	0.814	0.902	-5.907	0.966	0.983	-3.965	0.798	0.893
<i>C. albicans</i> 1	-6.39	0.882	0.939	-6.196	0.938	0.969	-4.261	0.808	0.899
	-9.506	0.872	0.934	-10.17	0.963	0.981	-6.897	0.817	0.904
	-5.602	0.859	0.927	-5.935	0.928	0.963	-4.38	0.799	0.894
<i>C. albicans</i> 1	-9.32	0.699	0.836	-9.911	0.934	0.966	-3.014	0.832	0.912
	-6.676	0.771	0.878	-5.797	0.954	0.977	-2.051	0.856	0.925
	-5.288	0.886	0.941	-4.196	0.934	0.966	-3.126	0.787	0.887
<i>C. albicans</i> 1	-6.969	0.886	0.941	-7.364	0.975	0.987	-5.219	0.811	0.9
	-5.362	0.896	0.947	-5.168	0.963	0.981	-3.794	0.811	0.9
	-7.893	0.911	0.954	-9.737	0.961	0.98	-5.959	0.828	0.91
<i>C. albicans</i> 1	-6.072	0.911	0.954	-5.155	0.935	0.967	-3.555	0.78	0.883
	-9.506	0.68	0.825	-8.058	0.904	0.951	-1250	0.701	0.837
	-6.562	0.832	0.912	-5.155	0.935	0.967	-3.843	0.828	0.91
<i>C. albicans</i> 1	-7.133	0.835	0.914	-6.623	0.968	0.984	-4.907	0.808	0.899
	-9.183	0.898	0.947	-9.416	0.937	0.968	-6.988	0.814	0.902
	-6.766	0.879	0.938	-7.128	0.937	0.968	-5.131	0.816	0.903
<i>C. albicans</i> 1	-5.988	0.862	0.928	-4.662	0.959	0.979	-3.239	0.808	0.899
	-5.152	0.884	0.94	-4.212	0.953	0.976	-3.008	0.827	0.909
	-8.547	0.9	0.949	-8.873	0.965	0.982	-5.817	0.812	0.901
<i>C. albicans</i> 1	-6.653	0.782	0.884	-6.84	0.943	0.971	-2.48	0.795	0.892
	-7.663	0.791	0.889	-6.068	0.966	0.983	-3.531	0.814	0.902
	-5.79	0.89	0.943	-4.815	0.949	0.974	-3.421	0.778	0.882
<i>C. albicans</i> 1	-5.471	0.919	0.959	-5.013	0.929	0.964	-2.818	0.775	0.88
	-5.131	0.913	0.955	-4.973	0.958	0.979	-2.504	0.896	0.947
	-8.026	0.804	0.896	-6.897	0.946	0.972	-4.049	0.823	0.907
<i>C. albicans</i> 1	-13.57	0.915	0.956	-10.68	0.946	0.973	-5.643	0.807	0.898
	-13.57	0.915	0.956	-20.58	0.922	0.96	-14.16	0.718	0.847
	-5.974	0.838	0.915	-20.58	0.922	0.96	-14.16	0.718	0.847
<i>C. albicans</i> 1	-14.6	0.726	0.852	-10.6	0.932	0.966	-5.429	0.815	0.903
	-8.097	0.811	0.901	-10.6	0.932	0.966	-5.429	0.815	0.903
	-6.406	0.82	0.906	-6.369	0.968	0.984	-4.186	0.805	0.897
<i>C. albicans</i> 1	-6.406	0.82	0.906	-5.266	0.968	0.984	-3.488	0.854	0.924
	-6.15	0.869	0.932	-5.216	0.955	0.977	-3.267	0.815	0.903
	-6.15	0.869	0.932	-5.216	0.955	0.977	-3.267	0.815	0.903

<i>C. albicans</i> 1	-6.452	0.894	0.946	-5.179	0.972	0.986	-3.579	0.801	0.895
	-6.135	0.819	0.905	-4.318	0.937	0.968	-2.081	0.913	0.956
	-4.993	0.908	0.953	-8.137	0.932	0.965	-2.973	0.76	0.872
<i>C. albicans</i> 1	-9.56	0.733	0.856	-8.137	0.932	0.965	-4.525	0.822	0.906
	-7.794	0.839	0.916	-6.766	0.957	0.978	-4.297	0.801	0.895
	-9.662	0.778	0.882	-7.734	0.965	0.982	-4.645	0.812	0.901
<i>C. albicans</i> 1	-7.669	0.764	0.874	-7.369	0.942	0.971	-1.964	0.835	0.914
	-8.606	0.787	0.887	-6.365	0.942	0.97	-7.112	0.713	0.844
	-6.812	0.713	0.844	-5.886	0.956	0.978	-1.895	0.858	0.926
<i>C. albicans</i> 1	-5.9	0.891	0.944	-5.33	0.918	0.958	-3.367	0.813	0.901
	-9.728	0.892	0.944	-10.05	0.927	0.963	-5.274	0.809	0.899
	-5.495	0.909	0.953	-4.751	0.907	0.952	-2.986	0.792	0.89
<i>C. albicans</i> 1	-8.857	0.773	0.879	-7.199	0.968	0.984	-4.675	0.803	0.896
	-6.207	0.857	0.926	-4.909	0.942	0.971	-3.324	0.815	0.903
	-11.21	0.697	0.835	-9.208	0.952	0.976	-4.525	0.812	0.901
<i>C. albicans</i> 1	-5.444	0.855	0.925	-4.052	0.952	0.976	-2.748	0.897	0.947
	-5.543	0.896	0.947	-4.566	0.914	0.956	-3.37	0.784	0.885
	-6.349	0.887	0.942	-5	0.908	0.953	-3.398	0.798	0.893
<i>C. albicans</i> 1	-8.326	0.913	0.955	-8.525	0.935	0.967	-5.225	0.808	0.899
	-12.92	0.826	0.909	-16.29	0.98	0.99	-10.32	0.82	0.905
	-8.482	0.911	0.954	-8.143	0.924	0.961	-5.42	0.8	0.895
<i>C. albicans</i> 1	-12.42	0.819	0.905	-9.97	0.962	0.981	-5.531	0.81	0.9
	-8.084	0.845	0.919	-6.662	0.951	0.975	-4.662	0.799	0.894
	-8.265	0.88	0.938	-7.698	0.949	0.974	-5.787	0.804	0.897
<i>C. albicans</i> 1	-8.251	0.892	0.945	-7.587	0.943	0.971	-5.198	0.804	0.897
	-14.35	0.786	0.886	-11.19	0.96	0.98	-5.848	0.81	0.9
	-9.174	0.78	0.883	-6.831	0.962	0.981	-4.252	0.804	0.897
<i>C. albicans</i> 1	-6.057	0.871	0.933	-5.531	0.944	0.972	-3.493	0.864	0.929
	-7.391	0.805	0.897	-7.782	0.96	0.98	-2.444	0.883	0.94
	-6.293	0.848	0.921	-5.206	0.934	0.966	-3.593	0.817	0.904
<i>C. albicans</i> 1	-8.019	0.905	0.951	-8.503	0.947	0.973	-5.283	0.819	0.905
	-4.876	0.909	0.953	-4.29	0.937	0.968	-3.059	0.782	0.884
	-5.233	0.894	0.945	-4.529	0.932	0.966	-3.241	0.8	0.894
<i>C. albicans</i> 1	-7.21	0.859	0.927	-7.88	0.977	0.988	-5.531	0.813	0.902
	-7.018	0.859	0.927	-6.196	0.975	0.987	-4.405	0.809	0.899
	-9.399	0.891	0.944	-9.302	0.944	0.972	-6.207	0.82	0.905
<i>C. albicans</i> 1	-6.305	0.888	0.942	-7.663	0.935	0.967	-4.789	0.814	0.902
	-5.522	0.897	0.947	-4.973	0.973	0.986	-3.493	0.811	0.9
	-6.109	0.897	0.947	-5.663	0.942	0.971	-3.747	0.806	0.898
<i>C. albicans</i> 1	-6.2	0.897	0.947	-6.378	0.919	0.958	-3.609	0.797	0.893
	-6.113	0.909	0.953	-5.757	0.909	0.954	-3.748	0.796	0.892
	-6.707	0.911	0.955	-6.906	0.915	0.957	-4.218	0.807	0.898
<i>C. albicans</i> 2	-10.64	0.827	0.909	-15.11	0.979	0.989	-9.058	0.829	0.911
	-11.39	0.806	0.898	-14.43	0.973	0.986	-8.032	0.816	0.903
	-8.826	0.88	0.938	-10.22	0.966	0.983	-7.163	0.817	0.904
<i>C. albicans</i> 2	-7.252	0.738	0.859	-6.12	0.948	0.974	-3.17	0.846	0.92
	-6.54	0.823	0.907	5.3533	0.966	0.983	-3.724	0.814	0.902
	-6.653	0.791	0.889	-5.663	0.961	0.981	-3.526	0.85	0.922
<i>C. albicans</i> 2	-12.08	0.87	0.933	-14.06	0.972	0.986	-8.842	0.811	0.901

	-6.743	0.921	0.96	-8.197	0.942	0.97	-4.677	0.815	0.903
	-10.7	0.843	0.918	-11.49	0.956	0.978	-5.821	0.804	0.896
<i>C. albicans 2</i>	-5.11	0.862	0.928	-4.669	0.973	0.986	-2.591	0.941	0.97
	-7.542	0.82	0.906	-7.174	0.951	0.975	-4.433	0.811	0.9
	-4.726	0.879	0.937	-4.156	0.974	0.987	-1.889	0.894	0.946
<i>C. Tropicalis</i>	-7.097	0.799	0.894	-6.579	0.949	0.974	-3.313	0.814	0.902
	-5.855	0.881	0.939	-5.081	0.912	0.955	-2.729	0.804	0.897
	-5.855	0.881	0.939	-5.081	0.912	0.955	-2.729	0.804	0.897
<i>C.tropicalis</i>	-6.671	0.901	0.949	-6.12	0.925	0.962	-4.06	0.8	0.895
	-6.242	0.906	0.952	-5.9	0.927	0.963	-3.774	0.805	0.897
	-5.605	0.907	0.952	-5.152	0.918	0.958	-3.666	0.792	0.89
<i>C.tropicalis</i>	-5.698	0.898	0.947	-4.76	0.915	0.957	-3.429	0.783	0.885
	-6.254	0.823	0.907	-5.258	0.969	0.984	-4.17	0.797	0.893
	-7.553	0.759	0.871	-6.901	0.955	0.977	-4.209	0.864	0.93
<i>C.tropicalis</i>	-8.439	0.73	0.854	-7.062	0.95	0.975	-2.687	0.945	0.972
	-5.553	0.9	0.949	-4.645	0.906	0.952	-3.133	0.781	0.884
	-6.631	0.815	0.903	-5.938	0.974	0.987	-4.322	0.809	0.9
<i>C.tropicalis</i>	-4.704	0.882	0.939	-3.452	0.926	0.962	-2.358	0.805	0.897
	-5.679	0.876	0.936	-4.511	0.921	0.96	-3.096	0.818	0.904
	-4.31	0.906	0.952	-3.843	0.924	0.961	-2.679	0.812	0.901
<i>C.parapsilosis</i>	-7.013	0.872	0.934	-5.157	0.966	0.983	-4.153	0.789	0.888
	-7.082	0.797	0.892	-4.968	0.942	0.97	-3.583	0.808	0.899
	-5.727	0.895	0.946	-5.507	0.96	0.98	-3.433	0.773	0.879
<i>C.parapsilosis</i>	-10.42	0.842	0.918	-11.26	0.958	0.979	-5.828	0.821	0.906
	-8.673	0.867	0.931	-8.511	0.925	0.962	-5.397	0.814	0.902
	-8.177	0.86	0.927	-7.013	0.913	0.955	-4.318	0.81	0.9
<i>C.parapsilosis</i>	-7.364	0.835	0.914	-6.944	0.973	0.986	-4.688	0.804	0.897
	-5.942	0.892	0.945	-6.05	0.967	0.983	-4.032	0.811	0.901
	-6.988	0.912	0.955	-6.949	0.937	0.968	-4.348	0.81	0.9
<i>C.glabrata</i>	-6.771	0.812	0.901	-6.25	0.967	0.983	-2.899	0.94	0.969
	-6.949	0.765	0.874	-5.4	0.96	0.98	-3.58	0.863	0.929
	-6.254	0.778	0.882	-5.574	0.963	0.981	-4.96	0.835	0.914
<i>C.glabrata</i>	-10.8	0.882	0.939	-4.214	0.939	0.969	-2.871	0.803	0.896
	-5.974	0.838	0.915	-10.99	0.968	0.984	-7.179	0.795	0.892
	-14.6	0.726	0.852	-4.214	0.939	0.969	-2.871	0.803	0.896
<i>C. pelliculosa</i>	-8.039	0.878	0.937	-8.696	0.954	0.977	-6.146	0.821	0.906
	-6.184	0.904	0.951	-5.695	0.946	0.973	-4.257	0.803	0.896
	-7.485	0.909	0.953	-7.508	0.947	0.973	-5.33	0.818	0.905
<i>Saccharomyces</i>	-59.17	0.828	0.91	-131.6	0.616	0.785	-58.48	0.548	0.74
	-10.62	0.78	0.883	-16.5	0.972	0.986	-8.489	0.829	0.91
	-9.569	0.86	0.927	-11.99	0.967	0.984	-6.897	0.819	0.905