CAPITULO IV

DISCUSION

En el Hospital Universitario *Candida* se encuentra como uno de los principales agentes causales de infecciones en las Unidades de Cuidados Intensivos Adultos y Pediátricos[6]. Esto representa un gran problema a nivel hospitalario por varias razones, la morbilidad y mortalidad del paciente se incrementa hasta en un 40%, los días de estancia hospitalaria aumentan y por consiguiente el gasto hospitalario es mayor[3].

Las infecciones nosocomiales más comunes son las del tracto urinario, las cuales están asociadas a catéteres. Estas representan alrededor de un 40% del total de las infecciones nosocomiales y en los hospitales de los Estados Unidos se presentan aproximadamente 1 millón de casos por año[37].

Los pacientes que se incluyeron en el estudio se encontraban internados en las salas de cuidados intensivos adultos y post-quirúrgicos del Hospital con mayor riesgo de adquirir una infección intrahospitalaria por *Candida*. La sala de cuidados intensivos adultos tiene 12 camas donde se reciben pacientes críticamente enfermos, la mayoría de éstos tienen catéteres, sondas, respiradores y utilizan pañal pues no tienen control de esfínteres. Estos pacientes además tienen alteración en el estado de la conciencia, por lo que se

requiere mayor manipulación por parte del personal hospitalario. La sala de cuidados intensivos post-quirúrgicos consta de 12 camas, aquí a la mayoría de los pacientes se les ha realizado cirugía principalmente del cráneo, por lo cual estos pacientes también tienen trastornos de la conciencia y utilizan sondas, catéteres y respiradores, también existe en ellos una manipulación importante en ellos por parte del personal.

De los 149 pacientes que se siguieron en este estudio, 120 (81%) no se colonizaron de las vías urinarias en un tiempo promedio de 4.6 días. En el resto de los 29 pacientes (19%) se presentó colonización de las vías urinarias, en un tiempo promedio de 6.6 días. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura en un estudio realizado en una Unidad de Cuidados Intensivos en pacientes cateterizados con sonda de Foley, en este estudio se incluyeron un total de 70 pacientes, el número de pacientes que presentaron levaduras en orina fue de 13 lo cual corresponde a un 18%[38]. En este mismo estudio un 60% de los pacientes colonizados fue del sexo femenino y un 40% correspondió al sexo masculino[38], en nuestro estudio el resultado fue de 40% del sexo femenino y el 60% del sexo masculino. Algunos autores señalan que debido a la anatomía de la mujer donde hay más proximidad del ano con la uretra existe una mayor probabilidad de colonizarse con levaduras del tracto gastrointestinal[38,39], sin embargo en nuestro estudio la proporción de pacientes fue mayor en el sexo masculino. Otros autores han reportado haber encontrado entre un 11 y 25% de levaduras en orina en pacientes con sonda de Foley [40,41].

En las infecciones por *Candida* siempre se ha reconocido a *Candida albicans* como la principal causante de las mismas[42], sin embargo en las últimas décadas y debido al uso de antibióticos de amplio espectro, antifúngicos y procedimientos invasivos esto ha cambiado y lentamente otras especies de *Candida* han emergido como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* entre otras[1,9].

Existen varios estudios donde se ha investigado la epidemiología de las infecciones nosocomiales por levaduras. Estos estudios están generalmente enfocados a investigar la susceptibilidad a antifúngicos, sin embargo nos da un panorama general de cual es el comportamiento de las levaduras en infecciones nosocomiales. Berrouane y col[42]. realizaron un estudio epidemiológico de infecciones por levaduras en un Hospital Universitario, ellos reportaron que las especies más comúnmente aisladas fueron *Candida albicans, Candida glabrata, Cryptococcus neoformans, Candida tropicalis, Candida parapsilosis, Candida krusei, Trichosporon spp* y *Candida lusitaniae.*

Sin embargo la distribución de especies ha mostrado ciertas diferencias dependiendo del país. En un estudio multicéntrico realizado por Pfaller y col[43], ellos reportaron que la especie más frecuentemente aislada en los hemocultivos era *Candida albicans* en los Estados Unidos y Canadá, sin embargo ésta se encontraba en menor proporción en América del Sur. *Candida glabrata* fue la segunda levadura aislada de los hemocultivos en éstos mismos países, sin

embargo en América del Sur ésta se presenta en muy baja proporción. En el estudio llama la atención que *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* se encuentran en una mayor proporción en América del Sur en comparación con Estados Unidos y Canadá.

En el año 2000 Baran y col[44]. realizaron un estudio de la susceptibilidad antifúngica en levaduras aisladas de la orina. Ellos encontraron que la especie más frecuentemente aislada era *Candida albicans*, seguida de *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*. En otro estudio realizado por Febré y col[37] se encontró a *Candida albicans* en el mayor número de aislamientos, seguida por *Candida glabrata, Candida krusei* y dos especies de *Trichosporon*.

En nuestro estudio de 30 aislamientos en orina se obtuvieron 17 (56%) de *Candida tropicalis*, 6 (20%) de *Candida glabrata*, 4 (13%) de *Candida albicans* y 1 (3%) de *Candida parapsilosis*, *Trichosporon cutaneum* y *Trichosporon beigelli*. Sin embargo no todos los aislamientos correspondieron a infección urinaria, de los casos de *Candida tropicalis*, el 70 se presentó como infección, mientras que *Candida glabrata* causó infección en el 100% de los casos, de las cepas de *Candida albicans* únicamente se presentó como infectante en 1 caso de los 4, sin embargo llama la atención que los dos casos de *Trichosporon* se presentaron con cuentas de infección urinaria. Es importante recalcar que aunque se encontraron el mismo número de levaduras aisladas de *Candida glabrata* y *Candida albicans*, la primera se presentó como

infección en todos los casos, mientras que la segunda solamente en uno.

Con respecto a *Trichosporon* como causante de infección llama la atención que se presente en dos casos de 30 en una población abierta, cuando muy esporádicamente ha sido reconocido como causante de infección en vías urinarias. Febré y col[37]. aislaron también dos especies de *Trichosporon* en la orina, sin embargo ellos mismos refieren que es excepcionalmente raro encontrar a este microorganismo en el tracto urinario.

Existen factores de riesgo para adquirir infecciones por *Candida*, los cuales han sido ampliamente descritos en la literatura. La diabetes mellitus es una enfermedad que causa inmunosupresión en ésta se presentan defectos de en los neutrófilos los cuales aunque se encuentran en una cantidad normal éstos no migran al sitio de infección ni son capaces de fagocitar los microorganismos, por lo cual en este tipo de pacientes la *Candida* puede fácilmente ser causante de infecciones. Otro factor importante es que la hiperglicemia en los tejidos es un aporte importante de nutrientes para *Candida* y favorece su multiplicación[45].

En nuestra serie de 29 pacientes 10 (35%) tenían diabetes mellitus, de éstos el (60%) presentó infección en las vías urinarias por *Candida* y un 50% llegó a estar en cetoacidosis diabética. Todos los pacientes presentaban una hiperglicemia al momento del ingreso.

En los pacientes con cirugía principalmente del tracto gastrointestinal se favorecen las infecciones por *Candida* debido a que ésta es componente normal de la flora intestinal, cuando hay pérdida de la continuidad a nivel de éste órgano es más probable que pueda proliferar[45]. Aunque en nuestro estudio 24 pacientes (83%) presentaban cirugía, esto no parece haber influido en la colonización por *Candida* debido a que éstas no fueron del tracto gastrointestinal, sino neurocirugías, torácicas o de extremidades.

En los pacientes con enfermedad inmunosupresora como cáncer, se afecta la inmunidad del paciente, con la quimioterapia se eliminan una gran cantidad de neutrófilos, los cuales si son funcionales pero se encuentran en muy poca cantidad[45]. En nuestro estudio solo el 14% de nuestros pacientes tenían algún tipo de cáncer ó recibían medicamentos inmunosupresores.

El uso de antibióticos es uno de los temas más interesantes con respecto a la predisposición a infecciones por *Candida*, diversos artículos reportan que el uso de indiscriminado de los mismos es lo que ha aumentado en gran manera estas infecciones. Los antibióticos eliminan la flora intestinal bacteriana, promoviendo esto la proliferación de *Candida*, la cual al encontrarse en gran cantidad en el tracto gastrointestinal es capaz de infectar las vías urinarias por la proximidad entre el recto y la uretra, esto depende mucho del número de antibióticos, el tiempo que son utilizados y si son antibióticos de amplio espectro o no. Wey y col.[12] realizaron un estudio de factores de riesgo para

candidemia, encontrando que la antibioticoterapia era el factor más importante para adquirir la infección y que a mayor número de antibióticos que se les administraban a los pacientes el riesgo para adquirir una infección por *Candida* era mayor[12].

Esto concuerda con nuestro estudio ya que todos los pacientes incluidos estuvieron recibiendo uno o varios antibióticos, de la serie de 29 pacientes, en los 21 que presentaron infección urinaria a 8 (38%) se les administraron antibióticos de amplio espectro y al resto de espectro intermedio, mientras que en los 8 colonizados en 4 (50%) se utilizó un esquema de amplio espectro.

El número de antibióticos que se les administraron a los 8 pacientes que presentaron colonización fue de 1 a 4, mientras que en los pacientes con infección el número de antibióticos utilizados fue de hasta 6.

Además a nivel de infecciones urinarias por *Candida* existe otro factor importante que es presencia de sonda urinaria, en estos pacientes y tomando en cuenta que están sedados, inconscientes y sin control de esfínteres esta puede ser el vector por el que la *Candida* pueda pasar del tracto gastrointestinal a las vías urinarias[37,38]. En nuestro estudio todos los pacientes tenían sonda urinaria.

La candiduria es la presencia de levaduras en orina, estas pueden presentarse como causantes de infección urinaria o solamente como colonizantes. En infecciones bacterianas se considera que una cuenta superior a 100,000 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) es una infección urinaria[45], sin embargo en infecciones por levaduras esta cuenta aún no está bien establecida, algunos autores consideran que una cuenta superior a 10,000 UFC/mL[37] o 100,000 UFC/mL[38] es suficiente para considerarse una infección urinaria. Este número es arbitrario y para fines de nuestro estudio consideramos la infección urinaria con cuentas superiores a 10,000 UFC/mL y una cuenta inferior a esta como solamente colonización. Se presentaron un total de 21 infecciones urinarias y 9 colonizaciones, las cuentas de infección urinaria están en un rango entre 11,000 a 1 $X10^8$ UFC/mL y las de colonización en 1,100 a 8,333 UFC/mL. De las 21 infecciones urinarias, solamente 13 se presentaron desde el inicio como infección mientras que 8 se iniciaron como colonización pero en el transcurso del seguimiento desarrollaron cuentas de infección. Nueve pacientes no desarrollaron infección urinaria permanecieron como colonización. No se conoce con exactitud cuales son los factores que influyen para que algunas levaduras desarrollen colonización únicamente o progresen a infección urinaria, algunos podrían ser la permanencia del paciente con la sonda[38], la cantidad de antibióticos y si son de amplio espectro[12] o algún factor de riesgo relacionado directamente con el paciente.

Para estudiar el origen de las infecciones nosocomiales y en este caso particularmente de la candiduria anteriormente se utilizaban métodos los cuales únicamente se identificaba la especie de levadura, sin embargo se requiere la realización de técnicas de biología molecular para la comparación genotípica de la misma.

Actualmente con los avances en las técnicas de biología molecular es posible comparar genotípicamente las especies de levaduras aisladas, esto nos permite realizar un análisis más preciso sobre el origen de la infección.

La identificación de levaduras es una actividad muy importante en los laboratorios clínicos, existen varias técnicas por medio de las cuales podemos identificar la especie de levadura entre las cuales se encuentran el API 20 C, Auxacolor y RapID[21-25]. En nuestro trabajo utilizamos el API 20 C por que fue uno de los primeros productos comerciales estandarizados que se utilizaron en la identificación de levaduras y frecuentemente se considera un método de referencia en comparación con otros sistemas[25]. En general todos los sistemas para identificar levaduras han sido reportados como métodos simples, rápidos y proveen un medio preciso para la identificación de levaduras en aislamientos clínicos[21-25].

Actualmente existen técnicas para comparar genotípicamente las especies de levaduras aisladas en infecciones nosocomiales, entre estas técnicas se encuentran: electroforesis en gel por campo pulsado, hibridación

con sondas de DNA y corte con enzimas de restricción, ribotipificación, amplificación al azar del DNA polimórfico, análisis con enzimas de restricción y secuenciación genotípica entre otras[26-28]. En nuestro estudio utilizamos el método de amplificación al azar el cual es muy adecuado comparado con otros sistemas de genotipificación, tiene las ventajas de que por ser una amplificación al azar no es necesario conocer la parte del genoma que se va a amplificar, los iniciadores utilizados son cortos (8-10 pb) [27] y se ha reportado que es capaz de detectar mutaciones del genoma en un solo cambio de base según King y col.[45], además es un método sencillo, rápido, no requiere equipo sofisticado y es económico[27].

Para la extracción del DNA se propuso inicialmente realizar la técnica del TSNT[30], sin embargo con esta técnica no fue posible extraer el DNA de la *Candida*, el principal inconveniente es la gruesa pared que tienen las levaduras, para resolver este problema se incluyó otra técnica de extracción previa, reportada por Bostock y col[31], la cual utiliza en un principio la enzima liticasa para el rompimiento de la pared de la *Candida*, y así poder extraer con más facilidad el DNA. A esta técnica de extracción también se le realizaron modificaciones, ya que con el tiempo de incubación reportado de la enzima con la levadura no fue posible la extracción del DNA, por lo cual se incubó ésta por mas tiempo hasta que se observó al microscopio la degradación total de la pared es decir la formación de esferoplastos (células de *Candida* sin pared), el tiempo que tardó esta degradación fue de 8 horas. Posteriormente ya con la

pared degradada fue posible realizar la extracción del DNA con la técnica de TSNT[30].

Enseguida se procedió a realizar la técnica de amplificación al azar, según Lehmann y col.[32] la cual también hubo que estandarizar por que con las condiciones iniciales no fue posible obtener bandas de amplificación, por lo cual fue necesario probar diferentes cantidades de *Taq* DNA polimerasa, iniciadores y DNA en base a lo reportado por otros autores.

Lehmann[37] y col. utilizan 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa para su técnica, sin embargo, otros autores como Bostock [35] y Morales[47] utilizan 2.5 U, mientras que King[46] y col utilizan 5 U, en base a estos datos decidimos probar las 3 cantidades de *Taq* DNA polimerasa.

Las cantidades de DNA que fueron probadas en los primeros ensayos fueron de entre 10 y 100 ng las cuales son sugeridas por varios autores[37,47,48], sin embargo debido a que no se obtuvo un buen resultado se decidió probar cantidades más grandes de DNA de 250, 500 y 750 ng. Cabe mencionar que Lehmann y col.[37] utilizan 200 ng de DNA. La concentración de iniciadores reportada en los artículos también es muy baja por lo que se decidió probar concentraciones de 1, 2 y 3 micromolar.

Al momento de estandarizar la técnica observamos que con las cantidades de *Taq* polimerasa de 1.25 y 2.5 U hay ausencia de las bandas en

los carriles con cualquiera de las concentraciones de iniciadores y DNA; al utilizar 5U aparece la mayor cantidad de bandas. Si bien las 3 cantidades de DNA funcionan adecuadamente, no se requirió colocar la cantidad más alta de DNA, es suficiente la de 250 ng. Con respecto a la concentración de iniciadores se puede observar que la mejor es la de 3 μm, debido a que se observan más bandas. Las mejores condiciones para realizar la amplificación al azar en nuestro laboratorio fueron: cantidad de DNA de 250 ng, 5U de *Taq* polimerasa y concentración de iniciadores de 3 μM.

Las condiciones del termociclador son similares en todos los artículos de referencia, y lo más relevante es que las temperaturas de apareamiento de los iniciadores con el genoma son bajas (entre 30 y 36°) en comparación con otras técnicas de PCR [35,37,46,47].

Al realizar el corrimiento electroforético de los genomas de los pares de cepas de heces y orina *Candida tropicalis* con el iniciador RP4-2 se observó que esta presentaba una gran cantidad de bandas, de 16 a 18 de un tamaño muy similar, esto dificultó la interpretación de los resultados ya que todos los pares de cepas de los diferentes pacientes daban patrones muy parecidos como si se tratara de la misma cepa aislada de un solo paciente y no como aislamientos de diferentes pacientes. Debido a esto se diseñó otro experimento en el cual se le aumentó la temperatura de apareamiento a 45°C, al aumentar la temperatura el iniciador se une menos al genoma y esto da como consecuencia

que halla menos amplificación y se disminuya el número de bandas para poder observar diferencias entre las cepas de los diferentes pacientes y al mismo tiempo aumentar el poder discriminatorio del método, para tomar la decisión de si la cepa urinaria es igual a la de heces o diferente. Esto nos fue de mucha utilidad por que pudimos diferenciar con mayor facilidad las cepas iguales y las que eran diferentes, y se logró diferenciar los patrones de bandas entre las cepas de un paciente y otro. Además se realizó otro experimento con mezclas de iniciadores, con lo cual se pudo identificar perfectamente las cepas de heces y orina iguales y las discordantes.

En las especies de *Candida glabrata, Candida albicans* y *Candida parapsilosis* no se presentó este problema por que al momento de analizar los resultados podemos observar que los patrones entre un paciente y otro son diferentes en la cantidad de bandas. Los patrones genéticos de la cepa de heces y orina concordaban lo que nos indica que es la misma cepa.

En las cepas de *Trichosporon* es importante mencionar dos cosas la primera es que se logró extraer el DNA con la misma técnica que las cepas de *Candida*, aunque *Trichosporon* es un hongo diferente en cuanto a sus características microbiológicas[7]. Aunque en el artículo la técnica de RAPD no está reportada para *Trichosporon,* nosotros pensamos que debido a las características de la misma es posible aplicarla en esta levadura. Como ya se ha planteado los iniciadores que se utilizan son cortos y pueden aparearse en

cualquier parte del genoma donde encuentren su secuencia complementaria, por lo tanto esto nos dará como resultado las bandas para la diferenciación de las cepas.

Se ha reportado que la técnica de RAPD tiene problemas en cuanto a su reproducibilidad[27], en base a esto nosotros realizamos un análisis de reproducibilidad del método para obtener cuál era la variación del mismo en los diferentes experimentos, se encontró que había un coeficiente de variación muy amplio cuando se realizaban experimentos en diferente fecha, lo cual pudiera deberse a que las condiciones al correr el ensayo no son iguales, por ejemplo hay cambios en cuanto al grosor del gel, cambios en el corrimiento, etc, por lo cual el coeficiente de variación es alto, sin embargo este coeficiente disminuyó al momento en que se realizaban los ensayos el mismo día bajo las mismas condiciones por lo cual se obtuvo una buena reproducibilidad. Un dato importante es que la cantidad de bandas obtenidas en los diferentes experimentos de reproducibilidad fue igual.

En el caso de infecciones urinarias por *Candida* siempre se ha considerado que su fuente de infección directa es el tracto gastrointestinal casi en el 100% de los casos, sin embargo se debe considerar el tipo de paciente que se está tratando, cuando los pacientes están con sonda y tienen alteración del estado de la conciencia es muy importante la manipulación de la sonda por el personal hospitalario. En nuestro estudio es de llamar la atención que 1 de

cada 5 pacientes del total evaluado adquirieron una colonización en vías urinarias por *Candida*, esto represente una frecuencia elevada (19%). Esta colonización se desarrolla muy tempranamente en pacientes con sonda urinaria, ya que del grupo total de 189, pacientes 33 (19%) no pudieron ingresar debido a que ya se encontraban colonizados en las primeras 24 horas de estancia hospitalaria. En nuestro estudio se encontró una concordancia fenotípica del 86%, sin embargo fue muy importante el análisis genotípico por que esta concordancia se redujo a un 80%. No es una sorpresa que el 80% de las levaduras se adquirieran por el origen endógeno, pero de acuerdo a lo reportado en la literatura éste número debería haber sido más alto. Es de llamar la atención que el otro 20% es decir 1 de cada 5 pacientes adquirieron la colonización o infección por una fuente de origen exógeno. Esto nos orienta a que se debe tener más control en cuanto a las medidas preventivas del origen exógeno, tales como no manipular la sonda innecesariamente, la utilización de guantes o un simple lavado de manos entre la atención a un paciente y otro.
Las medidas preventivas para el origen endógeno pudieran estar enfocadas a utilizar de manera adecuada los antibióticos.

La relevancia del presente trabajo radica en que son muy pocos los estudios realizados en nuestro hospital enfocados a infecciones nosocomiales. En este estudio se obtuvieron datos muy interesantes. En cuanto a las especies de levaduras, cuales son más frecuentemente aisladas en orina, si se presentaban como una infección urinaria o solamente como colonización,

cuales especies son más infectantes y cuales son colonizantes. En cuanto a los métodos para identificación, es importante recalcar que el análisis genotípico nos da un resultado más fino para definir el origen, lo cual como ya se comentó fue muy importante para definir el origen exógeno. En cuanto a los pacientes los factores de riesgo que se presentaron más frecuentemente. Se obtuvo un origen endógeno del 80%, esto puede dar pie a llevar otros estudios en este tipo de pacientes enfocados a dar un tratamiento profiláctico con fluconazol o nistatina, evaluando la respuesta costo-beneficio.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1.- En nuestra serie de 29 pacientes, la frecuencia de colonización urinaria por levaduras en pacientes con sonda urinaria fue de 19%.

2.- De las 30 cepas de levaduras recuperadas predominó *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, y *Candida albicans* de acuerdo a lo reportado con la literatura.

3.- Los aislamientos de *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* correlacionaron más frecuentemente con infección en las vías urinarias, *Candida albicans* solo infectó en un 25% de los casos, en *Trichosporon* y aunque no se ha reportado con causante de infección en vías urinarias en nuestra serie fue infectante en dos casos.

4.- La correlación entre las especies de levaduras colonizantes en orina fue de 86%, la comparación genotípica de los pares de levaduras en heces y orina descartó dos pares que habían concordado por especie lo que redujo la correlación de los pares a 80%.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1.-Edwards J. International Conference for the Development of a Consensus on the Management and Prevention of Severe *Candidal* Infections. (1997) Clin. Infec. Dis. 25:43-59

2.-Voss A., Hollis R., Pfaller M., Wenzel R. and Doebbeling B. Investigation of the Secuence of Colonization and Candidemia in Noneutropenic Patients (1994) J Clin. Microbiol. 32:975-980

3.-Pittet D., Tarara D. and Wenzel P. (1994) Nosocomial Bloodstream Infection in Critically Ill Patients. Excess Length of Stay, Extra Costs, and Attributable Mortality. J. of Am. Med. Ass. 271:1598-1601

4.-Banerjee S, Emori T, Culver D. et al Secular Trends in Nosocomial Primary Bloodstream Infections in the United States, 1980-1989. (1991) Am. J. Med. 91 (sup3B): 3B 86s-89s

5.-Beck-Sagué C., Jarvis W. Secular Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the United States, 1980-1990. (1993) J. Infect. Dis. 167:1247-1251

6.-Comunicación verbal por: Comité de Infecciones Intrahospitalarias. Dra. Irma Rivera Morales.

7.-Bonifaz Alexandro, MICOLOGIA MEDICA BASICA, 1ª Edición, Editorial Méndez Cervantes, México D.F. 1991 p 277-279, 294-298

8.-Pfaller M., Jones R. et al. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected In 1997 in the United States, Canadá, and South America for the SENTRY Program. J. Clin. Microbiol. (1998) 36:7 1886-1889

9.-Pfaller M. Nosocomial Candidiasis: Emerging Species, Reservoirs, and Modes of Transmission. (1996) Clin. Infec. Dis.. 22 (Suppl2):S89-94

10.-Seelig M. The Role of Antibiotics in the Pathogenesis of *Candida* Infections (1966) Am. J. Med. 40:887-917

11.-Ripon John W TRATADO DE MICOLOGÍA MÉDICA 3a Edición, Editorial Iteramericana Mc. Graw Hill. México D.F. 1990 p 569-628

12.-Wey S., Mori M., Pfaller M., Woolson R. and Wenzel R. Risk Factors for Hospital-Acquired Candidemia. A Matched Case-Control Study. (1989) Arch. Int. Med. 149:2349-2353

13.-Pfaller M. Infection Control: Opportunistic Fungal Infections-The Increasing Importance of *Candida* Species. (1989) Infections Control Hospital Epidemiology. 10:270-273

14.-Jarvis W. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections, with Emphasis on *Candida* Species. (1995) Clin. Infec. Dis. 20:1526-30

15.-Stone HH., Kolb LD., Currie Ca., Geheber Ce., and Cuzzell JZ. *Candida* sepsis: Pathogenesis and principles of treatment. Ann surg 1974,179:697-711

16.-Odss FC. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis, in *Candida* and Candidosis. 1988 Bailliere Tindall, London, England, pp 74-75

17.-Murphy JW. Mechanism of natural resistence to human pathogenic fungi. Annu Rev Microbiol 1991, 45:509-538

18.-Marco F., Lockhart S. et al. Elucidating the Origins of Nosocomial Infections with *Candida albicans* by DNA Fingerprinting with the Complex Probe Ca3 (1999) J. Clin. Microbiol.. 37:2817-2828

19.-Betemierux P., Chevrier S., Quindos G., Sullivan D., Polonelli L.; and Guiguen C. Use of DNA fingerprinting and biotyping methods to study a *Candida albicans* outbreack in a neonatal intensive care unit. (1994) Pediatric Infections Diseases Journal 13:899-905

20.-Strausbaugh L., Sewell D., Ward T., Pfaller M., Heitzman T. and Tjoelker R. High Frequency of Yeast carriage on Hands of Hospital Personnel. (1994) J. Clin. Microbiol. 32:2299-2300

21.-Wadlin J., Hanko G., Stewart R., Pape J. and Nachamkin I. Comparison of Three Commercial Systems for Identification of Yeast Commonly Isolated in The Clinical Microbiology Laboratory. (1999) J. Clin. Microbiol. 37:1967-70

22.-Heelan J., Sotomayor E., Coon K. and Arezzo J. Comparison of the Rapid Yeast Plus Panel with the API-20C Yeast System for Identification of Clinically Significant Isolates of *Candida* Species. (1998) J. Clin. Microbiol. 36:1443-1445

23.-Espinel-Ingroff A., Stockman L., Roberts G., Pincus D., Pollack J. and Marler J. Comparison of RapID Yeast Plus System with API 20 C System for Identification of Common, New and Emerging Yeast Pathogens. (1998) J. Clin. Microbiol.. 36:883-886

24.-Ramani R., Gromadzki S., Pincus D., Salkin I. and Chaturvedi V. Efficacy of API 20 C and ID 32C Systems for Identification of Common and Rare Clinical Yeast Isolates. (1998) J. Clin. Microbiol. 36:3396-3398

25.-Campbell C., Davey K., Holmes Ann., Szekely A. and Warnock D. Comparison of the API Canida System with the AUXACOLOR System for Identification of Common Yeast Pathogens. (1999) J. Clin. Microbiol. 37:821-823

26.-Taylor J., Geiser D., Burt A. and Koufopanou V. The Evolutionary Biology and Population Genetics Underlying Fungal Strain Typing. Clinical Microbiology Reviews. (1999) 12:126-146.

27.- Olive D. and Bean P. Principles and Aplications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. (1999) J. Clin. Microbiol.. 37:1661-1669.

28.-Goering R. Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: Analysis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (1993) Infection Control and Hospital Epidemiology. 14:595-600.

29.- Williams JG, Kubelik A R, Livak K J, Rafalsky J A, and Tingey S V, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers (1990) Nuc. Acid. Res. 18:6531-6535

30.- Welsh J and McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. (1990) Nuc. Acid. Res. 18: 7213-7218

31.- Programa estadístico Statistica Versión 5 1997

32.- Manual de Microbiología Médica Facultad de Medicina

33.- Campbell Mary, Stewart Joyce. THE MEDICAL MYCOLOGY HANDBOOK John Wiley and Sans, Inc United States of America 1980 pp 181-185, 370-373

34.- Sanbrook J., Fritsh EF. y Maniatis T. (1989) Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York.

35.- Bostok A, Khattak MN, Matthews R. and Burnie J. Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans* (1993) J. Gen.Microbiol. 129: 2179-2184

36.- Lehmann P., Diming L. and Brent L. Genotypic Identification and Characterization of Species and Strains within the Genus *Candida* by Using Random Amplified Polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol. (1992) 30:3249-3254

37.- Paul A. and cols. A prospective study of pathogenesis of catheter-associated urinary tract infections Mayo Clinic Proc. (1999) 74:131-36

38.- Febré N. and cols. Microbiological Characteristics of Yeasts Isolated from Urinary Tracts of Intensive Care Unit Patients Undergoing Urinary Catheterization. J. Clin. Microbiol. (1999) 37:1584-1586

39.- Goldberg PK., Kozzin PJ., Wise GJ., Nouri N. and Brooks RB. Frequency and significance of candiduria. (1978) JAMA 24:582-584

40.- Harmory BH. and Wenzel RP Hospital-associated Candiduria: predisposing factors and review of the literature J Urol. (1978) 120:444-448

41.- Platt RB, Polk F., Murdock B and Rosner B. Mortality associated with nosocomial urinary-tract infection. N Engl J Med (1982) 11.637-642

42.- Berrouane Y., Herwaldt L. and Pfaller M. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. J. Clin. Microbiol. (1999) 37:531-537

43.- Pfaller MA and cols International Surveillance of bloodstream infections due to Candida species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada and South America for the SENTRY program. J. Clin Microbiol (1998) 36:1866-1889

44.- Baran J, Klauber E, Barczak J, Riederer K and Khatib R. Trends in antifungal susceptibility among *Candida sp* Urinary Isolates from 1994 at 1998 J. Clin. Microbiol. (2000) 38:870-871

45.- Mandell Gerald L, Bennet Jhon E, Dolin Raphael Principles and Practice of Infectious Diseases 5ta Edition Vol. 2 pp2056-58

46.- King D, Thine-Chalberg J, Pfaller MA, Moser SA and Merz WG. Comparison of four DNA-Based methods for strain delineation of *Candida lusitaniae* J. Clin. Microbiol. (1995) 33:1467-70

47.- Morales A., Martínez JP., Galán L., Pereyra B., Rocha M. and Tamez R. Identificación molecular de cepas de *Aspergillus spp.* Ciencia UANL (1999) 2:27-33

48.- Stephan P, Vazquez J, and cols. Identification of *Candida* species by randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. J. Clin. Microbiol. (1997) 35:2031-39

APÉNDICES

APÉNDICE A

FORMA DE PARTICIPACION VOLUNTARIA EN EL PROYECTO:

ESTUDIO DEL ORIGEN ENDOGENO DE LA CANDIDURIA EN PACIENTES CON SONDA URINARIA

Fecha:_____/_____/_____

A QUIEN CORRESPONDA

Declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este proyecto de investigación que se realiza en el Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la U.A.N.L. cuyo objetivo es profundizar en el conocimiento de los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de las infecciones urinarias por el hongo llamado Candida que pueden ocurrir en pacientes con sonda urinaria.

Entiendo que mi participación consistirá únicamente en proporcionar o permitir que se obtengan muestras de heces y orina diariamente durante mi internamiento lo cual no representa riesgo alguno para mi salud.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación en cualquier momento del desarrollo de esta. Además entiendo que estoy en libertad de retirarme en el momento que desee y si tomara esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario.

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

_____ Firma

_____ Firma

Paciente
Nombre:_____
Dirección:_____

Testigo
Nombre:_____
Dirección:_____

Investigador:
Nombre:_____
Dirección:_____

HOJA DE CAPTURA

Nombre:_____ No.: [ ]
Registro: [-] Edad: [ ] Sexo: [ ] M [ ] F

Fecha: [dd/mm/aa] [/ /]
Fecha de ingreso al Hospital: [/ /]
Fecha de ingreso a UCI: [/ /]
Fecha de colocación de la S. urinaria: [/ /]

Diagnósticos: _____ Código [ ] _____ [ ]

_____ [ ] _____ [ ]

Diabetes mellitus: No [ ] Sí [ ]

Neoplasias No [ ] Sí [ ] Cuál:_____ [ ]

Enf. Inmunosupresora No [ ] Sí [ ]] Cuál:_____ [ ]
1.- Linfoma, 2.- Lupus; 3.- Otras enf. autoinmunes, 4.- Inf por VIH.

Cirugías: No [ ] Sí [ ] Fecha: [/ /] Cirugía:_____ [ ]
Fecha: [/ /] Cirugía:_____ [ ]
Fecha: [/ /] Cirugía:_____ [ ]
Antibióticos: No [ ] Sí [ ] Cuál:_____ [ ]
_____ [ ] _____ [ ] _____ [ ]

Inmunosupresores: No [ ] Sí [ ] Cuál:_____ [ ]
_____ [ ] _____ [ ]
Diarrea: No [ ] Sí [ ] Fecha: [/ /] Causa: _____ [ ]

Fecha de egreso de UCI: [/ /] Sala:_____ [ ]
Fecha de egreso del estudio: [/ /] Motivo:_____ [ ]

Evento:	Fecha:	Atribuible a:
a._____	[/ /]	_____ [ ]
b._____	[/ /]	_____ [ ]
c._____	[/ /]	_____ [ ]
d._____	[/ /]	_____ [ ]

1.IVU´s, 2. Diarrea, 3. Dermatitis, 4. Estomatitis, 5. Neumonía, 6. Inf. SNC, 7. Bacteremia/Sepsis, 8. Muerte.

Fecha de egreso del hospital: [/ /] Motivo:_____ [ ]

Observaciones:_____
_____ Situación final:_____ [ ]

HOJA DE CAPTURA

	BASAL	1	2	3	4	5	6
Día/Fecha							
Leucocitos Levaduras							
Cuenta Especie							
Fecha Consistencia de heces Cuenta Especie							
Temperatura Disuria Diarrea							
INTERV. V. URINARIAS							
DIAGNOSTICOS							
ANTIBIÓTICOS							
INMUNOSUPRESORES							
CIRUGÍAS							
GLICEMIA							
OBSERVACIONES							

APÉNDICE B

Tabla I.- Pruebas Biológicas del género *Candida*

	Producción de pseudomicelio	Producción de clamidosporas	Filamentación en suero
Candida albicans	+	+	+
Candida tropicalis	+	-	-
Candida glabrata	-	-	-
Candida parapsilosis	+	-	-
Candida stellatoidea	+	±	±
Candida krusei	+	-	-
Candida guilliermondii	+	-	-
Candida zeylanoides	+	-	-

+ Positivo - Negativo ± Casi siempre positivo

Tabla II.- Características fisiológicas del género *Candida*

AUXONOGRAMA

	INDISPENSABLE						ELECTIVO			
	Glu	**Mal**	**Sac**	**Gal**	**Lac**	**Raf**	**Ino**	**Cel**	**Xil**	**Tre**
Candida albicans	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Candida stellatoidea	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Candida tropicalis	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+
Candida parapsilosis	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Candida krusei	+	–	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida guillermondii	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Candida zeylanoides	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+
Candida glabrata	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

+ Positivo
V Variable

- Negativo

± Casi siempre positivo

Tabla III.- Características fisiológicas del género *Candida*

ZIMOGRAMA

	Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf
Candida albicans	+	+	±	+	-	-
Candida stellatoidea	+	+	-	-	-	-
Candida tropicalis	+	+	+	+	-	-
Candida parapsilosis	+	-	-	-	-	-
Candida krusei	+	–	-	-	-	-
Candida guillermondii	+	-	+	+	-	+
Candida zeylanoides	V	-	-	-	-	-
Candida glabrata	+	-	-	-	-	-

+ Positivo - Negativo ± Casi siempre positivo
V Variable

Tabla IV SISTEMA API 20-C

	PRUEBAS DE FERMENTACIÓN										PRUEBAS DE ASIMILACIÓN										PRUEBAS COMPLEMENTARIAS		
	GLU	GAL	MAL	SAC	LAC	RAF	TRE	MEL	O	INO	GLU	GAL	MAL	SAC	LAC	RAF	TRE	MEL	CEL	ACT	Morfología	Fil. en suero	Cápsula
Candida albicans	Ag[1]	(A)	Ag	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+[2]	Pseudomicelio Clamidosporas	+	-
Candida stellatoidea	Ag	-	Ag	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	(+)	-	-	+	Pseudomicelio (Clamidosporas)	(+)	-
Candida tropicalis	Ag	A	Ag	Ag	-	-	A(g)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	(+)	-	Pseudomicelio	-	-
Candida pseudotropicalis	Ag	Ag	-	Ag	Ag	(A)(g)	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	(+)	+	Pseudomicelio	-	-
Candida guilliermondii	Ag	A(g)	-[3]	A(g)	-	A(g)	-	(A)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	Pseudomicelio	-	-
Candida krusei	Ag	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pseudomicelio	-	-
Candida parapsilosis	A(g)	(A)	-[3]	(A)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Pseudomicelio	-	-
Candida zeylanoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Pseudomicelio	-	-
OTRAS LEVADURAS IDENTIFICADAS																							
Cryptococcus neoformans	(A)	-	(A)	(A)	-	-	(A)	-	-	+	+	+	+	+	-	(+)	+	-	+	-	Ausencia de pseudomicelio	-	+
Torulopsis glabrata	Ag	-	-	-	-	-	Ag	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Ausencia de pseudomicelio	-	+
Trichosporon cutaneum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+	V	V	V	+	V	V	V	+	-	Pseudomicelio Blastosporas, Artrosporas	-	+
Saccharomyces cerevisiae	Ag	(Ag)	(Ag)	Ag	-	A	V	-	-	-	+	(+)	(+)	+	-	+	V	-	-	-	(Pseudomicelio) Ascosporas	-	+
Geotrichum candidum	(A)	(A)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Micelio Artrosporas	-	+

A: Acidificación (A): Acidificación posible Ag: Acidificación y producción de gas A(g): Generalmente producción de gas + : Positivo V: Variable (+): Generalmen positivo O: Control negativo.

(1)Un resultado que no concuerde en las fermentaciones generalmente puede ser considerado como una contaminación.
(2) Un resultado positivo indica resistencia al actidione
(3) Ocasionalmente puede producir ácido
(4) Hongo filamentoso su crecimiento inicialmente puede ser semejante a una levadura

APÉNDICE C

COMPOSICIÓN Y PREPARACION DE SOLUCIONES

Se utilizó agua bidestilada y desionizada en la preparación de todas las soluciones.

-Tubos para fermentación de carbohidratos

Caldo infusión de cerebro corazón

Azul de bromotimol al 1%

Solución de carbohidratos al 10% (glucosa, sacarosa, lactosa y galactosa)

Solución de carbohidratos de 5% (maltosa)

Preparación de la solución de azul de bromotimol al 1%:

Se disolvió 1 g de azul de bromotimol en 20 mL de una solución de NaOH 1N, se añadieron 80 mL de agua y se almacenó en obscuridad a temperatura ambiente

Preparación del medio básico:

Se disolvieron 25 g de infusión cerebro corazón en 1,000 mL de agua y se añadieron 3 mL de solución de azul de bromotimol al 1%, se ajustó el pH a 7.2-7.3 a temperatura ambiente, se colocaron 9 mL en tubos con campana Durham invertida, se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 lbs. por 15 min.

Preparación de la solución de carbohidratos:

Se suspendieron 10 g de cada carbohidrato, excepto la maltosa de la cual se pesaron 5 g y se disolvieron todos en 100 mL de agua. Se esterilizaron por filtración.

Adición del carbohidrato al medio básico:

Se añadió asépticamente 1 mL de cada carbohidrato al medio básico, glucosa, galactosa, lactosa y sacarosa, obteniéndose una concentración final de 1%, excepto en maltosa la cual es de 0.5 %.

-Tubos para asimilación de carbohidratos

Medio base de nitrógeno para levadura

Solución de carbohidratos al 2.5% (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa, rafinosa, inositol, xilosa, trealosa)

Preparación del medio base nitrógeno para levadura:

Se suspendieron 3.35 g de base de nitrógeno para levadura en 400 mL de agua, se mezcló hasta disolución y se esterilizó por autoclave a 121°C, 15 lbs. por 15 min., se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Preparación de la solución de carbohidratos:

Se pesaron 2.5 g del carbohidrato y se añadieron 100 mL de agua. Se esterilizó por filtración.

Adición del carbohidrato al medio base nitrógeno para levaduras:

Se añadieron 100 mL de la solución del carbohidrato a los 400 mL del medio base nitrógeno de levadura. La concentración final del carbohidrato es 0.5%. Se dispensaron asépticamente 2 mL en tubos con tapón de rosca.

-Amortiguador TAE 50X

Se pesaron 242 g de tris base y se disolvieron en 600 mL de agua, se le agregaron 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0.5 M, pH 8, se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 llbs. por 15 min.

-Amortiguador TAE 1X

Se mezclaron 20 mL de la solución TAE 50X con 980 mL de agua.

-Acido etilendiaminotetracético disódico dihidratado (EDTA) 0.5 M

Se pesaron 186.1 g de EDTA y se disolvieron en 800 mL de agua, se mezcló vigorosamente con una barra magnética y se ajustó el pH a 8 con NaOH, se aforó a 1 L, se esterilizó la solución en autoclave a 121°C, 15 lbs. por 15 min.

-Amortiguador TE

Se disolvieron 1.2 g de trizma-base y 37 mg de EDTA en 1 L de agua, se ajustó el pH a 8.3 con HCL 1N

-Solución de SDS al 10%

Se pesaron 10 g de SDS y se disolvieron en 100 mL de agua.

-Colorante de referencia (6X)

3 mL de glicerol al 100%

0.6 mL de SDS al 10%

0.12 mL de EDTA 0.5 M

10 mg de xilencianol

10 mg de azul de bromofenol

Se mezclaron estos componentes en 5 mL de agua y se llevaron a 10 mL finales, se almacenaron a 4°C.

-Etanol al 70%

Se mezclaron 70 mL de etanol al 100% con 30 mL de agua.

-Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1)

Se mezclaron 40 mL de alcohol isoamílico y 960 mL de cloroformo.

-Solución amortiguadora de lisis (TSNT)

Se pesaron 0.585 g de NaCl, 0.121 g de tris, 1 g de SDS y 0.375 g de EDTA, se disolvieron en 80 mL de agua, se agregaron 2 mL de tritón X-100, se ajustó el pH a 8 con ácido clorhídrico concentrado y se aforó a 100 mL. Se esterilizó en autoclave 121°C, 15 lbs. por 15 min.

-Solución de penicilina y estreptomicina

Se disolvió una ampolleta de estreptomicina de 1 g en 12.5 mL de agua. De esta solución se tomaron 10 mL para disolver una ampolleta de penicilina de

800,000 unidades. Por cada 40 mL del medio se agregó 200 µL de la solución patrón.

-Amortiguador SE (1.2 M de sorbitol- 0.1 M EDTA)

Se pesaron 21.8 g de sorbitol y 3.77 g de EDTA, se disolvieron en 100 mL de agua.

-Solución de Liticasa

Se disolvieron 8.5 mg en 5 mL de agua destilada.

-Solución de Sorbitol 1 M

Se pesaron 182.2 g y se disolvieron en 1,000 mL de agua, se esterilizó por filtración.

-Agarosa al 2%

Se pesaron 2 g de agarosa y se disolvieron en 100 mL de amortiguador TE 1X.

-Agarosa al 0.8 %

Se pesaron 0.8 g de agarosa y se disolvieron en 100 mL de amortiguador TE 1X

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

-Agar dextrosa Saboureaud (Dibico)

Agar 15 g

Dextrosa 40 g

Peptona de carne 5 g

Peptonas de caseína 5 g

Se disolvieron 65 g del polvo en 1,000 mL de agua y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 libras por 15 minutos. Una vez que el medio se enfrió, se le agregó la solución de antibióticos de penicilina y estreptomicina (200 µL por cada 40 mL de medio).

-Medio de Oxgall (Difco)

Se pesó 1 g de medio de Oxgall y 2 g de agar bacteriológico, se disolvieron en 100 mL de agua, se esterilzó en autoclave a 121°C, 15 lbs. por 15 min.

-Agar para la selección de hongos patógenos (Bioxon)

Peptona de soya	10g
Dextrosa	10 g
Agar	15.5 g
Cicloheximida	0.4 g
Cloranfenicol	0.05 g

Se pesaron 36 g del polvo y se disolvieron en 1000 mL de agua, se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 lbs. por 15 min.

-Caldo dextrosa Saboureaud

Bacto neopeptona	10 g
Bacto dextrosa	20 g

Se pesaron 30 g del polvo y se disolvieron en 1000 mL de agua, se esterilizaron a 121°C y 15 lbs. por 15 min. Una vez que el medio se enfrió se le agregó la solución de antibióticos de penicilina y estreptomicina (200 µL por cada 40 mL de caldo).

APÉNDICE D

EXTRACCIÓN DE DNA POR LA TÉCNICA DE ANN BOSTOCK.

1) Incubar la levadura por 12 horas en caldo glucosado al 2%.

2) Separar por centrifugación el paquete celular y lavarlo con 1 mL de sorbitol 1 M.

3) El paquete celular se incuba por 40 minutos a 37°C en 1 mL de buffer SE (1.2 M sorbitol, 0.1 M EDTA pH 7.5) el cual contiene 1 µl de 2 mercaptoetanol y 0.3 mg de la enzima lítica de levadura (Zymolyase 100 T, ICN Biochemicals).

4) El paquete con esferoplastos se separa por centrifugación (2,500 rpm por 5 min.) y se lava con buffer SE, para posteriormente resuspenderse en 0.5 mL de una solución 0.15 M de NaCl 0.1 M EDTA pH 7.5.

5) Los esferoplastos se lisan con Proteinasa K a una concentración final de 400 µg/mL y SDS 1%.

6) Se añaden 20 µL de una solución stock de RNAasa la cual está a una concentración de 20 mg/mL, posteriormente se incuba a 55°C por 30 minutos.

7) El sobrenadante se separa por centrifugación y se le realizan dos extracciones con una solución de fenol/cloroformo y una con cloroformo.

8) El DNA se precipita con 2-propanol y posteriormente se disuelve en 50 µL de buffer TE (10mM-Tris, 0.1 mM-EDTA pH 8)

EXTRACCIÓN DEL DNA POR LA TÉCNICA DE TSNT

1) Colocar 1.5 mL del cultivo de levadura en un tubo eppendorf.

2) Centirfugar por 5 minutos a 4,500 rpm para separar el paquete celular.

3) Separar el paquete celular con una micropipeta.

4) Añadir al paquete celular 200 µl de solución amortiguadora de lisis TSNT, mezclar perfectamente por inversión.

5) Agregar 500 µl de fenol saturado. Mezclar perfectamente por inversión.

6) Agregar 100 µl de Sevar, agitar en vortex 5 minutos.

7) Añadir 200 µl de TE 1X. Mezclar.

8) Centrifugar 8 minutos a 14,000 rpm. Transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 mL.

9) Precipitar el DNA agregando 1ml de etanol 100%. Mezclar lentamente por inversión hasta observar la precipitación del DNA en forma de una hebra blanca.

10) Decantar el sobrenadante teniendo cuidado de que no se desprenda la pastilla de DNA.

11) Lavar con 500-1,000 µL de etanol al 70% mezclar. Centrifugar 8 minutos a 14,000 rpm, decantar. Secar por 5-10 minutos a temperatura ambiente.

12) Resuspender en 20-50 µl de TE 1X y almacenar a 4°C para posteriormente determinar concentración y calidad de la concentración.

APÉNDICE E

CALCULO DEL PROMEDIO, LA DESVIACIÓN ESTANDAR Y EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN EN LA VARIABILIDAD INTERENSAYO

Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en los geles de los 3 experimentos realizados en diferente fecha.

Tabla I Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 1 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 1						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	12007	12731	4738	9825.5	4420.5	**45**
B2	35813	35303	14021	28379.0	12436.8	**44**
B3	18267	17047	6110	13808.1	6694.4	**48**
B4	8162	7249	21773	12394.9	8134.8	**66**
B5	874	1255	27703	9944.2	15380.9	**155**
B6	5908	5565	16499	9324.0	6216.0	**67**
B7	2009	2437	19377	7940.9	9906.0	**125**
B8	4517	3635	12756	6969.3	5031.0	**72**
B9	3715	3738	12106	6519.6	4837.7	**74**
B10	2696	3099	5481	3758.6	1504.9	**40**

Tabla II Cálculo del coeficiente de variación en prociento del carril 2 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 2						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	12593	10742	4383	9239.4	4306.3	**47**
B2	40175	34874	12127	29058.9	14900.6	**51**
B3	19075	15953	5654	13560.6	7023.0	**52**
B4	9557	6752	25166	13824.9	9921.5	**72**
B5	1191	1463	26645	9766.4	14617.8	**150**
B6	6306	5852	17556	9904.5	6630.0	**67**
B7	2244	2215	23704	9387.6	12398.1	**132**
B8	3955	4185	23641	10593.9	11300.1	**107**
B9	3717	5116	17700	8844.7	7701.2	**87**
B10	3097	3265	10733	5698.1	4361.3	**77**

Tabla III Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 3 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 3						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	10562	6953	4510	7341.8	3044.6	41
B2	30129	23028	11461	21539.5	9422.4	44
B3	10915	9219	5101	8411.9	2989.8	36
B4	6613	5359	13720	8564.0	4509.1	53
B5	1034	897	369	766.8	350.9	46
B6	7863	7154	20093	11703.2	7274.1	62
B7	923	1279	20529	7576.9	11218.1	148
B8	1865	2389	26514	10255.9	14082.1	137
B9	2828	3296	20485	8869.7	10061.7	113
B10	2996	1389	2254	2213.1	804.2	36

Tabla VI Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 4 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 4						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	20557	18936	4274	14589.1	8969.5	61
B2	39601	37880	15075	30852.1	13690.3	44
B3	30225	27330	11821	23125.2	9896.3	43
B4	9678	12355	14944	12325.5	2633.1	21
B5	1529	1999	391	1306.4	826.4	63
B6	3700	2474	16123	7432.6	7551.3	102
B7	3068	5224	20231	9507.7	9348.6	98
B8	2406	4033	20725	9054.7	10139.2	112
B9	7964	4370	18744	10359.1	7480.5	72
B10	2332	8398	2165	4298.2	3551.8	83

Tabla V Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 5 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 5						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	29908	22222	8550	20226.8	10817.8	**53**
B2	49442	41687	14186	35104.9	18526.9	**53**
B3	37289	26693	16100	26694.0	10594.5	**40**
B4	12766	12144	11558	12155.9	603.9	**5**
B5	861	1659	408	975.8	633.4	**65**
B6	3678	2255	10273	5402.2	4277.8	**79**
B7	3322	4337	21532	9730.4	10233.1	**105**
B8	1860	3491	22803	9384.5	11649.0	**124**
B9	8617	5509	13858	9327.9	4219.6	**45**
B10	2655	9586	3909	5383.5	3693.3	**69**

Tabla VI Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 6 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 6						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	12365	5207	8472	8681.2	3583.6	**41**
B2	22445	14388	14964	17265.8	4494.5	**26**
B3	10251	8369	15711	11443.6	3813.8	**33**
B4	3848	3484	8652	5328.2	2884.6	**54**
B5	117	530	425	357.3	214.5	**60**
B6	835	1137	14727	5566.3	7935.0	**143**
B7	546	1236	1469	1083.8	480.1	**44**
B8	1506	1048	10968	4507.5	5600.0	**124**
B9	1998	2053	3861	2637.4	1060.4	**40**
B10	749	635	553	645.9	98.3	**15**