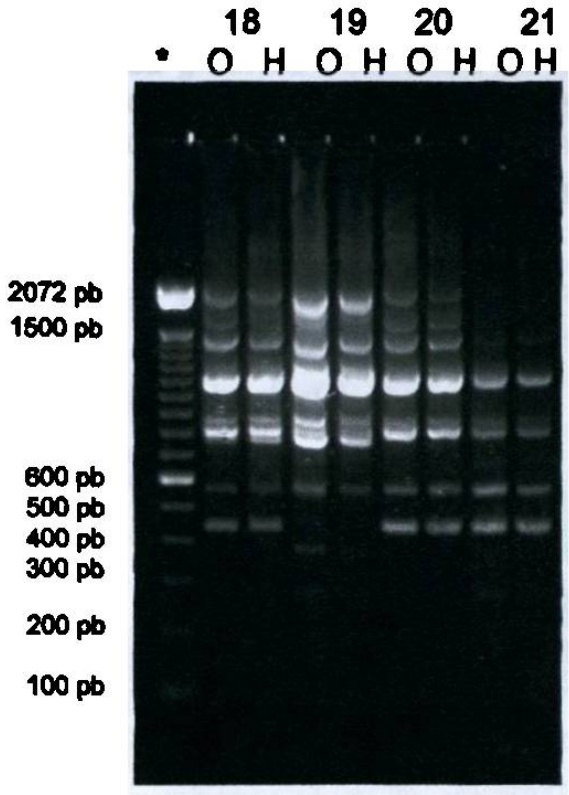

Figura 17.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* de muestras de orina y heces (18, 19, 20 y 21) con el iniciador SOY a 36°C. * Marcador de 100 pb

En la figura 17 podemos observar que para la cepa 18 se presentan un total de 9 bandas que van del rango de 1523 a 289 pb, para la cepa 19 se presentan 8 bandas de 1399 a 174 pb, para la cepa 20 se presentan 7 bandas que van de 1399 a 277 pb y para la cepa número 21 se presentaron también 7 bandas que van de 1084 a 174 pb. En la cepa control ATCC 90030 se presentaron un total de 11 bandas que van de un rango de 2132 a 260 pb. Al comparar estas bandas con la cepa control del ATCC 90030 se encontraron cuatro bandas correspondientes, en las cepas clínicas se presentaron las bandas de 1180, 804, 572 y 374 que corresponden a la banda de 1184, 811, 579 y 365 de la cepa control, estos resultados se muestran en la tabla XII.

Tabla XII Tamaño de las bandas de los cuatro pacientes 18, 19, 20 y 21 para las cepas de *Candida glabrata* obtenidas de las muestras de orina y las heces con el iniciador SOY. En la última columna se presenta la cepa control de *Candida glabrata* ATCC 90030. Las bandas en negritas representan las que son iguales en la cepa control y las cepas clínicas.

	18 O	18 H		19 O	19 H		20 O	20 H		21 O	21 H		ATCC 90030
B1	1523	1523	B1	1399	1399	B1	1399	1399					2132
B2	1285	1285	B2	1039	1039								1589
									B1	1084	1084		1343
B3	1084	1084				B2	**1180**	**1180**	B2	840	840		**1184**
						B3	1039	1039	B3	597	597		920
B4	**804**	**804**	B3	**804**	**804**	B4	771	771	B4	572	572		**811**
B5	623	623	B4	597	597	B5	548	548					685
B6	**572**	**572**	B4	548	548								**579**
B7	548	548											432
B8	**374**	**374**	B6	**374**	**374**	B6	**374**	**374**	B5	**374**	**374**		**365**
B9	289	289	B7	244	244	B7	277	277	B6	290	290		260
			B8	174	174				B7	174	174		
	c			c			c			c			

En la figura 18 se muestra el gel de las 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* con la mezcla de iniciadores SOY/RP1-4, para la cepa 18 se presentan un total de 13 bandas en un rango de tamaño de 2308 a 158 pb, igual que para las cepas 19 y 20 las cuales presentan un total de 13 bandas con un rango de 2228 a 242 pb y 2308 a 158 pb respectivamente. Para el par de cepas 21 se presentaron únicamente 10 bandas con un rango de 1141 a 158 pb. En la cepa control ATCC 90030 se presentaron un total de 10 bandas que con un rango de 2131 a 260 pb. Al comparar estas bandas con la cepa control del ATCC 90030 se encontraron dos bandas correspondientes, en las cepas clínicas se

presentaron las bandas de 802 y 457 que corresponden a la banda de 811 y 450 pb de la cepa control, estos resultados se muestran en la tabla XIII.

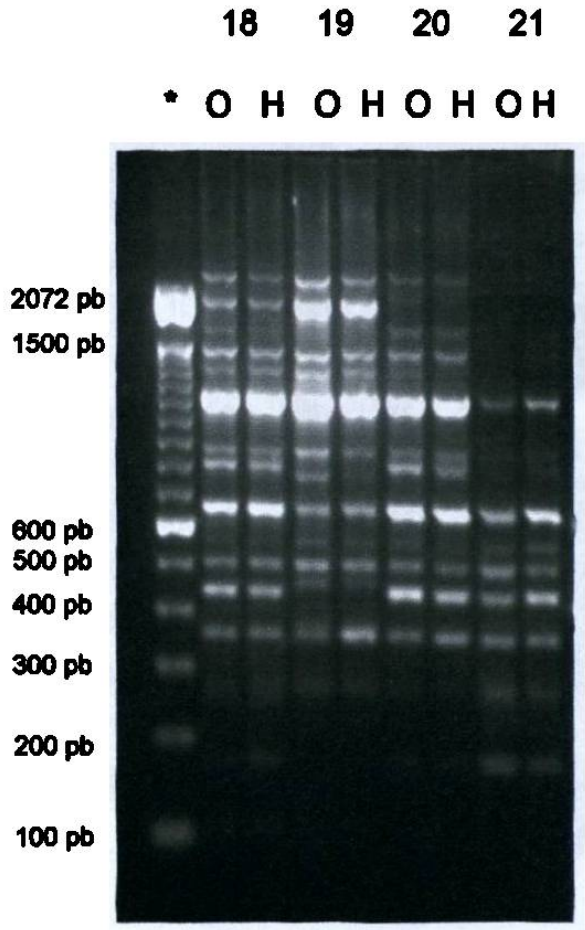

Figura 18.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* de muestras de orina y heces (18, 19, 20 y 21) con mezcla de iniciadores SOY/RP1-4 a 36°C. * Marcador de 100 pb

Tabla XIII Tamaño de las bandas de los cuatro pacientes 18, 19 20 Y 21 para las cepas de *Candida glabrata* obtenidas de las muestras de orina y las heces con la mezcla de iniciadores SOY/RP1-4 a 36°C. En la última columna se presenta la cepa control del ATCC 90030. Las bandas en negritas corresponden a la misma en la cepa control y la cepa clínica.

	18 O	18 H		19 O	19 H		20 O	20 H		21 O	21 H		ATCC 90030
B1	2308	2308	B1	2228	2228	B1	2308	2308					2131
B2	2005	2005	B2	1935	1935	B2	2077	2077					1588
B3	1512	1512	B3	1460	1460	B3	1742	1742					1400
B4	1361	1361	B4	1361	1361	B4	1513	1513	B1	1141	1141		1183
B5	1141	1141	B5	1141	1141	B5	1141	1141	B2	861	861		920
B6	892	892	B6	892	892	B6	892	892					
B7	831	831	B7	774	774	B7	**802**	**802**	B3	**802**	**802**		**811**
B8	649	649	B8	649	649	B8	649	649	B4	627	627		511
B9	473	473	B9	544	544	B9	473	473	B5	507	507		
B10	411	411	B10	473	473	B10	411	411	B6	**457**	**457**		**450**
B11	321	321	B11	425	425	B11	321	321	B7	383	383		350
B12	234	234	B12	321	321	B12	234	234	B8	310	310		260
B13	158	158	B13	242	242	B13	158	158	B9	269	269		
									B10	158	158		
	C			C			C			C			

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

Se obtuvieron un total de 4 aislamientos en orina de *Candida albicans*, y se procedió a hacer su análisis genotípico.

3.7.1 Selección de iniciadores

Primeramente se seleccionaron los mejores iniciadores para el análisis, se realizó un experimento donde se ensayó a *Candida albicans* con los iniciadores individuales, así como con las mezclas de los mismos. En la figura 19 se puede observar que el iniciador RP2 (carril 2) y la mezcla SOY/RP2 (carril 5) 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.

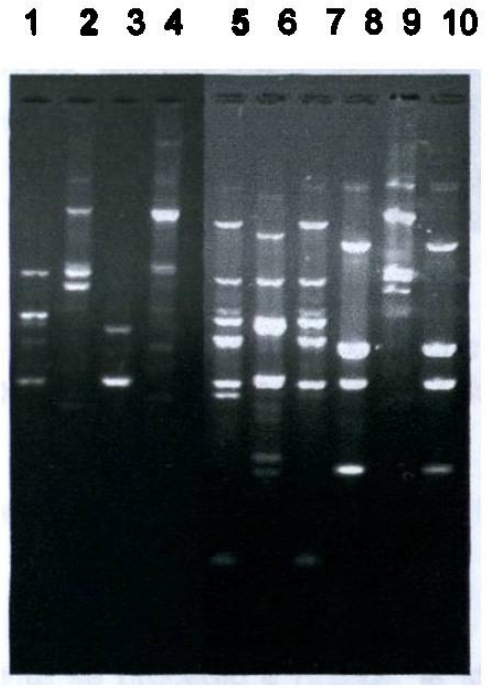

Figura 19.- Selección de iniciadores para *Candida albicans*. Carril 1al 4 se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 y en los carriles del 5 al 10 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente.

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

Enseguida se realizó el corrimiento de la cepa control de *Candida albicans* ATCC 90028 para calcular el número y tamaño de las bandas.

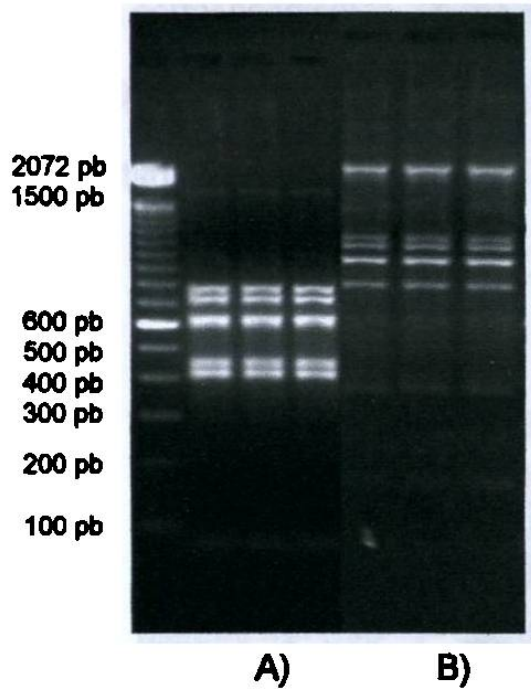

Figura 20.- Cepa control de *Candida albicans* ATCC 90028. A) Mezcla de iniciadores SOY/RP2, B) iniciador RP2

3.7.3 Comparación genotípica de las cepas de *Candida albicans*

Posteriormente se procedió a realizar la identificación genotípica de las cepas y se realizó la comparación de las bandas con la cepa control.

En la figura 21 se muestra el gel de las 4 cepas clínicas de *Candida albicans* con el iniciador RP2, para la cepa 24 se presentan un total de 8 bandas de 1875 a 591 pares de bases, para la cepa 25 se presentan 6 bandas de 1875 a 716 pares de bases, para la cepa 26 se presentan 7 bandas que van de 2756 a 716 pares de bases y para la cepa número 27 solamente se presentó

una banda de 1123 pares de bases. En la cepa control ATCC 90028 se presentaron un total de 11 bandas que van de un rango de 1960 a 186 pares de bases. Al comparar estas bandas con la cepa control del ATCC 90028 se encontraron dos bandas correspondientes, en las cepas clínicas se presentaron las bandas de 987 y 591 que corresponden a la banda de 1001 y 604 de la cepa control, estos resultados se muestran en la tabla XIV.

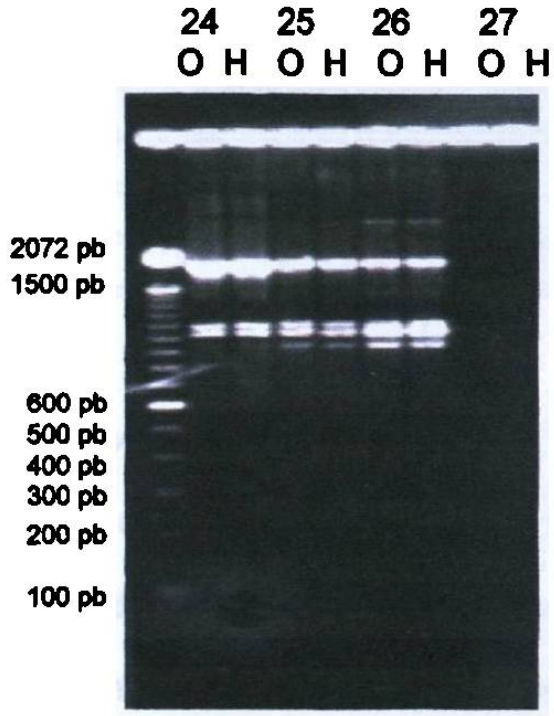

Figura 21.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida albicans* de muestras de orina y de heces (24, 25, 26 y 27) con el iniciador RP2 y a 36°C.

Tabla XIV Tamaño de las bandas de los cuatro pacientes 24, 25, 26 y 27 para las cepas de *Candida albicans* obtenidas de las muestras de orina y las heces con el iniciador RP2 a 36°C. En la última columna se presenta la cepa control del ATCC 90028

	24 O	24 H		25 O	25 H		26 O	26 H		27 O	27 H		ATCC 90028
B1						B1	2756	2756	B1	1123	1123		1960
B2	1875	1875	B1	1875	1875	B2	1875	1875					1657
B3	1450	1450	B2	1451	1451	B3	1451	1451					1400
B4	1196	1196	B3	1197	1197	B4	1197	1197					1184
B5	1122	1122	B4	1122	1122	B5	1123	1123					1088
B6	**987**	**987**	B5	**987**	**987**	B6	**987**	**987**					**1001**
B7	926	926	B6	716	716	B7	716	716					811
B8	716	716											**604**
B9	**591**	**591**											511
B10													365
B11													186
	c			c			c			c			

En la figura 22 se muestra el gel de las 4 cepas clínicas de *Candida albicans* con la mezcla de iniciadores SOY/RP2, para la cepa 24 se presentan un total de 9 bandas de 1744 a 428 pares de bases, para la cepa 25 se presentan 7 bandas de 1744 a 428 pares de bases, para la cepa 26 se presentan 7 bandas que van de 1744 a 428 pares de bases y para la cepa número 27 solamente se presentaron 4 bandas de 810 a 428 pares de bases. En la cepa control ATCC 90028 se presentaron un total de 7 bandas que van de un rango de 1804 a 388 pares de bases. Al comparar estas bandas con la cepa control del ATCC 90028 se encontraron 3 bandas correspondientes, en las cepas clínicas se presentaron las bandas de 1046, 760 y 628 que

corresponden a la banda de 1066, 750 y 629 de la cepa control, estos resultados se muestran en la tabla XV.

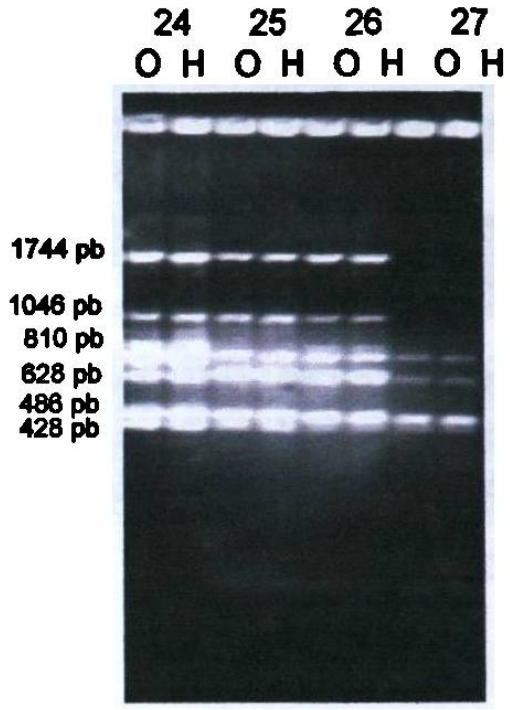

Figura 22.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida albicans* de muestras de orina y de heces (24, 25, 26 y 27) con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C.

Tabla XV Tamaño de las bandas de los cuatro pacientes 24, 25, 26 y 27 para las cepas de *Candida albicans* obtenidas de las muestras de orina y la de heces con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C. En la última columna se presenta la cepa control del ATCC 90028

	24 O	24 H		25 O	25 H		26 O	26 H		27 O	27 H		ATCC 90028
B1	1744	1744	B1	1744	1744	B1	1744	1744					1804
B2	**1046**	**1046**	B2	**1046**	**1046**	B2	**1046**	**1046**					**1066**
B3	921	921	B3	921	921								855
B4	810	810	B4	810	810	B3	810	810	B1	810	810		
B5	**760**	**760**				B4	**760**	**760**					**750**
B6	713	713											
B7	**628**	**628**	B5	669	669	B5	**628**	**628**	B2	**628**	**628**		**629**
B8	486	486	B6	486	486	B6	486	486	B3	486	486		443
B9	428	428	B7	428	428	B7	428	428	B4	428	428		388
	c			c			c			c			

3.8 Análisis genotípico de *Candida parapsilosis*

Se obtuvo únicamente un par de cepas de *Candida parapsilosis* de un paciente.

3.8.1 Selección de iniciadores para *Candida parapsilosis*

Para esta cepa también se seleccionaron los mejores iniciadores, dando como resultado el iniciador RP2 y la mezcla de SOY/RP2 los cuales se presentan en el carril 3 y 6 de la figura 23.

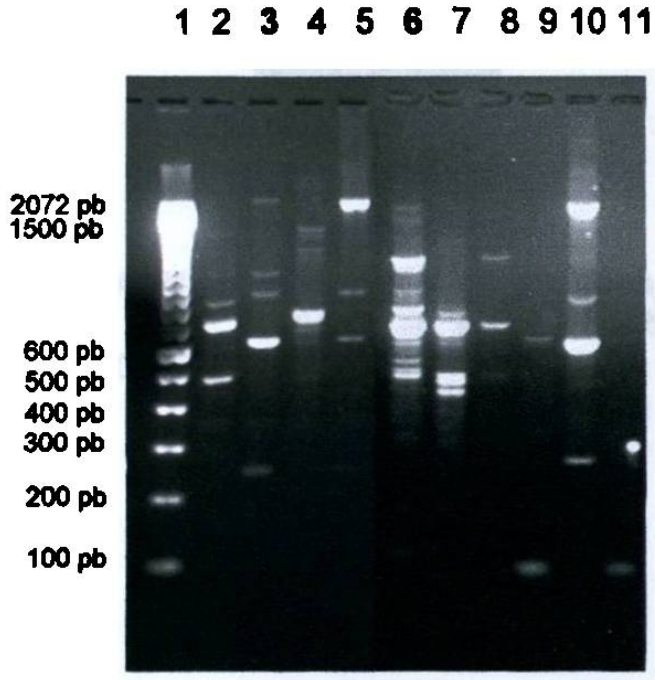

Figura 23.- Selección de iniciadores para *Candida parapsilosis*. Se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 en los carriles del 2 al 5 y en los carriles del 6 al 11 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente, en el carril 1 está el marcador de 100 pares de bases.

Posteriormente se procedió a realizar la amplificación de la cepa control del ATCC 22019 para compararla con la cepa obtenida del paciente para ver si existen bandas concordantes.

3.8.2 Análisis genotípico de la cepa control

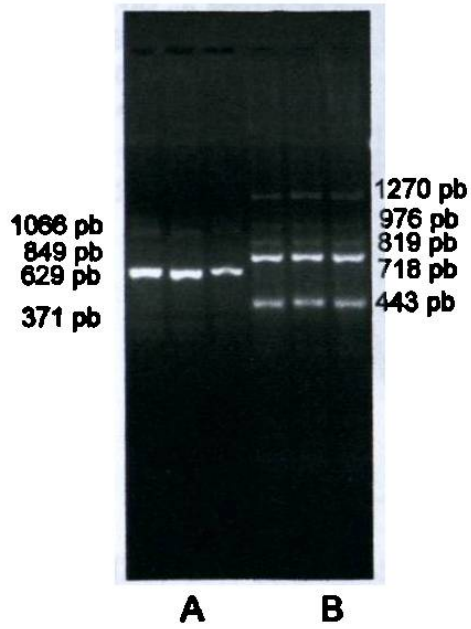

Figura 24.- Análisis molecular de la cepa control de *Candida parapsilosis* ATCC 22019. A) iniciador RP-2 B) mezcla de iniciadores SOY/RP2

3.8.3 Comparación genotípica de la cepa de *Candida parapsilosis*

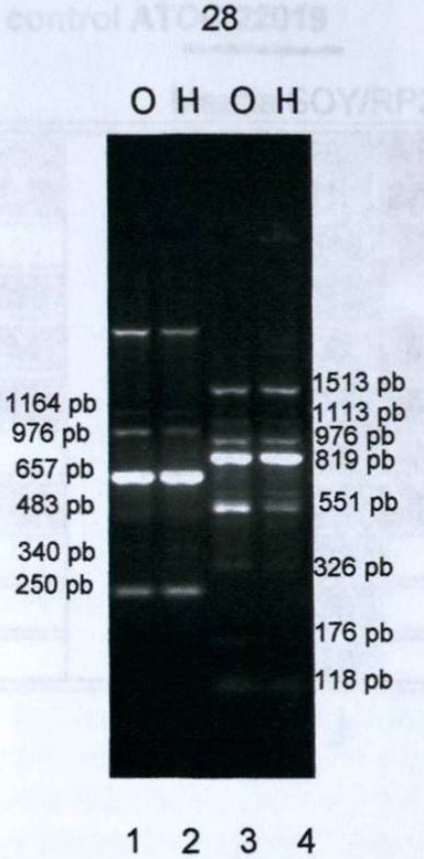

Figura 25.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Candida parapsilosis* orina y heces (28) con el iniciador SOY (carriles 1 y 2) y con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 (carriles 3 y 4).

Con el iniciador SOY se presentaron 7 bandas de tamaño entre 2347 y 250 pares de bases y con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 y , se observan 9 bandas de tamaño entre 1,513 y 118 pares de bases. No se encontró ninguna cepa concordante con la cepa control del ATCC 22019 con un iniciador, sin embargo con dos iniciadores se presentan dos bandas concordantes de 976 y 819 pares de bases. Las cepas obtenidas de heces y orina presentan el mismo patrón genético por lo que se trata de la misma cepa.

Tabla XVI Tamaño de las bandas del paciente 28 para la cepa de *Candida parapsilosis* en muestras de orina y de las heces, con uno y dos iniciadores y a 36°C. Cepa control ATCC 22019

	Iniciador RP2				Mezcla SOY/RP2		
	28 O	28 H	ATCC 22019		28 O	28 H	ATCC 22019
B1	2347	2347			1513	1513	1270
B2	1164	1164	1066		1113	1113	
B3	976	976	894		**976**	**976**	**976**
B4	657	657	629		**819**	**819**	**819**
B5	483	483			629	629	718
B6	340	340	371		551	551	443
B7	250	250			326	326	
B8					176	176	
B9					118	118	
	L C J				L C J		

3.9 Análisis genotípico de las cepas de *Trichosporon*

Se aislaron dos pares de cepas de *Trichosporon* de dos pacientes, uno perteneciente a la especie cutaneum y el otro a la especie beigelli, éstos se analizaron con la misma técnica de amplificación al azar.

3.9.1 Selección de iniciadores para *Trichosporon*

En las especies de *Trichosporon*, el uso de los iniciadores es al azar y estos pueden alinearse en cualquier parte del genoma al acoplarse a una secuencia complementaria. Se decidió amplificar el producto para conocer el patrón de bandas con los diferentes iniciadores y las mezclas.

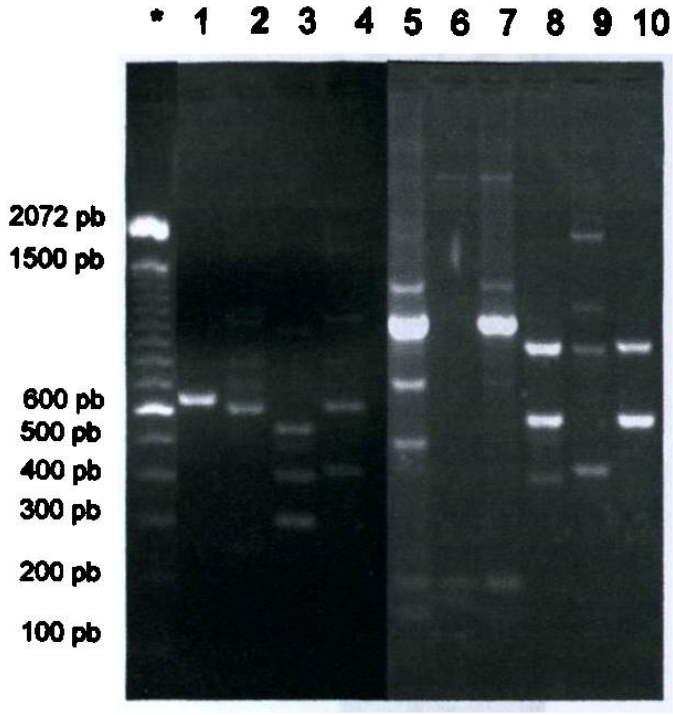

Figura 26.- Selección de iniciadores para *Trichosporon.* Carril 1al 4 se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 y en los carriles del 5 al 10 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente. * Marcador de 100 pb

Se seleccionaron el iniciador RP2 en el carril 2 y la mezcla RP2/RP1-4 en el carril 9.

3.9.2 Comparación genotípica de las cepas de *Trichosporon*

Se compararon también genotípicamente las especies de *Trichosporon* obtenidas de dos pacientes. A continuación se presentan los resultados del paciente no. 29 cuya especie corresponde a *Trichosporon beigelli.* En la figura 27 se muestra el gel con las bandas correspondientes a esta cepa.

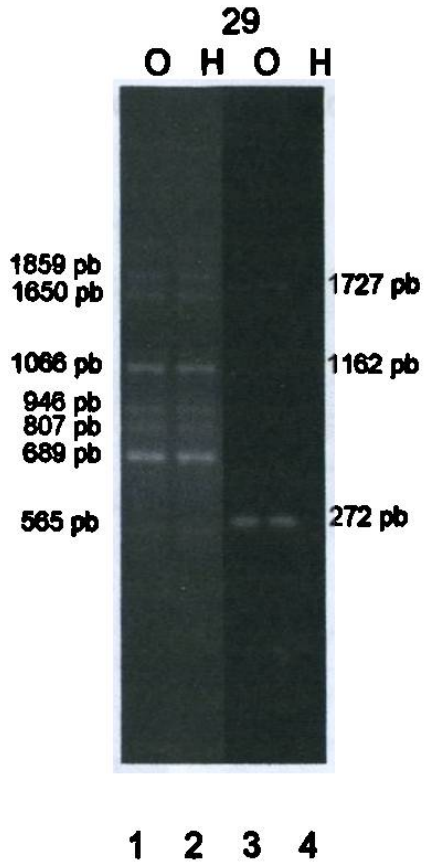

Figura 27.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Trichosporon beigelli* orina y heces (29) con el iniciador RP2 (carriles 1 y 2) y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (carriles 3 y 4).

Al calcular los tamaños de las bandas para esta cepa, se observa que se presentaron para la cepa con el iniciador RP2 un total de 11 bandas que van desde 2267 pares de bases hasta los 311 pb. En la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 se presentaron únicamente 3 bandas de un tamaño entre 1727 pb. y 272 pb., estos resultados se muestran en la tabla XVII.

Tabla XVII Tamaño de las bandas del pacientes 29 para las cepa de *Trichosporon beigelli* obtenida de las muestras de orina y de heces con un iniciador RP2 (A) y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (B) a 36°C.

	A		B	
	29 O	29 H	29 O	29 H
B1	2267	2267	1727	1727
B2	1859	1859	1162	1162
B3	1650	1650	272	272
B4	1066	1066		
B5	1025	1025		
B6	946	946		
B7	807	807		
B8	689	689		
B9	565	565		
B10	351	351		
B11	311	311		
	C		C	

A continuación se muestran los resultados para la cepa de *Trichosporon cutaneum*. Para esta especie también se calculó el tamaño de cada una de las bandas, y se observó que con el iniciador RP2 se presentaron un total de 11 bandas con un tamaño entre 2,267 y 209 pares de bases, y con la mezcla RP2/RP1-4 un total de 5 bandas con un tamaño entre 1727 y 272 pares de bases, estos resultados se muestran en la tabla XVIII.

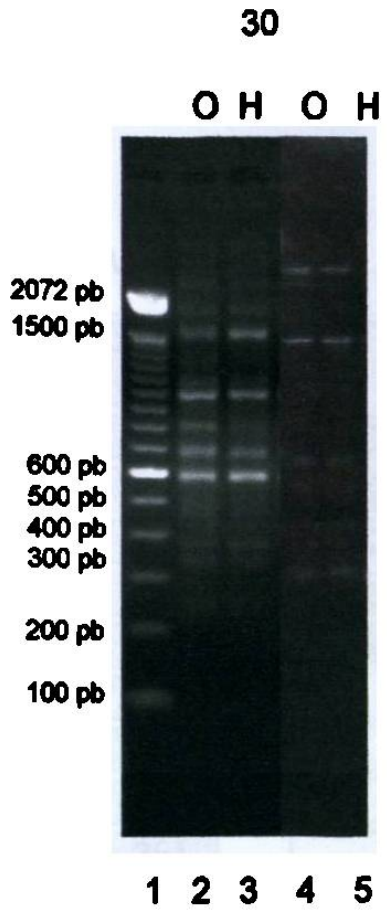

Figura 28.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Trichosporon cutaneum* orina y heces (30) con el iniciador RP2 (carriles 2 y 3) y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (carriles 4 y 5). Carril 1 Marcador 100 pb

Tabla XVIII Tamaño de las bandas del paciente 30 para las cepa de *Trichosporon cutaneum* obtenida de las muestras de orina y de heces con el iniciador solo RP2 (A) y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (B) a 36°C.

	A		B	
	30 O	30 H	30 O	30 H
B1	2267	2267	1727	1727
B2	1859	1859	1616	1616
B3	1586	1586	1162	1162
B4	1066	1066	562	562
B5	1025	1025	272	272
B6	807	807		
B7	662	662		
B8	565	565		
B9	351	351		
B10	311	311		
B11	209	209		
	C		C	

Al comparar ambas especies de *Trichosporon* con el iniciador RP2 encontramos que hay 8 bandas de 2267, 1859, 1066, 1025, 807, 565, 351 y 311 pares de bases las cuales se presentan en ambas especies y que 3 bandas son diferentes, al realizar el ensayo con la mezcla RP2/RP1-4 la cepa de *Trichosporon beigelli* presentó únicamente 3 bandas de 1727, 1162 y 272 pares de bases las cuales están presentes en la cepa de *Trichosporon cutaneum*, además esta última especie presentó dos bandas más de 1616 y 562 pares de bases. Ambas cepas presentaron igual número y tamaño de bandas en la cepa encontrada en orina y heces por lo cual hay concordancia genotípica en ellas.

En nuestro estudio del total de 30 candidurias nosocomiales (pares de cepas de levaduras aisladas simultáneamente de las heces y orina) en 4 pares (14%) se encontró que la especie de levadura aislada de orina fue diferente a la de heces, por lo que la concordancia fenotípica de 86%.

Al momento de realizar el análisis genotípico de las cepas concordantes, en dos de ellas se encontró que eran diferentes genotípicamente, por lo cual esto nos redujo a una concordancia genotípica del 80%.