UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

"ORIGEN DE LA CANDIDIASIS URINARIA ASOCIADA A SONDA VESICAL POR ANALISIS DE BIOLOGIA MOLECULAR"

Por

Q.C.B. MARIA GUADALUPE RODRIGUEZ LOPEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS
Con Especialiad en Microbiología Médica

JUNIO DEL 2002

1080115738

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

ORIGEN DE LA CANDIDIASIS URINARIA ASOCIADA A SONDA VESICAL POR ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Aprobación de la Tesis:

DRA. M[illegible] [illegible]RALES
Co-Director de Tesis

DR. LUCIO VERA CABRERA
Co-Director de Tesis

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Co-Director de Tesis

DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ
Comisión de Tesis

Por

Q.C.B. MARIA GUADALUPE RODRIGUEZ [illegible]

DR. JOSE MARIA VIADER SALVADO
Comisión de Tesis

Como requisito parcial para obtener el [illegible]
MAESTRIA EN CIENCIAS
Con Especialidad en Microbiología

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

JUNIO DE 2003

RC123
.C3
R6

B U Raúl Rangel Frías
B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

ORIGEN DE LA CANDIDIASIS URINARIA ASOCIADA A SONDA VESICAL POR ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Aprobación de la Tesis:

DRA. IRMA M. RIVERA MORALES
Director de Tesis

DR. LUCIO VERA CABRERA
Co-Director de Tesis

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Co-Director de Tesis

DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ
Comisión de Tesis

DR. JOSE MARIA VIADER SALVADO
Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo titulado "Origen de la Candidiasis Urinaria asociada a Sonda Vesical por Análisis de Biología Molecular" lo llevó a cabo la Q.C.B. María Guadalupe Rodríguez López en el Laboratorio de Posgrado del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL así como en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario " Dr. José E. González" y en las Unidades de Cuidados Intensivos Adultos y Post-quirúrgicos del mismo Hospital bajo la dirección de la Dra. Irma Rivera Morales y la Co-dirección del Dr. Lucio Vera Cabrera y la Dra. Herminia Rodríguez Martínez.

DEDICATORIA

A **Dios** por haberme permitido llegar a este momento.

A mis padres **Homero Rodríguez Rodríguez y Ramona López Treviño de Rodríguez** por tener la visión de darme lo mejor, el estudiar una carrera y ahora terminar una maestría. Gracias por todo su amor, esfuerzo y sacrificio.

A mi esposo **Luis Antonio** por siempre ser mi apoyo incondicional, por todos los momentos que hemos compartido juntos.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por todas las cosas maravillosas que me ha dado a lo largo de mi vida.

A mi papá **Homero** por ser el mejor padre, el cual me enseñó que en la vida hay que ser honesto y leal, tu sigues conmigo y un día nos veremos allá.

A mi mamá **Mona** por darme siempre su amor incondicional, por cuidarme y estar conmigo en todo momento. Te quiero mucho.

A mi esposo **Luis Antonio** por amarme y apoyarme así, por siempre pensar en mí y darme lo mejor. Te amo.

A **Don Toño** y **Panchita** por todo el apoyo que he recibido a lo largo de este tiempo y de los cuales admiro su perseverancia y entusiasmo por la vida.

Al **Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla** por haberme dado la oportunidad de estudiar y superarme.

A mi asesora la **Dra. Irma Rivera** y co-asesores el **Dr. Lucio Vera** y la **Dra. Herminia Martínez** por su valiosa colaboración para el desarrollo de esta tesis.

A mi comisión de Tesis **Dra. Socorro Flores** y **Dr. José Ma. Viader** por enriquecer el contenido de mi trabajo.

A mis maestros por todas sus enseñanzas.

A la **Dra. Linda Muñoz** por ser un ejemplo de entereza y fortaleza, por todo lo que he aprendido a su lado.

A mis compañeras y amigas de la unidad de Hígado, **Paula** e **Irma** por todos los buenos momentos que pasamos juntas.

A **Normita Sánchez** por todas sus atenciones y apoyo.

A todo el personal del departamento de Microbiología, el cual siempre me apoyó de una forma u otra en la realización de ésta tesis

A mis compañeras **Wendy**, **Conchis** y **Adriana** con las cuales compartí una parte de la realización de este trabajo.

Al programa PAICYT por el apoyo recibido al proyecto y al CONACYT por la beca otorgada.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
NOMENCLATURA	V
RESUMEN	VIII
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Epidemiología de las micosis nosocomiales	2
1.3 Características microbiológicas del género Candida	3
1.4 Especies de levaduras de importancia clínica	5
1.5 Mecanismos fisiopatogénicos	7
1.6 Factores de riesgo	10
1.7 Tipos de colonización	11
1.8 Identificación de especies	14
1.8.1 Métodos fenotípicos	14
1.8.2 Métodos genotípicos	15
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22

CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS 23

2.1 MATERIAL 23

2.1.1 Origen de los reactivos 23

2.1.2 Material biológico 24

2.1.2.1 Cepas control de la ATCC 24

2.1.2.2 Cepas obtenidas en el estudio 25

2.1.3 Equipo 25

2.2 MÉTODOS 26

2.2.1 Estrategia general 26

2.2.2 Definiciones operacionales 28

2.2.2.1 Colonización urinaria por Candida 28

2.2.2.2 Infección urinaria por Candida 28

2.2.2.3 Candiduria de origen endógeno 28

2.2.2.4 Candiduria de origen exógeno 28

2.2.3 Diseño del estudio 29

2.2.4 Características de los pacientes 29

2.2.4.1 Población de estudio 29

2.2.4.2 Criterios de inclusión 29

2.2.4.3 Criterios de exclusión 29

2.2.4.4 Criterios de eliminación 29

2.2.4.5 Controles 30

2.2.4.6 Tamaño de la muestra 30

2.2.5 Inclusión de casos 30

2.2.5.1 Captación de los casos 30

2.2.5.2 Captación de datos clínicos 31

2.2.5.3 Evaluación basal 31

2.2.5.4 Seguimiento 31

2.2.6 Procedimiento de cultivos 31

2.2.6.1 Urocultivo cuantitativo de levaduras 31

2.2.6.2 Coprocultivo de levaduras 32

2.2.7 Métodos de conservación de levaduras 32

2.2.8 Identificación de especies de levaduras 33

2.2.8.1 Prueba de morfología 33

2.2.8.2 Prueba de resistencia al actidione (cicloheximida) 33

2.2.8.3 Prueba de asimilación de carbohidratos 33

2.2.8.4 Prueba de fermentación de carbohidratos 34

2.2.8.5. Sistema API-20 C 34

2.2.9 Análisis y comparación genotípica 35

2.2.9.1 Técnica de extracción del DNA 35

2.2.9.2 Cuantificación del DNA 36

2.2.9.3 Técnica de amplificación al azar del DNA (RAPD) 37

2.2.9.4 Estandarización de la técnica de amplificación al azar 38

2.2.9.5 Electroforesis 38

2.2.9.6 Conservación de las imágenes 39

2.2.10 Cálculo del tamaño de la banda 39

2.2.11 Definición de concordancia en el tamaño de las bandas 41

2.2.12 Comparación de las cepas control con las cepas de pacientes. 41

2.2.13 Análisis de reproducibilidad del método 41

2.2.13.1 Variabilidad intraensayo 41

2.2.13.2 Variabilidad interensayo 42

2.2.14 Comparación de los pares de cepas de levaduras de orina y heces 43

2.2.14.1 Comparación de especies análisis fenotípico. 43

2.2.14.2 Comparación genotípica 43

2.2.15 Análisis estadístico 43

2.2.16 Consideraciones éticas 43

CAPÍTULO III RESULTADOS 44

3.1 Pacientes 44

3.2 Cepas colonizantes y cepas infectantes 46

3.3 Comparación de las características clínicas y microbiológicas de los casos de colonización vs infección por levaduras 46

3.3.1 Comparación de especies 47

3.4 Análisis genotípico de los pares de cepas 49

3.4.1 Evaluación de la reproducibilidad de la amplificación al azar del DNA 51

3.4.2.Variabilidad interensayo. 52

3.4.3 Variabilidad intraensayo 54

3.5 Análisis genotípico de los pares concordantes de *Candida tropicalis* 56

3.5.1 Selección de iniciadores 56

3.5.2 Comparación genotípica de las cepas de *Candida tropicalis* 57

3.5.3 Demostración de dos pares de cepas discordantes 63

3.6 Análisis genotípico de los pares de cepas de *Candida glabrata* 70

3.6.1 Selección de iniciadores 70

3.6.2 Análisis genotípico de la cepa control de *Candida glabrata* ATCC 90030 71

3.6.3 Comparación genotípica de las cepas de *Candida glabrata* 71

3.7. Análisis genotípico de los pares de cepas de *Candida albicans* 75

3.7.1 Selección de iniciadores 76

3.7.2 Análisis genotípico de la cepa control de *Candida albicans* 77

3.7.3 Comparación genotípica de las cepas de *Candida albicans* 77

3.8 Análisis genotípico de *Candida parapsilosis* 82

3.8.1 Selección de iniciadores para *Candida parapsilosis* 82

3.8.2 Análisis genotípico de la cepa control 83

3.8.3 Comparación genotípica de la cepa de *Candida parapsilosis* 84

3.9 Análisis genotípico de las cepas de *Trichosporon* 85

3.9.1 Selección de iniciadores para *Trichosporon* 85

3.9.2 Comparación genotípica de las cepas de *Trichosporon* 86

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN 92

CAPÍTULO V CONCLUSIONES 108

CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA 109

APENDICES

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I.- Comparación de cepas colonizantes contra cepas infectantes.	47
II.- Comparación fenotípica de los pares de cepas de levaduras aisladas de orina y heces.	48
III.- Coeficiente de variación intraensayo por el tamaño de la banda en pares de bases.	53
IV.- Coeficiente de variación intraensayo calculado por la intensidad absoluta de cada una de las bandas.	54
V.- Coeficiente de variación interensayo por el tamaño de la banda en pares de bases.	55
VI.- Coeficiente de variación interensayo calculado por la intensidad relativa de cada una de las bandas.	56
VII.- Tamaño de las bandas de los cuatro pares de cepas clínicas de *Candida tropicalis* con la mezcla de iniciadores RP-2/RP1-4 a 36°C.	59
VIII.- Tamaño de las bandas de *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 a 36°C.	61
IX.- Tamaño de las bandas de *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 a 45°C.	63
X.- Tamaño de las bandas de la cepa 12 discordante de *Candida tropicalis* con los diferentes iniciadores.	66
XI.- Tamaño de las bandas de la cepa 15 discordante de *Candida tropicalis* con los diferentes iniciadores.	69
XII.- Tamaño de las bandas de las cepas de *Candida glabrata* con el iniciador SOY a 36°C.	73
XIII.- Tamaño de las bandas de las cepas de *Candida glabrata* con la mezcla de iniciadores SOY/RP1-4 a 36°C.	75

XIV.- Tamaño de las bandas para las cepas de *Candida albicans* con el iniciador RP2 a 36°C. 79

XV.- Tamaño de las bandas de las cepas de *Candida albicans* con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C. 81

XVI.- Tamaño de las bandas de la cepa de *Candida parapsilosis* con el iniciador SOY y con la mezcla SOY/RP2 a 36°C 85

XVII.- Tamaño de las bandas de la cepa de *Trichosporon beigelli* con un iniciador RP2 y con la mezcla RP2/RP1-4 a 36°C. 88

XVIII.- Tamaño de las bandas de la cepa de *Trichosporon cutaneum* con un iniciador RP2 y con la mezcla RP2/RP1-4 a 36°C. 90

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.-Colonización de la levadura *Candida* a través del tracto gastrointestinal.	8
2.- Espectro clínico de la candidiasis localizada.	9
3.- Espectro clínico de la candidiasis diseminada.	9
4.- Estrategia general.	26
5.- Marcador 100 pares de bases (Gibco Lab)	40
6.- Demostración de la obtención del DNA.	49
7.- Resultados de la estandarización de la técnica de amplificación al azar.	50
8.- Amplificación de 3 cepas de *Candida tropicalis* seleccionadas al azar, 7 O, 8 O y 14 H las cuales fueron evaluadas por triplicado para el análisis de reproducibilidad.	52
9.- Selección de iniciadores para *Candida tropicalis.*	57
10.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* con la mezcla de iniciadores a 36°C.	58
11.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 a 36°C.	60
12.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 a 45°C.	62
13.- Comparación genotípica de la cepa discordante 12 de *Candida tropicalis* con los diferentes iniciadores.	64
14.- Comparación genotípica de la cepa discordante 15 de *Candida tropicalis* con los diferentes iniciadores.	67
15.- Selección de iniciadores para *Candida glabrata.*	70

16.- Cepa control *Candida glabrata* ATCC 90030 con iniciador SOY, y con la mezcla SOY/RP1-4. **71**

17.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* con el iniciador SOY a 36°C. **72**

18.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* con mezcla de iniciadores SOY/RP1-4 a 36°C. **74**

19.- Selección de iniciadores para *Candida albicans.* **76**

20.- Cepa control de *Candida albicans* ATCC 90028 con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 y el iniciador RP2 **77**

21.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida albicans* con el iniciador RP2 y a 36°C. **78**

22.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida albicans* con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C. **80**

23.- Selección de iniciadores para *Candida parapsilosis.* **82**

24.- Análisis molecular de la cepa control de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 con el iniciador RP-2 y con mezcla de iniciadores SOY/RP2. **83**

25.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Candida parapsilosis* con el iniciador SOY y mezcla SOY/RP2. **84**

26.- Selección de iniciadores para *Trichosporon.* **86**

27.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Trichosporon beigelli* con el iniciador RP2 y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4. **87**

28.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Trichosporon cutaneum* con el iniciador RP2 y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4. **89**

NOMENCLATURA

hr	hora
hrs	horas
min	minutos
μM	concentración micromolar
mM	concentración milimolar
μL	microlitro
μg	microgramo
mL	mililitro
L	litro
g	gramo
mg	miligramo
ng	nanogramo
nm	nanómetro
N	concentración normal
U	unidades
lbs	libras
°C	grado centígrado
rpm	revoluciones por minuto
UFC/mL	unidades formadoras de colonia por mililitro
NaOH	hidróxido de sodio
$MgCl_2$	cloruro de magnesio
NaCl	cloruro de sodio

mm	milímetros
Prom	Promedio
DE	Desviación estándar
B	Banda
CV	Coeficiente de variación
pb	Pares de bases
Glu	Glucosa
Mal	Maltosa
Sac	Sacarosa
Gal	Galactosa
Lac	Lactosa
Raf	Rafinosa
Ino	Inositol
Cel	Celobiosa
Xil	Xilosa
Tre	Trealosa
Mel	Melibiosa
Act	Actidione
O	Control negativo
b	Intercepto
m	Pendiente
r	Coeficiente de correlación
Ln	Logaritmo natural
Dist	Distancia

Rf	Factor de retardo
C	Carril
IN	Intensidad

RESUMEN

Q.C.B. María Guadalupe Rodríguez López

Título del Estudio: **ORIGEN DE LA CANDIDIASIS URINARIA ASOCIADA A SONDA VESICAL POR ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Número de páginas 114

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica

Objetivo y Método de Estudio: Las micosis nosocomiales, predominantemente aquellas causadas por levaduras generan una alta morbilidad y mortalidad y, en nuestro Hospital, *Candida* spp. se encuentra entre los primeros cuatro agentes aislados en infecciones nosocomiales. La candidiasis comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas, en donde la infección de vías urinarias representa el 46%. La candiduria tiene relevancia adicional pues se reconoce que ésta es un paso previo para el desarrollo de la enfermedad sistémica; de tal manera que prevenir el desarrollo de la candiduria, evitará secundariamente la candidemia, infección con una elevada mortalidad y cuyo tratamiento tiene un costo sumamente elevado. Las levaduras que normalmente son comensales del tubo digestivo de las personas sanas, en los pacientes hospitalizados que reciben antibióticos proliferan favoreciendo que por contigüidad infecten las vías urinarias, principalmente en pacientes cateterizados de las vías urinarias. La posibilidad de que la *Candida* pueda ser inoculada hacia las vías urinarias a partir de una fuente exógena, como serían las manos del personal que manejan la sonda, no ha sido descrito en la literatura, y en términos generales no esperaríamos que explicara más del 20% de los casos. Entender la frecuencia con la que cada uno de los mecanismos fisiopatogénicos, ya sean endógeno o exógeno, explican el desarrollo de la candiduria permitirá orientar específicamente las medidas para su prevención. En este trabajo se investigó la frecuencia con la que la candiduria desarrollada en pacientes hospitalizados con sonda urinaria, podía probarse su origen endógeno. Para lograr este objetivo, se incluyeron 149 pacientes hospitalizados en las Unidades críticas del Hospital Universitario que estuvieran cateterizados de las vías urinarias, los cuales se vigilaron hasta demostrar la ocurrencia de la candiduria. Se identificaron 30 casos de candiduria, de cuyos pacientes se describen los factores de riesgo asociados, así como el curso clínico de la progresión desde colonización hasta infección urinaria por levaduras y el comportamiento diferencias de las diversas especies de *Candida*. En los 30 casos de candiduria se aisló concomitantemente una levadura colonizante en heces y a cada uno de los pares de levaduras, urinaria y fecal, se les identificó la especie por el método de API-20. Se encontró concordancia de especie en el 86% de los pares de levaduras, a los cuales posteriormente se comparó su patrón cromosómico por la técnica de amplificación al azar del DNA polimórfico, confirmando una real concordancia de los pares de cepas en 80%. De tal manera que en una de cada cinco candidurias no fue posible demostrar una cepa colonizante en el intestino que explicara la infección urinaria, lo que nos permite asumir un origen exógeno a partir del personal y el ambiente hospitalario.

Conclusiones y contribuciones:
En nuestra serie de 30 casos de candiduria, la frecuencia de colonización urinaria por levaduras fue del 19% las especies de levaduras aisladas más frecuentemente fueron *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*. La concordancia fenotípica ente las especies de levaduras colonizantes en orina fue de 86% y genotípicamente fue de 80%. La relevancia de estos datos es que permitirá implementar medidas preventivas para evitar la contaminación exógena de las vías urinarias de pacientes hospitalizados con riesgo de adquirir candiduria intrahospitalaria.

Dra. Irma M. Rivera M.	Dr. Lucio Vera Cabrera	Dra. Herminia G. Rodríguez M.
Director	Co-director	Co-director