CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Origen de los reactivos

Los reactivos utilizados se adquirieron de las siguientes compañías:

Sigma Chemical Co. De St. Louis, Missouri, US:

Liticasa, bromuro de etidio, glicerol, alcohol isoamílico, cloroformo, etanol absoluto, Ácido etilendiaminotetracético, Tritón X-100, xilencianol, azul de bromofenol, xilosa, sorbitol

Gibco BRL:

Agarosa, fenol saturado, Marcador de 100 pb.

Bio-Rad, Richmond Laboratories, CA:

Trizma base, β-mercaptoetanol, SDS

Promega:

Taq DNA polimerasa

Boehringer Mannheim:

Desoxinucleótidos.

EM Science:

Acido clorhidríco 36 N

Química Dinámica S.A. de C.V.:

Acido acético glacial

Difco:

Sacarosa, Rafinosa

Merck de México:

Trealosa, Arabinosa, Maltosa

Fisher Scientific Company:

Galactosa

Reactivos Químicos Monterrey:

Glucosa

Droguería Benavides S.A. de C.V.:

Aceite mineral

Biomeriux :

Sistema API-20C

Beckman:

Isodine

2.1.2 Material biológico

2.1.2.1 Cepas control obtenidas de la colección de cultivos tipo de Estados Unidos (American Type Culture Collection ATCC)

Se utilizaron 3 cepas control de la ATCC, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

2.1.2.2 Cepas obtenidas en el estudio

En el lapso de enero de 1996 a noviembre de 1997 se obtuvieron 60 cepas provenientes de muestras urinarias y fecales de 29 pacientes las cuales fueron: 17 cepas de *Candida tropicalis*, 6 de *Candida glabrata*, 4 de *Candida albicans*, 1 de *Candida parapsilosis*, 1 de *Trichosporon cutaneum*, y 1 de *Trichosporon beigelli* aisladas de orina, y 15 de *Candida tropicalis*, 5 de *Candida glabrata*, 5 de *Candida albicans*, 1 de *Candida parapsilosis*, 2 de *Trichosporum beigelli*, 1 de *Trichosporum cutaneum* y 1 de *Trichosporum* spp aisladas de heces.

2.1.3 Equipo

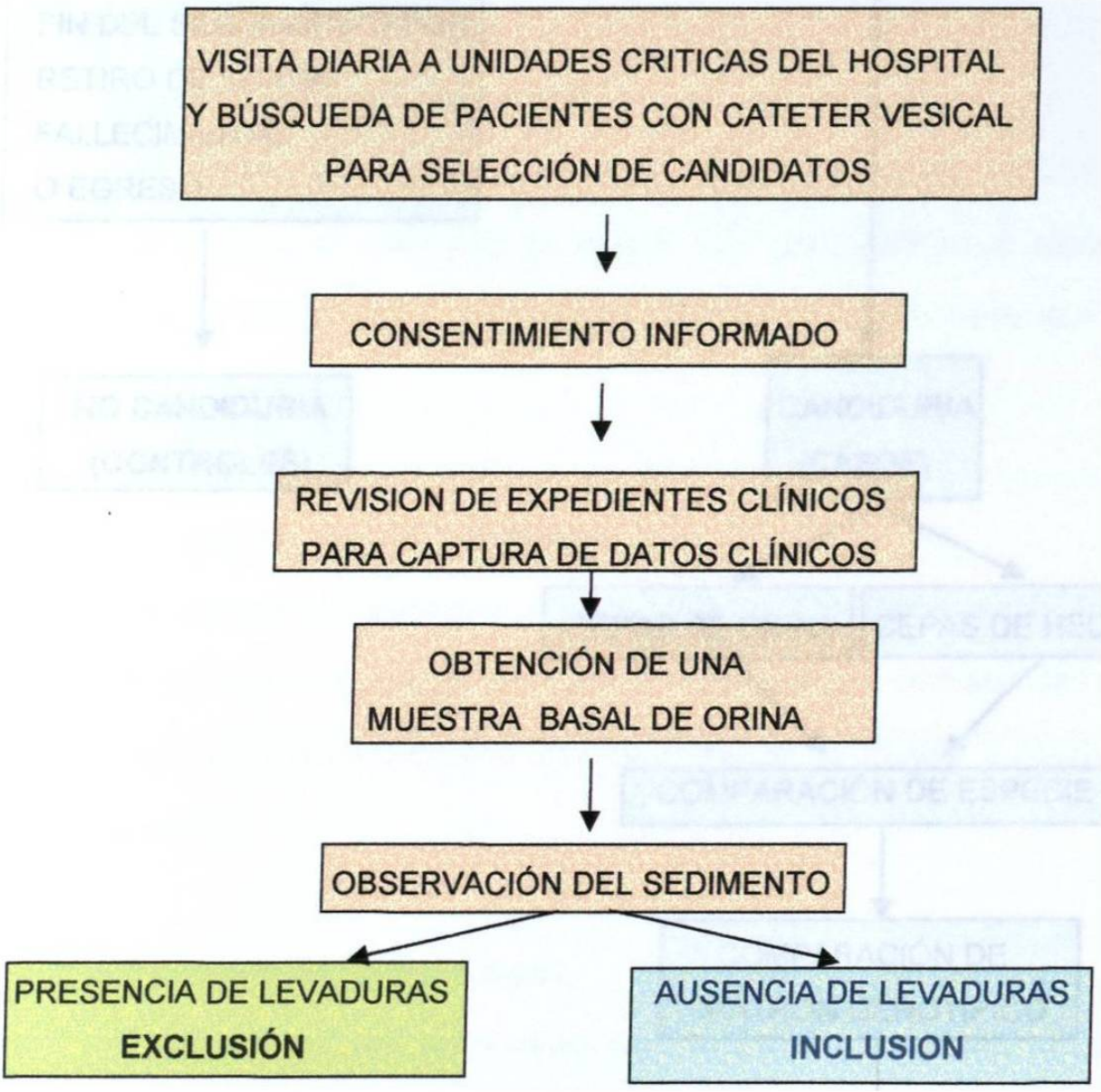
En la fase experimental se utilizó un termociclador PTC-200 de MJ Research, un microscopio standard 25 de Zeiss, una incubadora modelo 417 de Lab. Line Instruments, Inc, un refrigerador a 4°C Torrey, una centrífuga IEC HN-S Damon/Iec Division, un autoclave modelo 254 M marca Tuttnaver, un baño de agua 180 Series Precision Scientific, una cámara de electroforesis Horizon 20-25 Life Technologies; una fuente de poder Pac 300 Biorad; una placa de calentamiento Nuova II Sybron, una microcentrífuga modelo V VWR Scientific, un congelador a –20°C MFCO9M3 FW1, White Westinghouse, un agitador MT-51 American Scientific, una balanza granataria electrónica PT150 Sartorius, una balanza analítica electrónica AE100 Mettler, un medidor de pH modelo 330 Orion, un refrigerador WRT 14 P Whirlpool, una lámpara de luz ultravioleta UVL 56 Listed Insp & Meas Eq, un sistema de cámara gelcam de polaroid, un

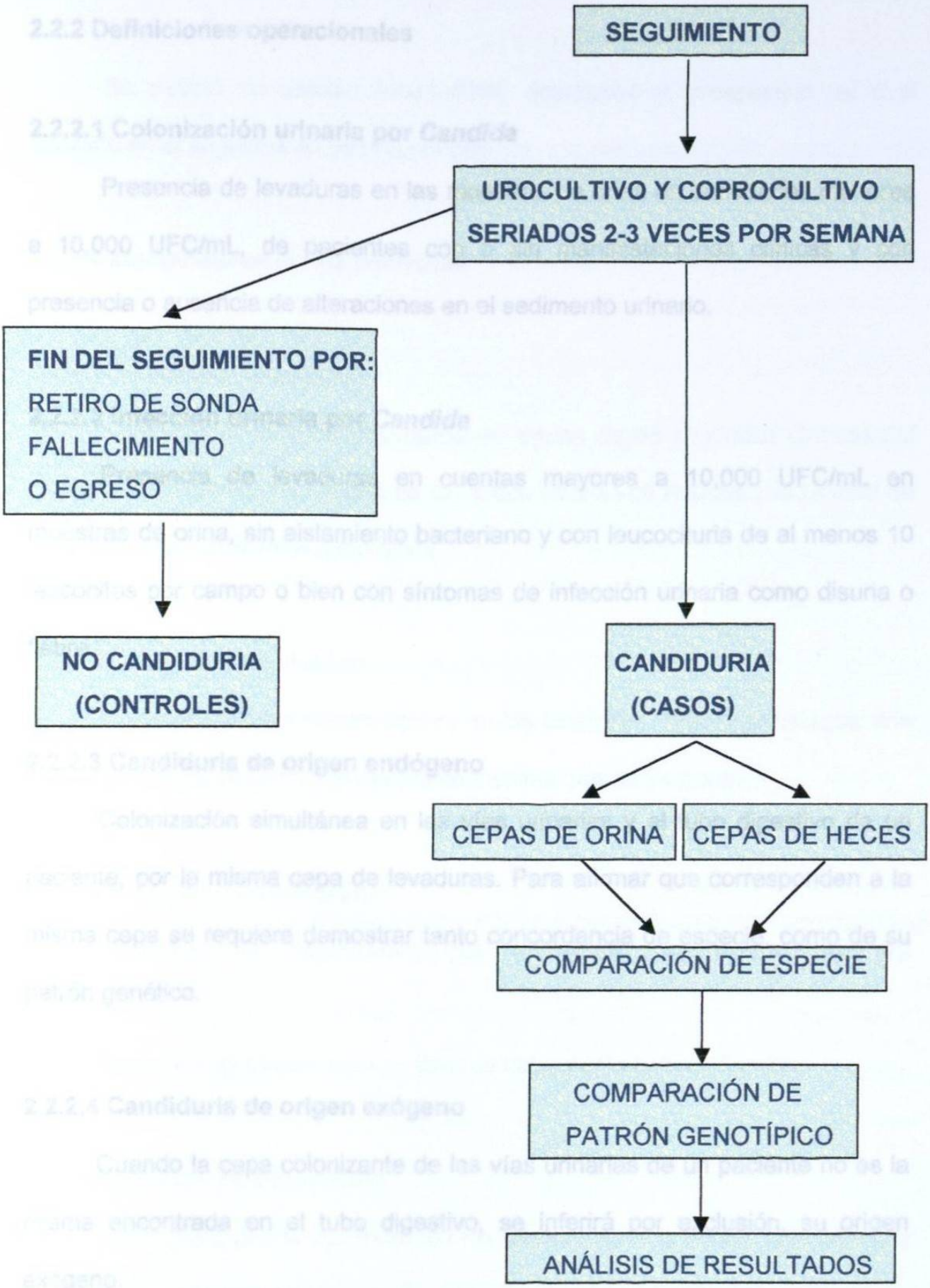
espectrofotómetro spectronic gol, de Milton Roy, un sistema analizador de geles de Bio-Rad, un analizador de Eastman Kodak Company, Rochester N.Y.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 La estrategia general que se siguió en este estudio se muestra en la figura 4.

Figura 4.-Estrategia general




SEGUIMIENTO
UROCULTIVO Y COPROCULTIVO
SERIADOS 2-3 VECES POR SEMANA
FIN DEL SEGUIMIENTO POR:
RETIRO DE SONDA
FALLECIMIENTO
O EGRESO
NO CANDIDURIA
(CONTROLES)
CANDIDURIA
(CASOS)
CEPAS DE ORINA
CEPAS DE HECES
COMPARACIÓN DE ESPECIE
COMPARACIÓN DE
PATRÓN GENOTÍPICO
ANÁLISIS DE RESULTADOS

2.2.2 Definiciones operacionales

2.2.2.1 Colonización urinaria por *Candida*

Presencia de levaduras en las muestras de orina en cantidades menores a 10,000 UFC/mL, de pacientes con o sin manifestaciones clínicas y con presencia o ausencia de alteraciones en el sedimento urinario.

2.2.2.2 Infección urinaria por *Candida*

Presencia de levaduras en cuentas mayores a 10,000 UFC/mL en muestras de orina, sin aislamiento bacteriano y con leucocituria de al menos 10 leucocitos por campo o bien con síntomas de infección urinaria como disuria o fiebre.

2.2.2.3 Candiduria de origen endógeno

Colonización simultánea en las vías urinarias y el tubo digestivo de un paciente, por la misma cepa de levaduras. Para afirmar que corresponden a la misma cepa se requiere demostrar tanto concordancia de especie, como de su patrón genético.

2.2.2.4 Candiduria de origen exógeno

Cuando la cepa colonizante de las vías urinarias de un paciente no es la misma encontrada en el tubo digestivo, se inferirá por exclusión, su origen exógeno.

2.2.3 Diseño del estudio

Se realizó un estudio longitudinal, descriptivo y prospectivo, el cual consiste en el seguimiento de una cohorte.

2.2.4 Características de los pacientes

2.2.4.1 Población de estudio

Pacientes adultos hospitalizados en alguna de las Unidades Críticas del Hospital Universitario: la Unidad de Cuidados Intensivos Adultos y la Unidad de Cuidados Intensivos Post-quirúrgicos

2.2.4.2 Criterios de inclusión

Pacientes adultos hospitalizados en las Unidades Críticas señaladas, con sonda urinaria cuya permanencia previa máxima sea de 24 horas.

2.2.4.3 Criterios de exclusión

Pacientes ya colonizados por levaduras al momento de su identificación.

Pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento con antifúngicos

2.2.4.4 Criterios de eliminación

Pacientes que una vez incluídos les fuera retirada la sonda, fallecieran o fueran egresados antes de tomar al menos una muestra de seguimiento.

2.2.4.5 Controles

Todo paciente que no desarrolló candiduria durante su seguimiento fue considerado elegible como control para el estudio clínico. Se incluirán 60 pacientes con al menos una muestra de seguimiento (2 controles por cada caso).

2.2.4.6 Tamaño de la muestra

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para estimación a partir de proporciones.

Proporción: 80%; Tolerancia: 10%

Un α de: 5%, un β de:10%

Resultado: 62 casos evaluables (pares de cepas) [31]

2.2.5 Inclusión de casos

2.2.5.1 Captación de los casos

Por medio de visitas diarias a las Unidades de Cuidados Intensivos del Hospital se buscaron pacientes que reunieran los criterios de inclusión y superaran los de exclusión. A aquellos elegibles se les solicitó consentimiento para su inclusión al estudio, el cual expresaron en forma escrita por medio de la Carta de Consentimiento como se muestra en el Apéndice A.

2.2.5.2 Captación de datos clínicos

Los datos clínicos de los pacientes fueron captados en una hoja de captura diseñada para el estudio y que se muestra en el Apéndice A.

2.2.5.3 Evaluación basal

Con el objeto de descartar colonización previa por levaduras se tomó una muestra basal de orina para observación microscópica del sedimento. Además se tomaron muestras basales de orina y heces para cultivo de levaduras.

2.2.5.4 Seguimiento

Dos veces por semana durante todo su internamiento se tomaron muestras de orina hasta identificar candiduria. Paralelamente se realizaron coprocultivos para levaduras con el objeto de comparar las especies colonizantes.

2.2.6 Procedimiento de cultivos

2.2.6.1 Urocultivo cuantitativo de levaduras

Previo aseo con antiséptico se aspiró a través de la sonda urinaria para obtener 3-5 mL de orina. Cada muestra de orina se dividió en dos tubos: uno de los tubos se centrifugó por 10 minutos a 2,500 rpm y se observó el sedimento al microscopio. La muestra de orina del segundo tubo se destinó al cultivo cuantitativo. Fueron sembrados tanto la muestra directa así como diluciones 1:10 y 1:100; sin embargo, cuando la observación microscópica del

sedimento en muestras subsecuentes reveló abundantes levaduras o la presencia de pseudohifas se realizaron además diluciones 1:1,000 y 1:10,000. Para la técnica cuantitativa se sembró 0.1 mL de orina con la técnica de la varilla en L sobre medio de agar Saboureaud adicionado con los siguientes antibióticos: penicilina (80,000 U/mL) y estreptomicina (80 mg/mL) y se procedió a incubar a 37°C durante 24 a 48 hrs. Para la cuantificación de levaduras se seleccionaron aquellas placas que tuvieran entre 30 y 300 UFC. El número de levaduras resultante del conteo se multiplicó por 10 además de por el valor de la dilución obteniéndose la cantidad de UFC/mL de orina[32].

2.2.6.2 Coprocultivo de levaduras

Las muestras de heces fueron obtenidas de evacuación espontánea o bien por medio de raspado rectal utilizando una cucharilla rectal. La cucharilla se introdujo en un tubo con caldo de Saboureaud adicionado con antibióticos y se incubó a 37°C durante 24 horas. Posterior a lo cual se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 que se sembraron con la técnica de varilla en L en placas con agar Sabouread con antibióticos y se incubaron durante 24 a 48 horas a 37°C[32].

2.2.7 Métodos de conservación de levaduras

Las levaduras recuperadas se conservaron en placas de Petri con agar Saboureaud a 4°C selladas con Parafilm. Cada dos meses se realizaron resiembras para asegurar su viabilidad.

2.2.8 Identificación de especies de levaduras

2.2.8.1 Prueba de morfología

Ya que diferentes especies de levaduras se caracterizan por adoptar diferentes morfología en medios con agentes tensoactivos, una colonia de cada levadura se inoculó por punción utilizando un asa en forma de L en una placa con agar oxgall, se cubrió con un portaobjetos y se selló con papel parafilm para incubarla a 37°C. Después de 72 hrs. se observó la morfología que presentaron las levaduras buscando la producción de micelios, clamidosporas o blastosporas[7]. Estas se clasificaron de acuerdo a la Tabla I del Apéndice B.

2.2.8.2 Prueba de resistencia al actidione (cicloheximida)

Esta prueba se basa en la capacidad que tienen algunas especies de levaduras de crecer en presencia de cicloheximida. Cada levadura problema se sembró en agar con 0.4 g/L de cicloheximida (agar de selección para hongos patógenos Micosel) y se incubó a 37°C por 24 a 48 hrs[7]. El desarrollo en presencia de cicloheximida sugiere que se trate de *Candida albicans* o *C. stellatoidea*.

2.2.8.3 Prueba de asimilación de carbohidratos

Esta prueba se basa en la diversa capacidad para asimilar a los carbohidratos que tienen las diferentes especies del género *Candida.*

Se tomó una colonia pura de cada levadura con 48 hrs. de crecimiento y se suspendió en agua destilada estéril ajustándose la turbidez al tubo no. 1 del nefelómetro de Mc. Farland. Con dos gotas de la suspensión se inocularon los

tubos con solución al 2.5% de los siguientes carbohidratos: glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa, rafinosa, inositol, xilosa y trealosa y se incubaron a 37°C por 48-72 hs. La presencia de turbidez, que representa la capacidad de asimilar dicho carbohidrato, se denominó una prueba positiva[33]. Para la identificación de las especies de levaduras los resultados de asimilación obtenidos se cotejaron con la Tabla II del Apéndice B.

2.2.8.4 Prueba de fermentación de carbohidratos

Esta prueba se basa en la capacidad que tienen las diferentes especies del género *Candida* para fermentar diferentes carbohidratos, produciendo ácido y gas.

Se tomó una colonia pura de cada levadura con 48 hrs. de crecimiento y se suspendió en agua destilada estéril ajustándose la turbidez al tubo no. 1 del nefelómetro de Mc. Farland y se colocaron dos gotas de la suspensión en los tubos con solución al 1.0% de los carbohidratos glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa y maltosa (0.5%) para incubarlos a 37°C por 48-72 hrs. Durante un período de 3 semanas los tubos fueron regularmente examinados y reincubados buscando notar un viraje en el color del medio de morado a amarillo o bien la presencia de una burbuja de gas en la campana Durham lo que nos indicó un resultado positivo[33]. Estos resultados se compararon con la Tabla III del Apéndice B. La preparación de soluciones de carbohidratos así como la de medios de cultivo se muestran en el Apéndice C.

2.2.8.5 Sistema API-20 C

De cada levadura problema se tomó una colonia y se colocó en un tubo con agua ajustándose la turbidez al tubo no. 2 del nefelómetro de Mc. Farland. De esta suspensión se tomaron 100 µL y se transfirieron al medio C. A continuación con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de esta solución y se inoculó la galería de reactivos con aproximadamente 3 gotas de la solución, las pruebas de fermentación se sellaron con aceite mineral estéril y se incubaron durante 24 a 48 hrs. Las pruebas de fermentación se consideraron positivas cuando se observó un cambio de color de morado a amarillo, mientras que las pruebas de asimilación se consideraron positivas al notar turbidez en el pozo. Los resultados se interpretaron de acuerdo a la Tabla IV del Apéndice B.

2.2.9 Análisis y comparación genotípica

2.2.9.1 Técnica de extracción del DNA

Para la técnica de extracción del DNA se procedió a realizar la técnica de TSNT (Tritón X-100, SDS, NaCl y Tris-EDTA) [34], esta técnica se muestra en el Apéndice D. Sin embargo con esta técnica no se logró la extracción del DNA para las diferentes especies de *Candida* y el *Trichosporon*, por lo cual se realizó la técnica de Ann Bostok [35], la cual utiliza la enzima liticasa que se utiliza para la degradación de la pared de las levaduras y que se muestra en el Apéndice D. Finalmente se realizó una combinación de ambas técnicas, el procedimiento que se realizó fue el siguiente: La levadura se sembró en un tubo cónico con 5 mL de caldo Sabouraud, se separó el paquete celular por centrifugación durante

10 min a 2,500 rpm y se lavó 2 veces con 1 mL de sorbitol 1M. Se separó el paquete celular por centrifugación 10 min a 2,500 rpm y se añadió 1 mL de buffer SE (sorbitol-EDTA) con 1 μL de β–mercaptoetanol y 85 μg de liticasa. Se incubó por 8 hrs a 37°C y se separó el paquete celular por centrifugación. Se añadieron 500 μL de solución de lisis TSNT; se mezcló por inversión y se añadieron 200 μL de fenol saturado; se mezcló por inversión y se le añadieron 100 μL de solución Sevag. Se agitó en vortex por 5 minutos y se añadieron 200 μL de buffer TE (Tris-EDTA) 1X y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 10 min a 2,500 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorff y se precipitó el DNA con 1 mL de etanol absoluto, se mezcló lentamente por inversión hasta observar la precipitación del DNA en forma de hebra blanca. Se centrifugó 8 min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante teniendo cuidado que no se desprendiera la pastilla de DNA. Se lavó con 1 mL de etanol al 70% y nuevamente se centrifugó por 8 minutos a 14,000 rpm, después de decantar el sobrenadante se dejó secar a temperatura ambiente de 5 a 10 min. El DNA se resuspendió en 20-50 μL de TE 1X.

La calidad del DNA obtenido se verificó haciendo una electroforesis en gel con una concentración de agarosa al 0.8%, a 70 volts durante 90 min.

2.2.9.2 Cuantificación del DNA

Se hizo una dilución 1:1,000 colocando 1 μL del DNA en 1 mL de buffer TE 1X y se colocó en el espectrofotómetro para leer la densidad óptica a 260

nm, ajustando el blanco con buffer TE 1X. El valor obtenido se multiplicó por el factor 50 y por la dilución para obtener la concentración de DNA en ng/μL.

La preparación de todas las soluciones utilizadas en las diferentes técnicas de biología molecular se encuentran en el Apéndice C[34].

2.2.9.3 Técnica de amplificación al azar del DNA (Random Amplified Polimorfic DNA RAPD)

En un tubo para PCR se agregó agua, buffer para PCR, cloruro de magnesio, desoxinucleótidos e iniciadores, por último se colocó la muestra y agregó la enzima *Taq* DNA polimerasa. Se colocó en el termociclador y se programó el tiempo y número de ciclos.

Los iniciadores probados fueron los 4 propuestos por Lehmann[36] y colaboradores que a continuación se describen:

SOY:	5'AGGTCACTGA 3'
RP-2:	5' AAGGATCAGA 3'
RP4'2:	5' CACATGCTTC 3'
RP1'4 :	5' TAGGATCAGA 3'

Las concentraciones de los reactivos utilizados en el ensayo inicial fueron las descritas por Lehmann y cols [36]:

Concentración de iniciadores 0.8 μM

Concentración de $MgCl_2$ 2.7 mM

Cantidad total de DNA 10 ng

Volumen final de reacción de 50 μL

Cantidad total de *Taq* polimerasa 1.25 U

Las condiciones utilizadas fueron: 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 2 min a 72°C, durante 45 ciclos, con una extensión final de 10 min a 72°C[36].

2.2.9.4 Estandarización de la técnica de amplificación al azar

Debido a que con las condiciones propuestas originalmente no se obtuvieron los resultados esperados se procedió a la estandarización del método utilizando variaciones en los iniciadores, y se utilizaron mezclas de los mismos:

1.- SOY - RP-2	4.- RP-2 - RP4-2
2.- SOY - RP4-2	5.- RP-2 - RP1-4
3.- SOY - RP1-4	6.- RP4-2 - RP1-4

La concentración de iniciadores:	1, 2 y 3 μM
La cantidad de *Taq* polimerasa:	1.25, 2.5 y 5 U
La cantidad de DNA:	250, 500 y 750 ng
La temperatura de apareamiento:	45°C* para *C. tropicalis*

2.2.9.5 Electroforesis

Las condiciones para la realización de la electroforesis fueron: gel de agarosa al 2% con buffer TAE 1X, a 75 volts por 270 min[35,36].

2.2.9.6 Conservación de las imágenes

Los geles se revisaron en un sistema analizador de geles (Gel Doc) y las imágenes se conservaron en un disco de 3 $^1/_2$.

2.2.10 Cálculo del tamaño de la banda

De cada uno de los 3 ensayos se imprimieron los geles y se midió la distancia en centímetros que recorrió la banda, desde el pozo inicial hasta la parte media de cada banda, de cada una de ellas. La distancia recorrida por cada banda se dividió entre la distancia recorrida por la última banda para obtener así el factor "Rf" de cada banda. Este procedimiento primeramente se realizó en el marcador de 100 pares de bases y posteriormente en cada una de las cepas problema para compararlo con el control. El marcador generó 16 bandas cuyo tamaño se sabe que es de 2,072 pares de bases, 1500, 1400, 1300, 1,200 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb. A estos valores se les calculó el logaritmo natural y se hizo una gráfica de dispersión con el factor Rf vs el logaritmo natural de los pares de bases, donde se calculó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación. Con la pendiente y el intercepto, utilizando la ecuación de la recta ($y=mx+b$, donde "m" es la pendiente, "x" es el Rf de la banda y "b" es el intercepto) fue posible calcular el tamaño de las bandas de las cepas problema del mismo gel, expresado en logaritmo natural de los pares de bases, el cual se elevó a su exponencial para obtener el tamaño de cada una de las bandas en pares de bases. Para realizar estos ensayos es necesario utilizar el marcador de 100 pares de bases por medio del cual es posible calcular el tamaño de las bandas

de las cepas, a continuación se presenta una descripción del marcador de 100 pares de bases de Gibco BRL.

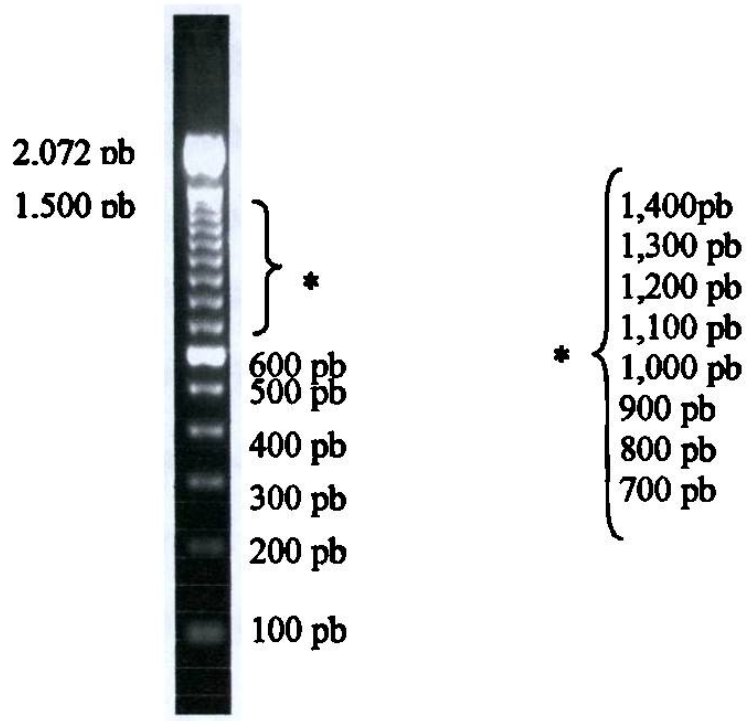


Figura 5 Marcador de 100 pb

Este marcador tiene un total de 16 bandas, la primera banda tiene un tamaño de 2,072 pb y con una intensidad muy alta, la siguiente banda es de 1,500 pb y así subsecuentemente las bandas van disminuyendo en tamaño de 100 en 100 hasta llegar a la banda de 100 pb. La intensidad de la banda de 600 pb es doble, como una señal para guiarse al momento de calcular el tamaño.

2.2.11 Definición de concordancia en el tamaño de las bandas

Se procedió a estimar el intervalo máximo de variación en el tamaño de cada banda, que fuera considerado aceptable para comparar las bandas de cepas diferentes. Utilizando la misma fórmula de la recta y con un margen de

variación de 1 mm (± 0.5 mm), para cada banda pudieron calcularse los valores máximo y mínimo que definieron el intervalo dentro del cual se definiría concordancia entre dos bandas a comparar.

2.2.12 Comparación de las cepas control con las cepas de pacientes

Se compararon por número y tamaño las bandas de las cepas control de *Candida glabrata* ATCC 90030, de *Candida albicans* ATCC 90028 y de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 con las cepas obtenidas de los pacientes. Debido a que no se tenía una cepa control del ATCC de la *Candida tropicalis*, se tomaron como controles a las tres cepas con las que se realizó el análisis de reproducibilidad, dos cepas obtenidas de orina y una cepa de heces, y se compararon con las cepas aisladas de los pacientes.

2.2.13 Análisis de reproducibilidad del método

Con el objetivo de calcular los coeficientes de variación intra e interensayo se procedió a realizar por triplicado el ensayo de amplificación al azar del DNA de 3 de *Candida tropicalis* (dos obtenidas de muestras de orina y una de heces) de 3 pacientes elegidos al azar. Los ensayos se corrieron en 3 fechas diferentes: 6 de mayo, 11 de mayo y 14 de julio de 1999.

2.2.13.1 Variabilidad intraensayo

Para este análisis se utilizaron 3 geles diferentes con 3 cepas de la levadura *Candida tropicalis*. Existen varios factores que se toman en cuenta en la realización de una técnica, por ejemplo: el analista que realiza el estudio, el laboratorio, los equipos (termocicladores, cámaras de electroforesis) y la fecha

del estudio entre otros, en este caso para este análisis todos estos factores son exactamente iguales. Para esto se procedió primeramente a contar el número de bandas en los geles, a calcular el tamaño de cada una y posteriormente utilizando el sistema analizador de imágenes se midió la intensidad neta. La intensidad de la banda 1 del primer carril del gel 1 (Intensidad 1) se comparó con la banda 1 del primer carril del segundo gel (Intensidad 2) y con la banda 1 del primer carril del gel 3 (Intensidad 3). A estos valores se les calculó: el promedio, la desviación estándar y su coeficiente de variación. De la misma forma se realizaron los cálculos para todas las muestras de los 3 geles. Se determinó el intervalo de los coeficientes de variación para cada banda y carril de los tres geles.

2.2.13.2 Variabilidad interensayo

Para este análisis se contó el número de bandas en el gel y se calculó el tamaño de cada una de ellas, posteriormente con la finalidad de conocer la variación en la intensidad de las bandas, después de medir la intensidad de cada una de las bandas se eligió la banda 1 como banda de referencia y para cada una de las demás bandas del mismo carril se dividió el valor de su intensidad entre la intensidad de la banda de referencia (ejemplo: Intensidad de la banda 2 entre la intensidad de la banda 1) y así sucesivamente hasta completar todas las bandas del carril. Se realizó el mismo procedimiento para los carriles dos y tres que fueron repeticiones de la misma cepa. Con los coeficientes obtenidos de los tres carriles que provenían de la misma cepa se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

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

2.2.14.1 Comparación de especies: análisis fenotípico

Para cada par de levaduras se comparó las especie identificada de la muestra de orina con la identificada de la muestra de heces del mismo paciente.

2.2.14.2 Comparación genotípica

De aquellos pares de levaduras concordantes en especie, por cada especie *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis y Trichosporon cutaneum* y *T. beigelli* se procedió a comparar el número y tamaño de las bandas de los pares de cepas de orina y heces de cada paciente.

2.2.15 Análisis estadístico

La concordancia fenotípica (por especie) de las levaduras colonizantes de orina y heces se reportó en frecuencia y porcentaje. La concordancia genotípica de los pares de cepas igualmente se describió en frecuencia y porcentaje. La proporción de candiduria de origen endógeno se describió para la muestra total y por especie.

2.2.16 Consideraciones éticas

Previamente al ingreso de cada paciente al estudio, se obtuvo su consentimiento informado, firmado por el paciente o su familiar responsable.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Pacientes

En el lapso de 23 meses desde enero de 1996 a noviembre de 1997 se captaron un total de 189 pacientes internados en las Unidades críticas del Hospital Universitario con cateterización de las vías urinarias. Treinta y tres se excluyeron debido a que al momento de su identificación se documentó que ya estaban colonizados por levaduras y otros 2 pacientes por estar recibiendo tratamiento con antifúngicos.

Un total de 149 (81%) pacientes fueron vigilados durante su estancia intrahospitalaria, sin embargo en un tiempo promedio de 4.6 días hasta su egreso o el retiro de la sonda urinaria no desarrollaron candiduria. Ciento veinte dejaron de ser evaluables durante el seguimiento: 66 (55%) por retiro de la sonda urinaria, 44 (36%) por fallecimiento, 2 (3.3%) por traslado, 1 (1.66%) por alta voluntaria y 1 (1.66%) porque desarrolló una micosis pulmonar que requirió tratamiento con antifúngicos.

Un total de 29 pacientes se siguieron hasta el desarrollo de colonización urinaria por *Candida*, lo cual correspondió a un 19% de los pacientes incluídos. La candiduria se detectó en un tiempo promedio de 6.6 días, dos días más que los pacientes eliminados del seguimiento.

De los pacientes que se incluyeron 17 fueron del sexo masculino y 12 del sexo femenino, con un intervalo de edad entre 16 y 80 años, con una mediana de 44 años.

Los factores de riesgo que fueron identificados en nuestro grupo de pacientes fueron los siguientes, 28 (96%) estaban recibiendo antibióticos, 10 (35%) tenían diabetes mellitus, 24 (83%) tenían cirugía previa y 4 (14%) tenían enfermedad inmunosupresora (cáncer).

De los 29 pacientes evaluados, se obtuvieron 30 pares de cepas ya que uno de los pacientes desarrolló candiduria simultáneamente por dos especies de levaduras, por lo cual se obtuvieron 30 levaduras colonizantes de las vías urinarias, para cada una de las cuales se emparejó con una levadura aislada simultáneamente del intestino.

En los casos en que se aislaron dos o más levaduras en heces con una sola levadura en orina ó viceversa se eligió la cepa de la misma especie y la otra se descartó.

Las 30 especies de levaduras aisladas en orina fueron:

Candida tropicalis	17 (56%)
Candida glabrata	6 (20%)
Candida albicans	4 (13%)
Candida parapsilosis	1 (3%)
Trichosporon cutaneum	1 (3%)
Trichosporon beigelli	1 (3%)

3.2 Cepas colonizantes y cepas Infectantes

En los 30 casos de candiduria, el 57% (17) desarrollaron colonización urinaria que previamente fue definida como una cuenta menor a 10,000 UFC/mL. En estos 17 casos las cuentas fluctuaron entre 1,100 y 8,333 UFC/mL, con una cuenta mediana de 2,000 UFC/mL. En los trece casos restantes (43%) la magnitud de las cuentas de levaduras rebasó 10,000 UFC/mL catalogándose como infección urinaria, con cuentas desde 11,000 hasta 1 X 10^8 UFC/mL.

De los 17 casos de colonización, 8 (47%) progresaron a infección en el transcurso de su seguimiento, completándose un total de 21 casos de infección urinaria por levaduras.

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

Al comparar las características clínicas de los pacientes en los que ocurrió solamente colonización urinaria y los que desarrollaron infección encontramos que la edad mediana en los primeros fue de 40 vs 53 en los infectados.

El comportamiento de las diferentes especies de levaduras para el desarrollo de colonización ó infección fue: *Candida tropicalis* causó infección urinaria en 12 (70%) y en 5 (30%) solamente se encontró como colonizante, en el caso de *Candida glabrata* las 6 (100%) cepas aisladas se encontraron causando infección urinaria, mientras que *Candida albicans* solamente en 1 (25%) se encontró como causante de infección urinaria. Ambas especies de

Trichosporon causaron infección urinaria y *Candida parapsilosis* solamente se presentó como colonización. En la tabla I se muestra la comparación de las cepas:

Tabla I.- Comparación de factores clínicos y microbiológicos entre las cepas colonizantes contra cepas infectantes

	COLONIZANTES	INFECTANTES
	n=9 (30%)	N=21 (70%)
Edad	Mediana = 40	Mediana = 53
Tiempo de estancia	Media=9.6	Media=11.0
Sexo Masculino Femenino	6 (67%) 3 (33%)	11 (52%) 10 (48%)
Diabetes mellitus	6.7%	20%
Número de antibióticos	0-4	1-6
Inmunosupresores	10%	30%
Días de estancia previos	Media = 7.3	Media = 8.1
Candida tropicalis	5 (30%)	12 (70%)
Candida glabrata	0 (0%)	6 (100%)
Candida albicans	3 (75%)	1 (25%)
Candida parapsilosis	1 (100%)	0 (0%)
Trichosporon beigelli	0 (0%)	1 (100%)
Trichosporon cutaneum	0 (0%)	1 (100%)

3.3.1 Comparación de especies

De las 17 especies de *Candida tropicalis* encontradas en orina, 15 fueron concordantes (C) con la especie encontrada en heces y en 2 se encontró una especie discordante (D) en heces, en un caso *Candida glabrata* y en el otro *Candida albicans*.

En los 6 casos de *Candida glabrata* en 4 hubo concordancia con la cepa de heces, mientras que en dos casos la especie aislada en heces fue *Trichosporon spp.*

En los 4 casos de *Candida albicans* hubo concordancia de la cepa de orina y heces, en *Candida parapsilosis* y en las especies de *Trichosporon* también hubo concordancia. (Tabla II)

Tabla II Comparación fenotípica de los pares de cepas de levaduras aisladas de orina y heces.

CASO	PAC.	CEPA DE ORINA	CEPA DE HECES	RELACION
1	JLP	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
2	PNM	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
3	FHM	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
4	RLH	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
5	CGO	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
6	NMC	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
7	GPG	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
8	ROS	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
9	SQQ	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
10	EGR	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
11	JLHS	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
12	JLG	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
13	RPM	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
14	MIV	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
15	RCM	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*	Concordante
16	PRC	*Candida tropicalis*	*Candida glabrata*	**Discordante**
17	MCM	*Candida tropicalis*	*Candida albicans*	**Discordante**
18	VIH	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	Concordante
19	GLP	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	Concordante
20	HGM	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	Concordante
21	RLH	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*	Concordante
22	MAA	*Candida glabrata*	*Trichosporon spp*	**Discordante**
23	FUZ	*Candida glabrata*	*Trichosporon beigelli*	**Discordante**
24	MLR	*Candida albicans*	*Candida albicans*	Concordante
25	ECS	*Candida albicans*	*Candida albicans*	Concordante
26	PGE	*Candida albicans*	*Candida albicans*	Concordante
27	FZC	*Candida albicans*	*Candida albicans*	Concordante
28	CFE	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*	Concordante
29	JGC	*Trichosporon beigelli*	*Trichosporon beigelli*	Concordante
30	FGV	*Trichosporon cutaneum*	*Trichosporon cutaneum*	Concordante

La concordancia fenotípica fue del 86%.

3.4. Análisis genotípico de los pares de cepas concordantes

Se procedió a la extracción del DNA de los 26 pares de cepas concordantes fenotípicamente. Para la extracción del DNA de las especies de *Candida* y *Trichosporon* se realizó por la técnica del TSNT, la cual fue modificada en su fase inicial que pretende logra la formación de esferoplastos (células sin pared) por lo que fue necesario utilizar la enzima liticasa para causar lisis de la pared en un tiempo de hasta 8 horas, para posteriormente proceder a la extracción del DNA siguiendo la técnica del TSNT. En la figura 6, como ejemplo se muestran los resultados obtenidos en 11 de los casos.

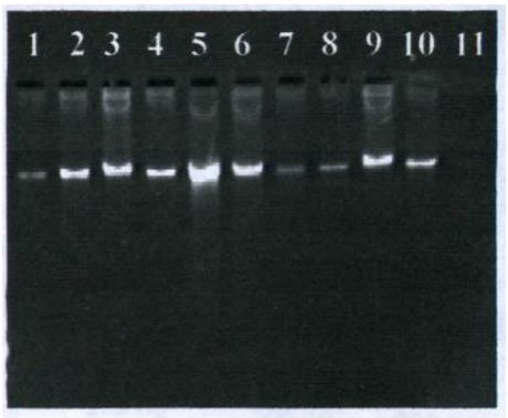


Figura 6.- Demostración de la obtención del DNA. Se muestran 11 cepas de heces y orina de diferentes pacientes: 20-O, 19-O, 25-O, 26-H, 24-H,7-H, 29-O, 20-O, 25-H, 26-O y 30-H. Carriles del 1 al 11 respectivamente.

Para proceder a la técnica de amplificación al azar de acuerdo a la técnica de Lehmann y col [32], se procedió inicialmente a la estandarización del método, para lo cual se realizaron diversas modificaciones en las concentraciones de iniciadores, concentración de *Taq* DNA polimerasa y concentración del DNA. En la figura 7 se muestran los resultados del experimento con las diferentes condiciones utilizadas:

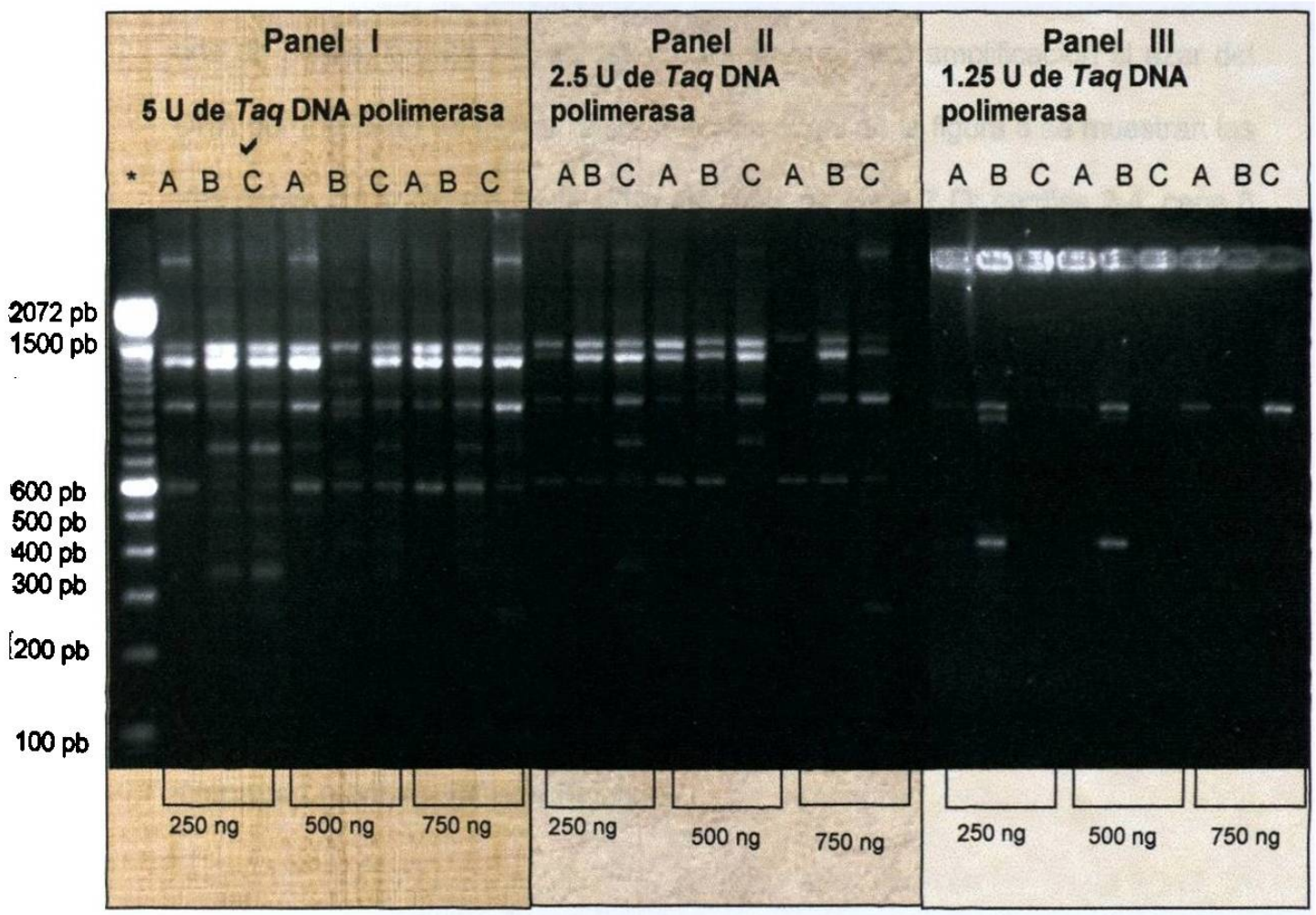


Figura 7.- Resultados de la estandarización de la técnica de amplificación al azar. Se probaron diferentes concentraciones de iniciadores 1μM (A),2 μM (B), y 3 μM, (C), y cantidad de *Taq* DNA polimerasa: 5, 2.5 y 1.25 Unidades y de DNA: 250, 500 y 750 ng. *Marcador de 100 pb

Las condiciones que lograron mayor cantidad de bandas y con mejor definición fueron: 250 ng de DNA, 5 Unidades de *Taq* DNA polimerasa y 3 μM de cada iniciador, que se identifica con una flecha en el cuarto carril (Panel I) de la figura 7.

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

Se seleccionaron al azar tres cepas de *Candida tropicalis* (2 de orina y una de heces) a cada una de las cuales se le realizó amplificación al azar del DNA por triplicado en fechas diferentes. En el gel de la figura 8 se muestran las tres cepas por triplicado de la siguiente manera: cepa 7 O: carriles 2-4, cepa 8 O: carriles 5-7 y cepa 14 H: carriles 8-10 y el marcador de 100 pb: carril 1, de uno de los experimentos. A cada una de las bandas se definió su intensidad y su tamaño. La intensidad neta se midió en un sistema analizador de geles y posteriormente se calculó la intensidad relativa, con la primera banda de cada carril; además se calculó el tamaño de cada banda de acuerdo a la metodología previamente descrita. Se procedió a calcular el coeficiente de variación inter e intra-ensayo para cada uno de estos tres parámetros: intensidad neta, intensidad relativa y tamaño de banda.

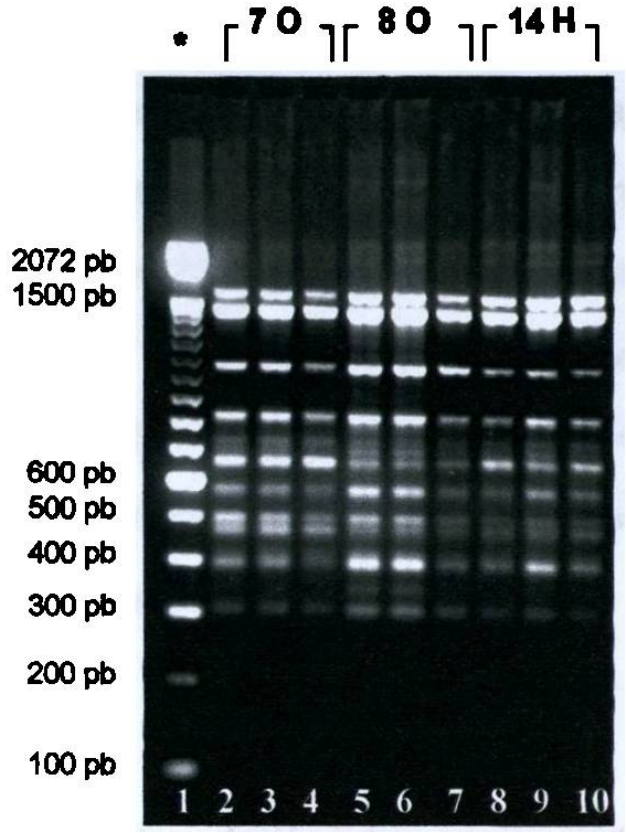


Figura 8.- Amplificación de 3 cepas de *Candida tropicalis* seleccionadas al azar, 7 O, carriles 2, 3 y 4, 8 O carriles 5, 6 y 7 y 14 H carriles 8, 9 y 10, las cuales fueron evaluadas por triplicado para el análisis de reproducibilidad. Carril 1 Marcador de 100 pares de bases.

3.4.2 Variabilidad intraensayo

El número de bandas para este análisis fue de 10 con un tamaño de 1691, 1537, 1154, 895, 740, 694, 592, 474, 392, y 294 pb para la cepa 7 O. En la tabla III se muestran todos los tamaños de las bandas para las 3 cepas, 7 O, 8 O y 14 H, en esta misma tabla se encuentran también los coeficientes de variación por banda, los cuales se observa que van de 2.4 a 5.1% para la cepa 7 O, de 1.22 a 7.20% para la cepa 8 O y de 2.39 a 3.6% para la cepa 14 H. Se comparó además la intensidad absoluta de todas las bandas de cada cepa con su correspondiente de cada uno de los 3 geles.

En la tabla IV se muestran las intensidades absolutas de cada una de las 10 bandas de la cepa 7 O en los tres geles. Por ejemplo: la banda 1 de la misma cepa (7 O) en los tres experimentos diferentes la intensidad fluctuó desde 12007, 12731 y 4738 calculándose un coeficiente de variación de 45%. En los experimentos por triplicado para esta misma banda los coeficientes variaron entre 47 y 41%; y observándose coeficientes de 44, 48, 66, 155, 67, 125, 72, 74 y 40% para cada una de las 10 bandas sucesivamente, así mismo se analizaron las cepas 8 O y 14 H.

Tabla III Coeficiente de variación intraensayo por el tamaño de la banda en pares de bases.

				PROM	DE	CV	CV	CV
	GEL 1	GEL 2	GEL 3					
	7 O	7 O	7 O				8 O	14 H
B1	1691	1612	1651	1651.33	39.50	**2.4%**	**1.22%**	**2.39%**
B2	1537	1478	1401	1472.00	68.20	**4.6%**	**1.03%**	**3.07%**
B3	1154	1108	1051	1104.33	51.60	**4.7%**	**1.04%**	**2.77%**
B4	895	855	821	857.00	37.04	**4.3%**	**3.56%**	**2.81%**
B5	740	784	697	740.33	43.50	**5.9%**	**3.89%**	**3.24%**
B6	694	679	616	663.00	41.39	**6.2%**	**4.61%**	**2.96%**
B7	592	588	545	575.00	26.06	**4.5%**	**4.86%**	**6.16%**
B8	474	481	492	482.33	9.07	**1.9%**	**4.62%**	**4.62%**
B9	392	404	376	390.67	14.05	**3.6%**	**6.17%**	**2.37%**
B10	294	312	282	296.00	15.10	**5.1%**	**7.20%**	**3.60%**

Tabla IV Coeficiente de variación intraensayo calculado por la intensidad absoluta de cada una de las bandas.

				PROM	DE	CV	CV	CV
						GEL 1 (2-3)	GEL 1 (2-3)	GEL 1 (2-3)
	IN	IN	IN			7 O	8 O	14 H
B1	12007	12731	4738	**9825.5**	**4420.5**	**45% (41-47)**	61%(53-41)	74%(80-98)
B2	35813	35303	14021	28379	12436.8	44%(44-51)	44%(53-26)	67%(66-76)
B3	18267	17047	6110	13808.1	6694.4	48%(36-52)	43%(40-33)	71%(19-52)
B4	8162	7249	21773	12394.9	8134.8	66%(53-72)	21%(5-54)	66%(75-94)
B5	874	1255	27703	9944.4	15380.9	155%(46-150)	63%(65-60)	144%(129-129)
B6	5908	5565	16499	9324	6216	67%(62-67)	102%(79-143)	70%(30-36)
B7	2009	2437	19377	7940.9	9906.0	125%(132-148)	98%(105-44)	119%(138-102)
B8	4517	3635	12756	6969.3	5031	72%(107-137)	112%(124-124)	151%(149-147)
B9	3715	3738	12106	6519.6	4837.7	74%(87-113)	72%(45-40)	126%(122-102)
B10	2696	3099	5481	3758.6	1504.9	40%(36-77)	83%(69-15)	131%(146-144)

* En el apéndice E se muestran las tablas completas con todos los valores de intensidades y tamaños de bandas y sus cálculos de promedios y desviaciones estándar en los diferentes experimentos.

3.4.3 Variabilidad interensayo

En este análisis se obtuvieron un total de 10 bandas, con tamaños de 1691, 1537, 1154, 895, 740, 694, 592, 474, 392, y 294 pb para la cepa 7 O en los carriles 1,2 y 3. El tamaño de las bandas para la cepa 8 O carriles 1,2 y 3 y la cepa 14 H carriles 1, 2 y 3 se muestra en la tabla V, así como el coeficiente de variación entre las mismas. El tamaño de banda en las 3 repeticiones de la

misma cepa no mostró diferencias, lo que representó un coeficiente de variación interensayo de 0%.

En la variación interensayo se comparó la intensidad relativa de todas las bandas entre los tres carriles (repeticiones de la misma cepa) en el mismo experimento y para tres cepas distintas: 7-0, 8-0 y 14 H. En la tabla VI se muestran las intensidades relativas de cada una de las 10 bandas de las tres repeticiones de la cepa cepa 7 O y su variación interensayo, así como las variaciones para las cepas 8-0 y 14 H. Por ejemplo: las intensidades relativas de la segunda banda en los tres carriles fueron 3.0, 3.2 y 2.9, calculándose un coeficiente de variación de 6%.

Tabla V Coeficiente de variación interensayo por el tamaño de la banda en pares de bases.

	GEL 1	PROM	DE	CV	GEL 1	CV	GEL 1	CV
	CARRIL 2, 3 y 4				CARRIL 4, 5 y 6		CARRIL 7, 8 y 9	
	7-0				8-0		14 H	
B1	1691	1691	0	0%	1638	0%	1691	0%
B2	1537	1537	0	0%	1489	0%	1489	0%
B3	1154	1154	0	0%	1118	0%	1154	0%
B4	895	895	0	0%	840	0%	867	0%
B5	740	740	0	0%	764	0%	717	0%
B6	694	694	0	0%	651	0%	672	0%
B7	592	592	0	0%	538	0%	521	0%
B8	474	474	0	0%	455	0%	445	0%
B9	392	392	0	0%	367	0%	379	0%
B10	294	294	0	0%	285	0%	294	0%

Tabla VI Coeficiente de variación interensayo calculado por la intensidad relativa de cada una de las bandas.

				PROM	DE	CV	CV	CV
						7 O	8 O	14 H
BANDA 1*	1	1	1					
BANDA 2	3.0	3.2	2.9	3.0	0.17	6%	8%	9%
BANDA 3	1.5	1.5	1.0	1.36	0.28	21%	26%	19%
BANDA 4	0.7	0.76	0.6	0.69	0.07	10%	21%	17%
BANDA 5	0.07	0.09	0.1	0.09	0.01	15%	89%	31%
BANDA 6	0.5	0.5	0.75	0.58	0.14	25%	45%	46%
BANDA 7	0.16	0.17	0.08	0.14	0.05	34%	52%	56%
BANDA 8	0.37	0.31	0.17	0.29	0.1	35%	33%	24%
BANDA 9	0.30	0.29	0.26	0.29	0.02	7%	40%	14%
BANDA 10	0.22	0.24	0.28	0.25	0.03	12%	30%	32%

* Banda de referencia

Se observa que la máxima variación en la intensidad relativa de las bandas en las tres repeticiones de la cepa 7 O fue de 35%, para la cepa 8 O de 89% y para la cepa 14 H de 56%.

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

Se obtuvieron un total de 17 pares de *Candida tropicalis*, de los cuales 15 fueron concordantes por especie, por lo cual de éstos se procedió a realizar su análisis genotípico.

3.5.1 Selección de iniciadores

Primeramente se procedió a seleccionar los iniciadores, entre 4 de ellos y 6 mezclas de los mismos, numerados de acuerdo a los carriles 1 al 10 de la

figura 9. Se seleccionaron los que presentaron mayor número de bandas y en consecuencia permitieron un mayor poder discriminatorio, que fueron el iniciador RP4-2 (carril 4) y la mezcla RP2/RP1-4 (carril 10).

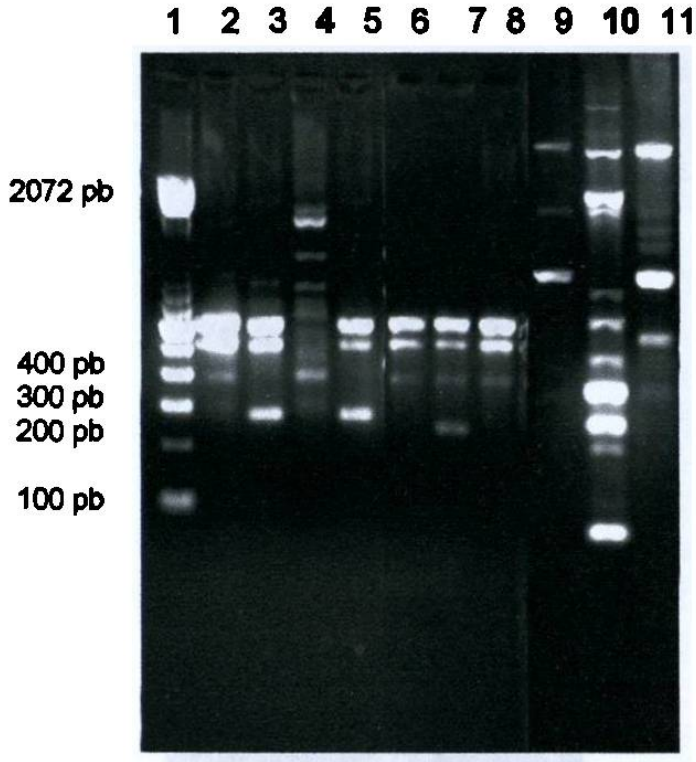


Figura 9.- Selección de iniciadores para *Candida tropicalis*. Los carriles 2 al 5 muestran el resultado de los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4, respectivamente, y en seguida las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4, respectivamente. El carril 1 corresponde al marcador de 100 pares de bases.

3.5.2 Comparación genotípica de las cepas de *Candida tropicalis*

Se realizó el análisis genotípico de los 15 pares de cepas de *Candida tropicalis* que fueron concordantes. En la figura 10 se muestran solamente 4 ejemplos de las mismas. Al realizar el ensayo con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 y a 36°C se obtuvieron un total de 10 bandas en cada cepa y al compararlas individualmente observamos que su tamaño fluctúa entre 2006 y

214 pb para las cepas 1 y 2, y entre 1920 y 214 pb para las cepas 9 y 10. En cuanto a la persistencia de las bandas entre cada una de ellas se observa que las bandas de 1542, 764, 614, 363 y 214 pb se presentan en todas las cepas; mientras que las bandas de 994, 515 y 318 pb se presentan en el 75% de las cepas, como se muestra en la tabla VII.

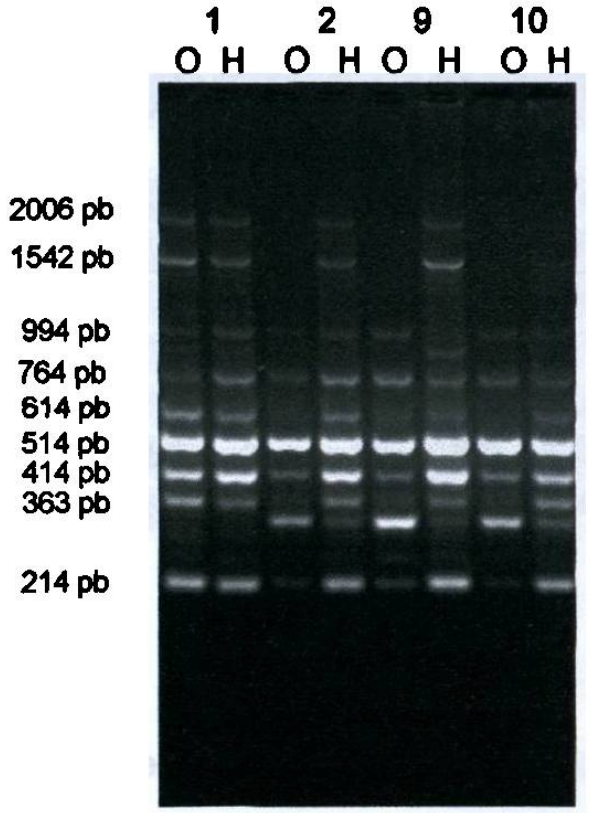


Figura 10.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* de orina y heces (1, 2 9 y 10) con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 a 36°C.

Tabla VII Tamaño de las bandas de los cuatro pares de cepas clínicas 1, 2, 9 y 10 de *Candida tropicalis* (orina y heces) con la mezcla de iniciadores RP-2/RP1-4, a 36°C. Las bandas totalmente consistentes se señalan en negritas y se subrayaron las que sólo se presentaron en el 75% de las veces.

	1 O	1 H		2 O	2 H		9 O	9 H		10 O	10 H
B1	2006	2006	B1	2006	2006	B1	1920	1920	B1	1920	1920
B2	**1542**	**1542**	B2	**1542**	**1542**	B2	**1542**	**1542**	B2	**1542**	**1542**
B3	994	994	B3	994	994	B3	911	911	B3	995	995
B4	872	872									
B5	**764**	**764**	B4	**764**	**764**	B4	**764**	**764**	B4	**764**	**764**
B6	**614**	**614**	B5	**614**	**614**	B5	**614**	**614**	B5	**614**	**614**
B7	515	515	B6	515	515	B6	515	515	B6	493	493
B8	414	414	B7	432	432	B7	432	432	B7	414	414
B9	**363**	**363**	B8	**363**	**363**	B8	**363**	**363**	B8	**363**	**363**
			B9	318	318	B9	318	318	B9	318	318
B10	**214**	**214**	B10	**214**	**214**	B10	**214**	**214**	B10	**214**	**214**
	L c J			L c J			L c J			L c J	

Posteriormente se realizó el ensayo con el iniciador RP4-2 a la temperatura de apareamiento de 36°C y se compararon los 4 pares de cepas clínicas de *Candida tropicalis.* En la figura 11 podemos observar que todas las cepas tienen igual número de bandas (13) cuyo tamaño (en pares de bases) fluctúa entre 1884 y 249 para la cepa 1 y entre 1884 y 282 para las cepas 2, 9 y 10. Al comparar las cepas entre sí observamos que las bandas de 1884, 1299, 973, 569 y 333 pb fueron consistentes en el 100% de las cepas. Las bandas de 1148, 729, 644, 426, 377 y 282 se presentan en el 75% de las cepas, según se muestra en la tabla VIII.

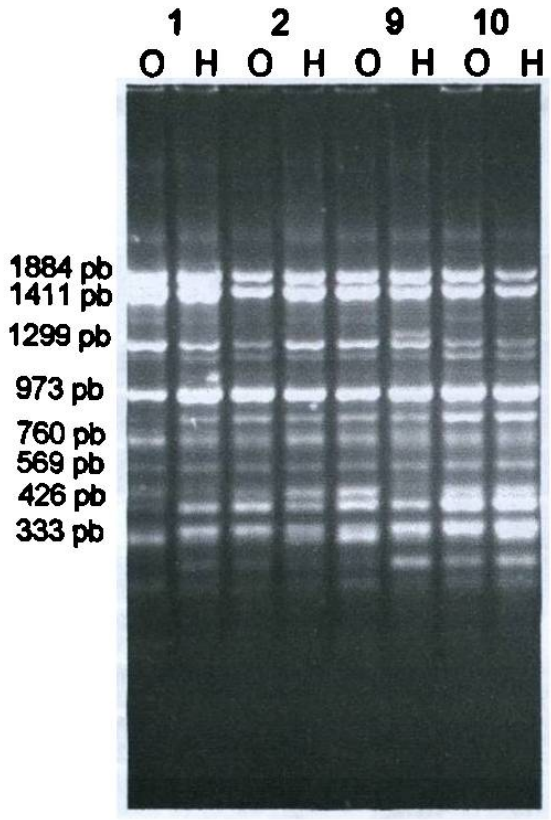


Figura 11.- Comparación genotípica de 4 pares de cepas clínicas de *Candida tropicalis* (orina y heces) (1,2 9 y 10) con el iniciador RP4-2 a la temperatura de apareamiento de 36°C.

Tabla VIII Tamaño de las bandas de los cuatro pares de cepas clínicas 1, 2, 9 y 10 de *Candida tropicalis* (orina y heces) con el iniciador RP4-2 a 36°C de temperatura de apareamiento. Las bandas 100% consistentes se señalan en negritas y aquellas que se observaron en el 75% de las cepas se subrayaron.

	1 O	1 H		2 O	2 H		9 O	9 H		10 O	10 H
B1	**1884**	**1884**	B1	**1884**	**1884**	B1	**1884**	**1884**	B1	**1884**	**1884**
B2	1411	1411	B2	1411	1411	B2	1471	1471	B2	1471	1471
B3	**1299**	**1299**	B3	**1299**	**1299**	B3	**1300**	**1300**	B3	**1299**	**1299**
B4	1148	1148				B4	1148	1148	B4	1148	1148
B5	**973**	**973**	B4	**973**	**973**	B5	**973**	**973**	B5	**973**	**973**
			B5	896	896						
B6	760	760	B6	729	729	B6	729	729	B6	729	729
			B7	644	644	B7	644	644	B7	644	644
B7	**569**	**569**	B8	**569**	**569**	B8	**569**	**569**	B8	**596**	**596**
B8	503	503	B9	463	463	B9	482	482	B9	482	482
B9	426	426	B10	409	409	B10	426	426	B10	426	426
B10	392	392	B11	377	377	B11	377	377	B11	377	377
B11	**333**	**333**	B12	**333**	**333**	B12	**333**	**333**	B12	**333**	**333**
B12	294	294	B13	282	282	B13	282	282	B13	282	282
B13	249	249									
	L c J			L c J			L c J			L c J	

Debido a que en las 4 cepas se presentaron una gran cantidad de bandas lo que indicaba muy poca resolución, se procedió a hacer el mismo experimento con un iniciador, solamente variando la temperatura de apareamiento a 45°C. Al variar esta temperatura el número de bandas disminuyó por lo cual fue posible obtener una mejor interpretación en los resultados. En la figura 12 se presentan los resultados con el iniciador RP4-2 a la temperatura de apareamiento de 45°C, podemos observar que el número de

bandas para las 4 cepas es diferente, para la cepa 1 es de 9 con un tamaño que varía entre 3293 y 611 pb, la cepa 2 presenta únicamente 3 bandas de 1600, 833 y 590 pb, la cepa 9 tiene 6 bandas que varían de 2170 a 611 pb y la cepa 10 tiene 7 bandas que van desde 2036 hasta 570 pb.

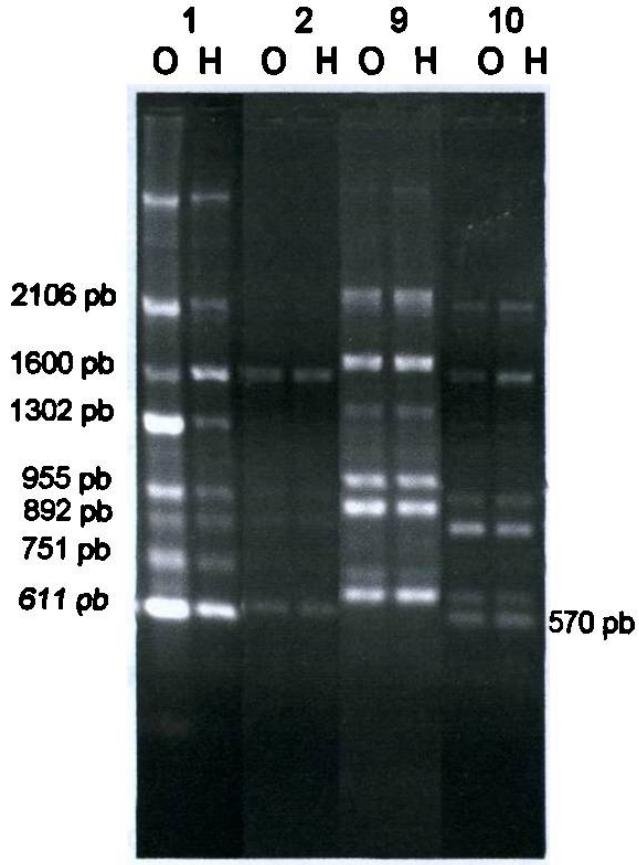


Figura 12.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* (orina y heces) (1,2 9 y 10) con el iniciador RP4-2 a 45°C.

Al comparar las cepas entre sí observamos que solamente una banda se presenta en el 100% de las cepas la de 1,600 pb. La bandas de 611 se presenta en un 75%, estos resultados se muestran en la tabla IX.

Tabla IX Tamaño de las bandas de los cuatro pares de cepas clínicas 1, 2, 9 y 10 de *Candida tropicalis* obtenidas de las muestras de orina y heces con el iniciador RP4-2 a 45°C. Las bandas en negrita se presentan en un 100%, las bandas subrayadas representan un 75%.

	1 O	1 H		2 O	2 H		9 O	9 H		10 O	10 H
B1	3293	3293									
B2	2106	2106				B1	2170	2170	B1	2036	2036
B3	**1600**	**1600**	B1	**1600**	**1600**	B2	**1601**	**1601**	B2	**1601**	**1601**
B4	1302	1302	B2	*833*	*833*	B3	1302	1302	B3	1546	1546
B5	1174	1174	B3	590	590	B4	989	989	B4	923	923
B6	955	955				B5	892	892	B5	833	833
B7	892	892									
B8	751	751									
B9	611	611				B6	611	611	B6	611	611
									B7	570	570
	C			C			C			C	

3.5.3 Demostración de dos pares de cepas discordantes.

En dos cepas no hubo concordancia en su patrón genético, en la figura 13 se muestran los resultados de la cepa 12 la cual presentó diferente patrón genotípico en orina y heces. En el panel A se muestran las cepas de orina y heces con el iniciador RP4-2, en el panel B se muestran las mismas cepas con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4, ambos a la temperatura de apareamiento de 36°C. En el panel C se presenta la misma cepa con el iniciador RP4-2 pero con una temperatura de apareamiento de 45°C.

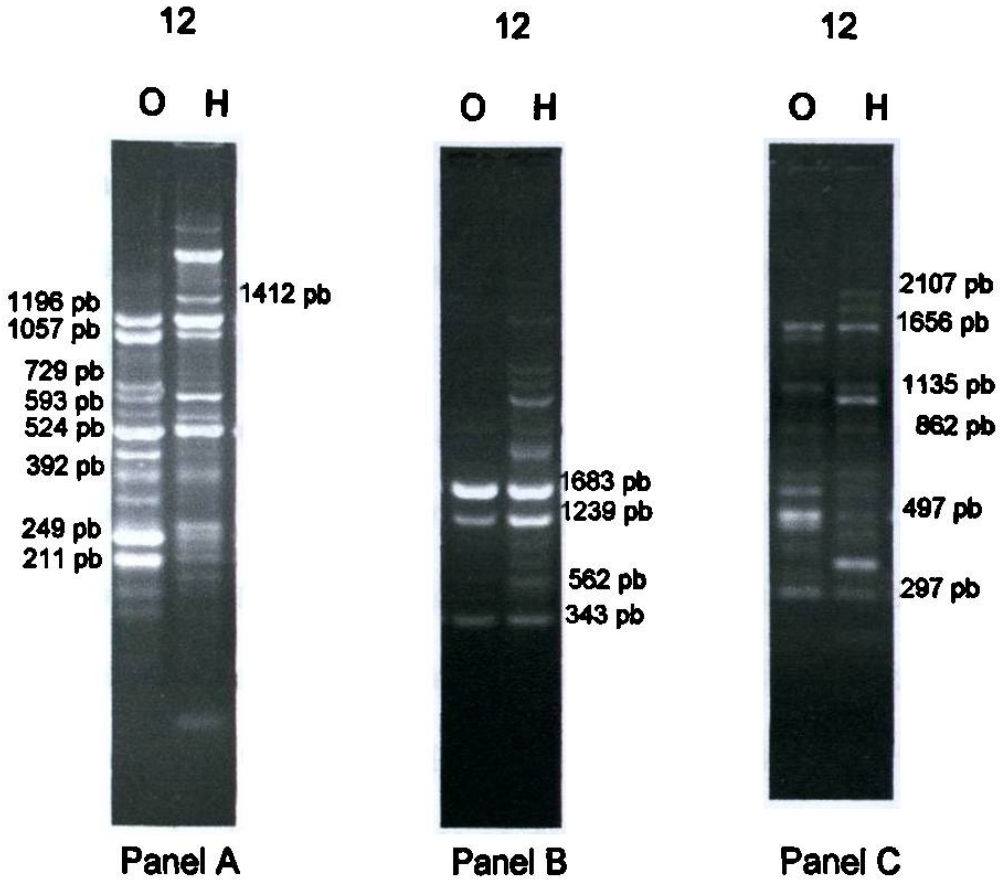


Figura 13.- Comparación genotípica de una cepa discordante de *Candida tropicalis* de orina y heces (12) con el iniciador RP4-2 (Panel A), con la mezcla de iniciadores RP2-RP1-4 (Panel B) a la temperatura de apareamiento de 36°C y con el iniciador RP4-2 con la temperatura de apareamiento de 45°C (Panel C).

Con un el iniciador RP4-2 se observa que el número de bandas en la cepa de orina es de 13, mientras que en la cepa de heces es de 11, al calcular el tamaño de cada una de las bandas se observa que su tamaño es muy variado en ambas cepas. Para la cepa de orina el tamaño de las bandas varía entre 1196 y 140 pb, mientras que la cepa de heces presenta bandas en un rango de 2316 a 187 pb. Las bandas que están presentes en ambas cepas de orina y heces son, la de 1196 , 593 y 392 pb. El resto de las bandas no corresponden a la misma en la cepa de heces y orina.

Con la mezcla de iniciadores RP-2/RP1-4 se observa que se presentan 8 bandas en ambas cepas (orina y heces), sin embargo solamente 4 bandas corresponden al mismo tamaño, estas bandas son: la de 1683, 1238, 562 y 347 pb. El resto de las bandas es de un tamaño diferente. Estos experimentos se realizaron a la temperatura de apareamiento de 36°C. Al realizar el experimento con el iniciador RP4-2 y a la temperatura de apareamiento de 45°C se obtuvieron para la cepa de orina 11 bandas con un rango entre 1656 y 297 pb, mientras que para la cepa de heces se obtuvieron 13 bandas con un rango de 2107 a 225 pb. Se presentan 5 bandas que son iguales en ambas cepas, la banda de 1656, 1135, 862, 497 y 297 pb, el resto de las bandas es diferente en tamaño, éstos resultados se muestran en la tabla X.

Tabla X Tamaño de las bandas de la cepa 12 discordante de *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 (Panel A), la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (Panel B) a la temperatura de apareamiento de 36°C y con el iniciador RP4-2 a la temperatura de apareamiento de 45°C (Panel C). Las bandas en negritas representan las que son concordantes en ambas cepas, las bandas en cursiva son diferentes para las mismas.

Panel A				Panel B				Panel C			
	12 O	12 H			12 O	12 H			12 O	12 H	
		2316	B1	B1	**1683**	**1684**	B1			*2107*	B1
		1884	B2	B2	**1238**	**1239**	B2			*1967*	B2
		1412	B3			*872*	B3	B1	**1656**	**1656**	B3
B1	**1196**	**1197**	B4			*799*	B4	B2	*1546*		
B2	*1057*	*1102*	B5			*700*	B5	B3	**1135**	**1135**	B4
B3	*729*	*700*	B6	B3	**562**	**562**	B6			*1060*	B5
B4	*671*					*472*	B7	B4	**862**	**862**	B6
B5	**593**	**593**	B7	B4	**347**	**347**	B8	B5	*632*	*655*	B7
B6	*524*	*546*	B8	B5	*279*			B6	*590*	*590*	B8
B7	*463*			B6	*234*			B7	**497**	**497**	B9
B8	**392**	**392**	B9	B7	*188*			B8	*464*	*433*	B10
B9	*319*	*260*	B10	B8	*132*			B9	*404*	*352*	B11
B10	*249*	*220*	B11					B10	*340*		
B11	*211*	*187*	B12					B11	**297**	**297**	B12
B12	*165*									*225*	B13
B13	*140*										
D				D				D			

Un caso similar se presentó en el paciente 15, debido a que sus patrones genéticos fueron diferentes con diferente número de bandas, los resultados obtenidos se muestran en la figura 14.

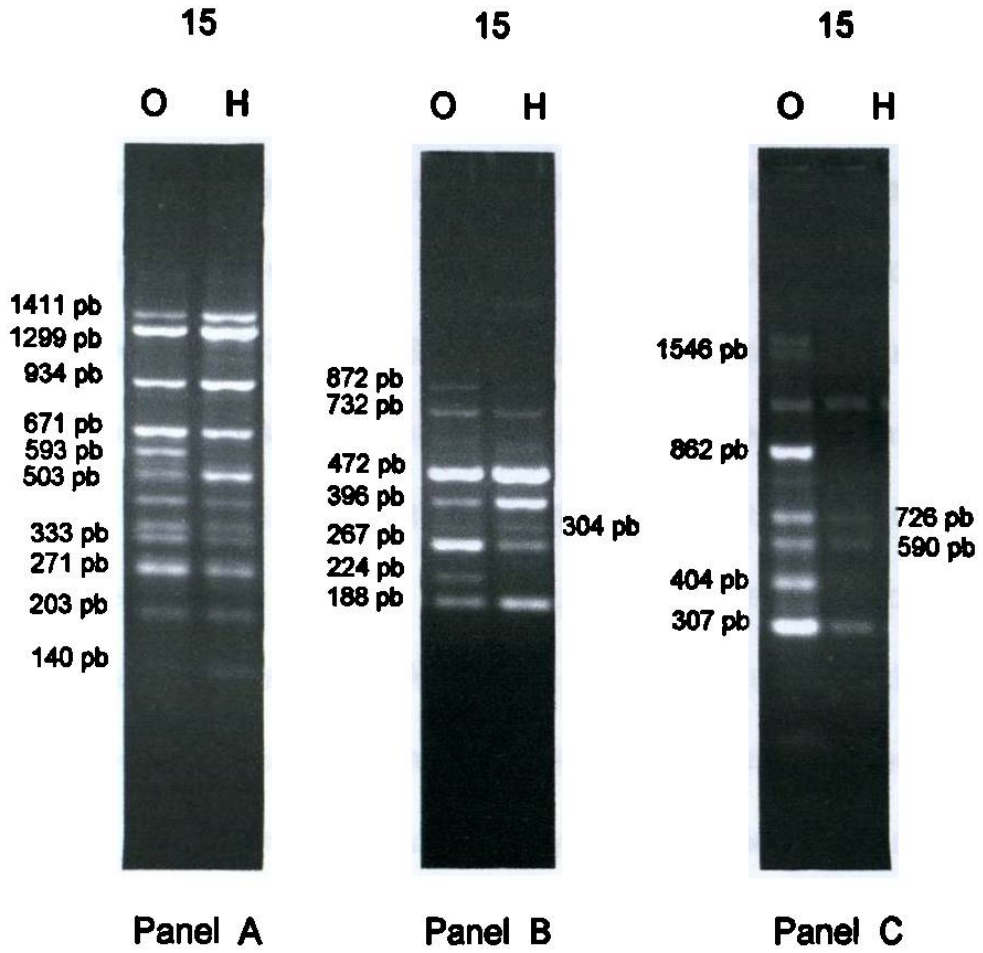


Figura 14.- Comparación genotípica de una cepa discordante de *Candida tropicalis* de orina y heces (15) con el iniciador RP4-2 (Panel A), con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (Panel B) a la temperatura de apareamiento de 36°C y con el iniciador RP4-2 con la temperatura de apareamiento de 45°C (Panel C).

Con un el iniciador RP4-2 se observa que el número de bandas en la cepa de orina es de 12, mientras que en la cepa de heces es de 11, al calcular el tamaño de cada una de las bandas se observa que su tamaño es muy similar en ambas cepas. Para la cepa de orina el tamaño de las bandas varía entre 1411 y 140 pb y en la cepa de heces va de 1412 a 140 pb. En este caso hay similitud en casi todas las bandas, al realizar los cálculos únicamente 1 banda fue diferente, la de 593 pb que está presente en la cepa de orina y ausente en

la de heces. El resto de las bandas es del mismo tamaño. Con la mezcla de iniciadores RP-2/RP1-4 se observa que en la cepa de orina se presentan 8 bandas de un tamaño entre 872 y 188 pb, mientras en la cepa de heces hay 6 bandas de tamaño entre 732 y 188 pb. En ambas cepas se presentan 5 bandas de tamaño 732, 472, 396, 267 y 188 pb, hay dos bandas que están en la cepa de orina que no están presentes en la cepa de heces, éstas son las de 872 y 224 pb, mientras que la cepa de heces presenta una banda de 304 pb que está ausente en la cepa urinaria. Estos experimentos se realizaron a la temperatura de apareamiento de 36°C. Al realizar el experimento con el iniciador RP4-2 y a la temperatura de apareamiento de 45°C se obtuvieron para la cepa de orina 9 bandas con un rango entre 1656 y 307 pb, mientras que para la cepa de heces se obtuvieron 5 bandas con un rango de 1135 a 307 pb. Se presentan 5 bandas que son iguales en ambas cepas, la banda de 1135, 726, 590, 497 y 307 pb. Además en la cepa de orina se presentan 4 bandas más de 1656, 1546, 862 y 404 pb que no están en la cepa de heces, estos resultados se muestran en la tabla XI.

Tabla XI Tamaño de las bandas de la cepa 15 discordante de *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 (Panel A), la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (Panel B) a la temperatura de apareamiento de 36°C y con el iniciador RP4-2 a la temperatura de apareamiento de 45°C (Panel C). Las bandas en negritas representan las que son concordantes en ambas cepas, las bandas en cursiva son diferentes para las mismas.

Panel A

	15 O	15 H	
B1	**1411**	**1412**	B1
B2	**1299**	**1300**	B2
B3	**934**	**934**	B3
B4	**671**	**671**	B4
B5	*593*		
B6	**503**	**503**	B5
B7	**426**	**426**	B6
B8	**361**	**361**	B7
B9	**333**	**333**	B8
B10	**271**	**271**	B9
B11	**203**	**203**	B10
B12	**140**	**140**	B11

D

Panel B

	15 O	15 H	
B1	*872*		
B2	**732**	**732**	B1
B3	**472**	**472**	B2
B4	**396**	**396**	B3
		304	B4
B5	**267**	**267**	B5
B6	*224*		
B7	**188**	**188**	B6

D

Panel C

	15 O	15 H	
B1	*1656*		
B2	*1546*		
B3	**1135**	**1135**	B1
B4	*862*		
B5	**726**	**726**	B2
B6	**590**	**590**	B3
B7	**497**	**497**	B4
B8	*404*		
B9	**307**	**307**	B5

D

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

De los 6 pares de cepas de *Candida glabrata*, en 4 hubo concordancia fenotípica, de éstos se realizó su análisis genotípico.

3.6.1 Selección de iniciadores

Primeramente se seleccionaron los mejores iniciadores para el análisis, se realizó un experimento donde se ensayó a *Candida glabrata* con los iniciadores por separado, así como con las mezclas de los mismos En la figura 15 se puede observar que el iniciador SOY (carril 1) y la mezcla SOY/RP1-4 (carril 7) presentan un mayor número de bandas lo cual nos da un mayor poder discriminatorio para las cepas y por esta razón fueron seleccionados para realizar el análisis genotípico.

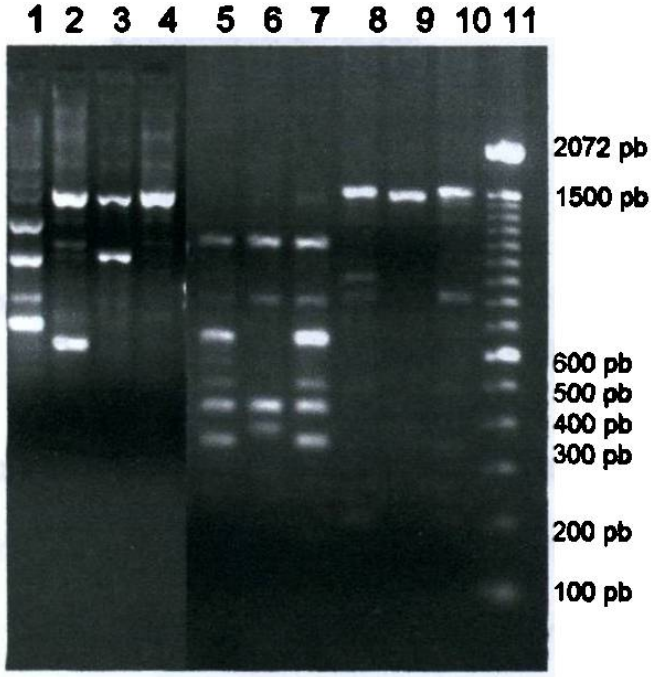


Figura 15.- Selección de iniciadores para *Candida glabrata*. Carril 1al 4 se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 y en los carriles del 5 al 10 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente, en el carril 11 está el marcador de 100 pares de bases.

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

Enseguida se realizó el corrimiento de la cepa control de *Candida glabrata* ATCC 90030 para calcular el número y tamaño de las bandas.

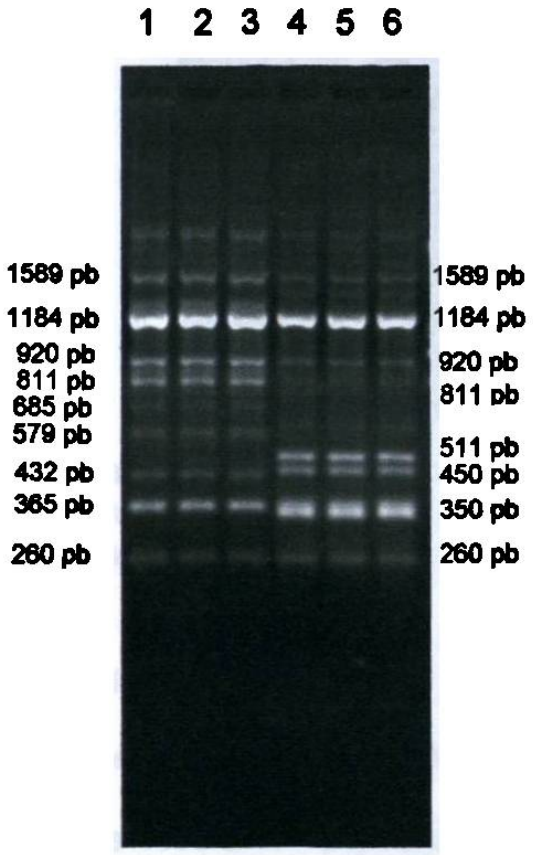


Figura 16.- Cepa control *Candida glabrata* ATCC 90030 con iniciador SOY, carriles 1 al 3 y con la mezcla SOY/RP1-4 en los carriles 4 al 6

3.6.3 Comparación genotípica de las cepas de *Candida glabrata*

Posteriormente se procedió a realizar la identificación genotípica de los pares de cepas de orina y heces de *Candida glabrata*, con el iniciador con el iniciador SOY y a 36°C.