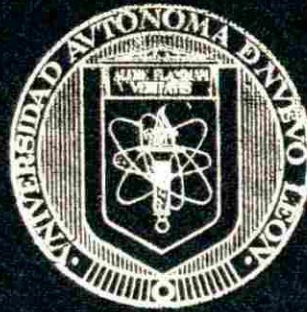


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



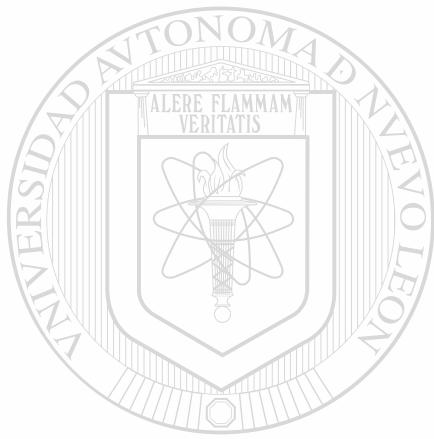
**“ORIGEN DE LA CANDIDIASIS URINARIA
ASOCIADA A SONDA VESICAL POR ANALISIS
DE BIOLOGIA MOLECULAR”**

Por

Q.C.B. MARIA GUADALUPE RODRIGUEZ LOPEZ

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

JUNIO DEL 2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

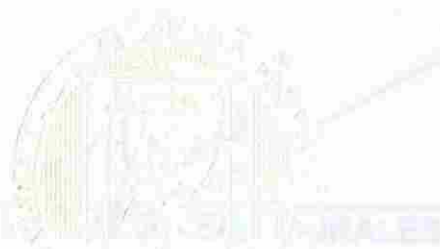


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA Y FÍSICA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA Y FÍSICA

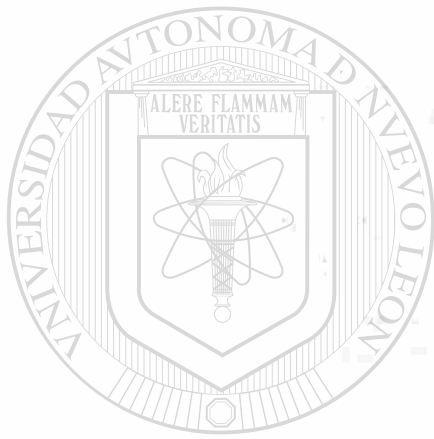
APROBACIÓN DE LA COMISIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

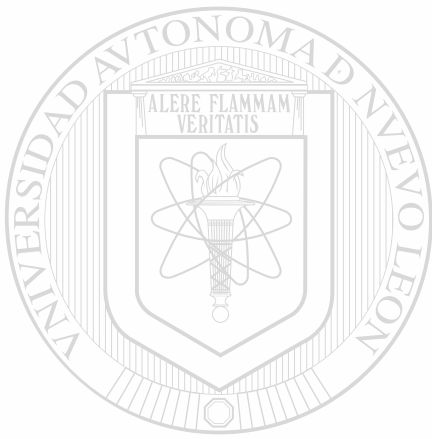
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RC123

.C3

R6



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

Aprobación de la Tesis:



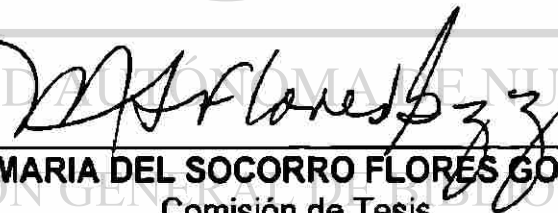
DRA. IRMA M. RIVERA MORALES
Director de Tesis



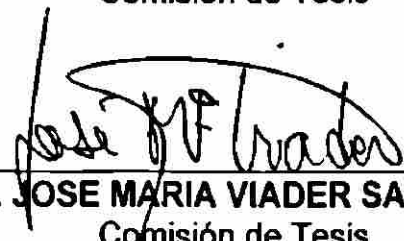
DR. LUCIO VERA CABRERA
Co-Director de Tesis



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



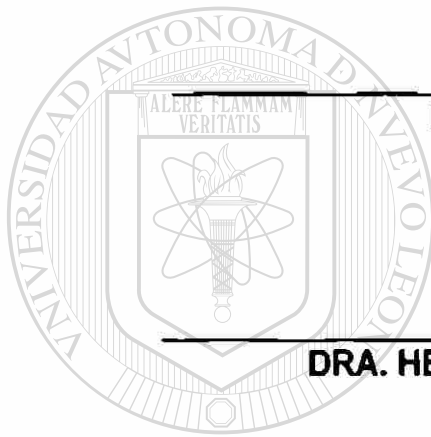
DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ
Comisión de Tesis



DR. JOSE MARIA VIADER SALVADO
Comisión de Tesis



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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

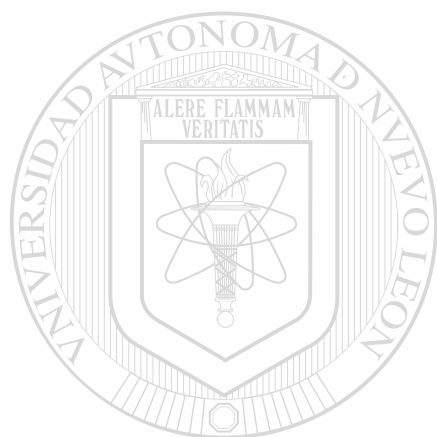
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar a este momento.

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

A mis maestros por todas sus enseñanzas.

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

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

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

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

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

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

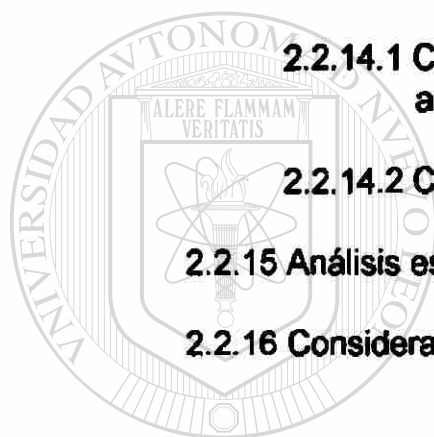
TABLA DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS	23
2.1 MATERIAL	23
2.1.1 Origen de los reactivos	23
2.1.2 Material biológico	24
2.1.2.1 Cepas control de la ATCC	24
2.1.2.2 Cepas obtenidas en el estudio	25
2.1.3 Equipo	25
2.2 MÉTODOS	26
2.2.1 Estrategia general	26
2.2.2 Definiciones operacionales	28
2.2.2.1 Colonización urinaria por Candida	28
2.2.2.2 Infección urinaria por Candida	28
2.2.2.3 Candiduria de origen endógeno	28
2.2.2.4 Candiduria de origen exógeno	28
2.2.3 Diseño del estudio	29
2.2.4 Características de los pacientes	29
2.2.4.1 Población de estudio	29
2.2.4.2 Criterios de inclusión	29
2.2.4.3 Criterios de exclusión	29
2.2.4.4 Criterios de eliminación	29
2.2.4.5 Controles	30
2.2.4.6 Tamaño de la muestra	30
2.2.5 Inclusión de casos	30
2.2.5.1 Captación de los casos	30

2.2.5.2 Captación de datos clínicos	31
2.2.5.3 Evaluación basal	31
2.2.5.4 Seguimiento	31
2.2.6 Procedimiento de cultivos	31
2.2.6.1 Urocultivo cuantitativo de levaduras	31
2.2.6.2 Coprocultivo de levaduras	32
2.2.7 Métodos de conservación de levaduras	32
2.2.8 Identificación de especies de levaduras	33
2.2.8.1 Prueba de morfología	33
2.2.8.2 Prueba de resistencia al actidione (cicloheximida)	33
2.2.8.3 Prueba de asimilación de carbohidratos	33
2.2.8.4 Prueba de fermentación de carbohidratos	34
2.2.8.5. Sistema API-20 C	34
2.2.9 Análisis y comparación genotípica	35
2.2.9.1 Técnica de extracción del DNA	35
2.2.9.2 Cuantificación del DNA	36
2.2.9.3 Técnica de amplificación al azar del DNA (RAPD)	37
2.2.9.4 Estandarización de la técnica de amplificación al azar	38
2.2.9.5 Electroforesis	38
2.2.9.6 Conservación de las imágenes	39
2.2.10 Cálculo del tamaño de la banda	39

2.2.11	Definición de concordancia en el tamaño de las bandas	41
2.2.12	Comparación de las cepas control con las cepas de pacientes.	41
2.2.13	Análisis de reproducibilidad del método	41
2.2.13.1	Variabilidad intraensayo	41
2.2.13.2	Variabilidad interensayo	42
2.2.14	Comparación de los pares de cepas de levaduras de orina y heces	43
2.2.14.1	Comparación de especies análisis fenotípico.	43
2.2.14.2	Comparación genotípica	43
2.2.15	Análisis estadístico	43
2.2.16	Consideraciones éticas	43
CAPÍTULO III RESULTADOS		44
3.1	Pacientes	44
3.2	Cepas colonizantes y cepas infectantes	46
3.3	Comparación de las características clínicas y microbiológicas de los casos de colonización vs infección por levaduras	46
3.3.1	Comparación de especies	47
3.4	Análisis genotípico de los pares de cepas	49
3.4.1	Evaluación de la reproducibilidad de la amplificación al azar del DNA	51
3.4.2	Variabilidad interensayo.	52
3.4.3	Variabilidad intraensayo	54

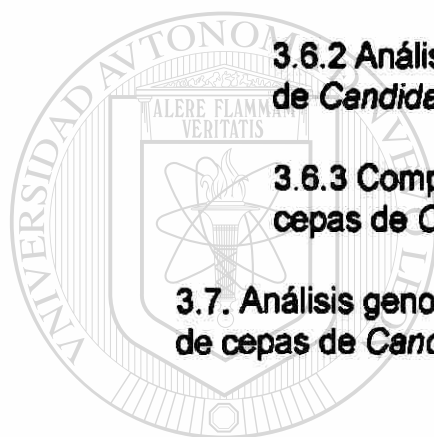


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.5 Análisis genotípico de los pares concordantes de <i>Candida tropicalis</i>	56
3.5.1 Selección de iniciadores	56
3.5.2 Comparación genotípica de las cepas de <i>Candida tropicalis</i>	57
3.5.3 Demostración de dos pares de cepas discordantes	63
3.6 Análisis genotípico de los pares de cepas de <i>Candida glabrata</i>	70
3.6.1 Selección de iniciadores	70
3.6.2 Análisis genotípico de la cepa control de <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	71
3.6.3 Comparación genotípica de las cepas de <i>Candida glabrata</i>	71
3.7. Análisis genotípico de los pares de cepas de <i>Candida albicans</i>	75
3.7.1 Selección de iniciadores	76
3.7.2 Análisis genotípico de la cepa control de <i>Candida albicans</i>	77
3.7.3 Comparación genotípica de las cepas de <i>Candida albicans</i>	77
3.8 Análisis genotípico de <i>Candida parapsilosis</i>	82
3.8.1 Selección de iniciadores para <i>Candida parapsilosis</i>	82
3.8.2 Análisis genotípico de la cepa control	83
3.8.3 Comparación genotípica de la cepa de <i>Candida parapsilosis</i>	84
3.9 Análisis genotípico de las cepas de <i>Trichosporon</i>	85

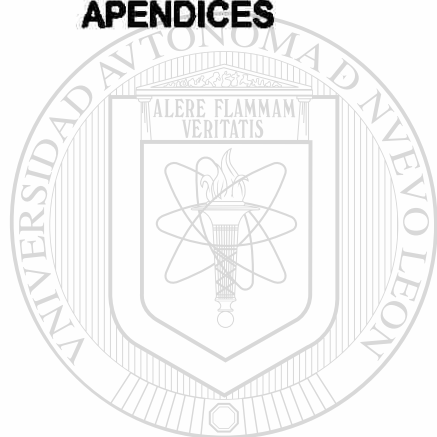


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

3.9.1 Selección de iniciadores para <i>Trichosporon</i>	85
3.9.2 Comparación genotípica de las cepas de <i>Trichosporon</i>	86
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN	92
CAPÍTULO V CONCLUSIONES	108
CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA	109
APENDICES	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

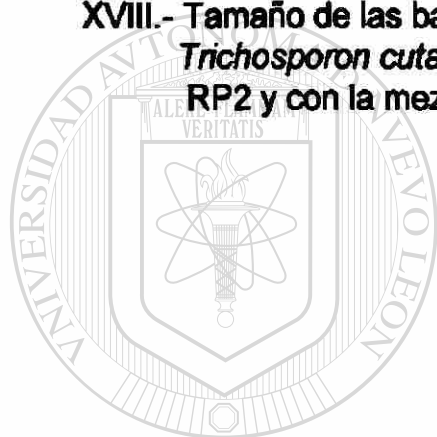


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

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

XIV.- Tamaño de las bandas para las cepas de <i>Candida albicans</i> con el iniciador RP2 a 36°C.	79
XV.- Tamaño de las bandas de las cepas de <i>Candida albicans</i> con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C.	81
XVI.- Tamaño de las bandas de la cepa de <i>Candida parapsilosis</i> con el iniciador SOY y con la mezcla SOY/RP2 a 36°C	85
XVII.- Tamaño de las bandas de la cepa de <i>Trichosporon beigelli</i> con un iniciador RP2 y con la mezcla RP2/RP1-4 a 36°C.	88
XVIII.- Tamaño de las bandas de la cepa de <i>Trichosporon cutaneum</i> con un iniciador RP2 y con la mezcla RP2/RP1-4 a 36°C.	90



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

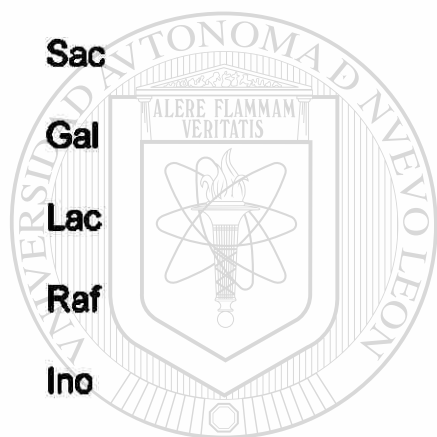
Figura	Página
1.-Colonización de la levadura <i>Candida a</i> través del tracto gastrointestinal.	8
2.- Espectro clínico de la candidiasis localizada.	9
3.- Espectro clínico de la candidiasis diseminada.	9
4.- Estrategia general.	26
5.- Marcador 100 pares de bases (Gibco Lab)	40
6.- Demostración de la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

16.- Cepa control <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 con iniciador SOY, y con la mezcla SOY/RP1-4.	71
17.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de <i>Candida glabrata</i> con el iniciador SOY a 36°C.	72
18.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de <i>Candida glabrata</i> con mezcla de iniciadores SOY/RP1-4 a 36°C.	74
19.- Selección de iniciadores para <i>Candida albicans</i> .	76
20.- Cepa control de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 y el iniciador RP2	77
21.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de <i>Candida albicans</i> con el iniciador RP2 y a 36°C.	78
22.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de <i>Candida albicans</i> con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C.	80
23.- Selección de iniciadores para <i>Candida parapsilosis</i> .	82
24.- Análisis molecular de la cepa control de <i>Candida</i> <i>parapsilosis</i> ATCC 22019 con el iniciador RP-2 y con mezcla de iniciadores SOY/RP2.	83
25.- Comparación genotípica de la cepa clínica de <i>Candida parapsilosis</i> con el iniciador SOY y mezcla SOY/RP2.	84
26.- Selección de iniciadores para <i>Trichosporon</i> .	86
27.- Comparación genotípica de la cepa clínica de <i>Trichosporon beigelli</i> con el iniciador RP2 y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4.	87
28.- Comparación genotípica de la cepa clínica de <i>Trichosporon cutaneum</i> con el iniciador RP2 y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4.	89

NOMENCLATURA

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

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



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Rf

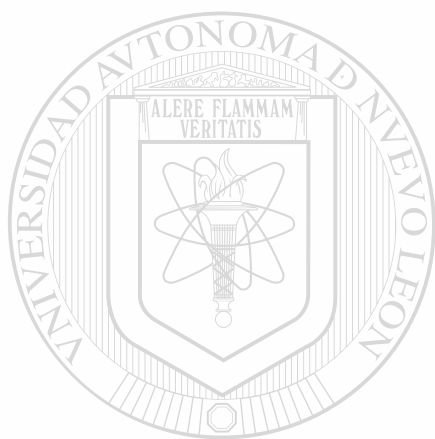
Factor de retardo

C

Carril

IN

Intensidad



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Q.C.B. María Guadalupe Rodríguez López

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


Número de páginas 114

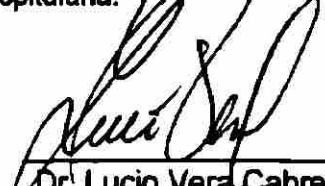
Candidato al grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica

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

Conclusiones y contribuciones:

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


Dra. Irma M. Rivera M.
Director


Dr. Lucio Vera-Cabrera
Co-director
VIII


Dra. Herminia G. Rodríguez M.
Co-director

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

A lo largo de la vida los individuos adquieren una flora microbiana que coloniza su piel y mucosas y que se encuentra en equilibrio con su organismo, sin embargo al ingresar al hospital esta flora microbiana se ve alterada por diferentes factores lo cual representa una puerta abierta para infecciones. Estos factores pueden ser por ejemplo intervenciones quirúrgicas, uso de catéteres y sondas foley. Otro factor que debilita al paciente es el uso de antibióticos y esteroides, así como ciertas condiciones como neutropenia, inmunosupresión; etc ¹.

La estancia hospitalaria permite que estos microorganismos presentes en la flora microbiana se tornen infecciosos para el paciente, pasando a otros compartimientos por ejemplo del tracto gastrointestinal a la uretra y posteriormente a la sangre. Estas infecciones intrahospitalarias aumentan la morbilidad y mortalidad del paciente por sobre su enfermedad de base, lo que se ve reflejado en los costos en la atención de cada paciente, y por supuesto demerita la calidad de la atención médica especialmente en hospitales de enseñanza ^{2,3}.

Por los factores que ya se han mencionado se entiende que los agentes causales provienen de la propia flora. Dentro de los principales agentes

causales de estas infecciones se encuentran *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, bacilos gram negativos, (enterobacterias), microorganismos anaerobios, y algunos hongos.

1.2 Epidemiología de las micosis nosocomiales

Durante la década de los sesenta gradualmente las levaduras han ido pasando de ser un comensal a un patógeno oportunista ocupando el cuarto lugar de las septicemias primarias de 1980 a 1989, implicando esto un aumento de alrededor del 500% con respecto a la década de los setenta, teniendo una mortalidad del 57% y una mortalidad atribuible del 38%, representando aproximadamente el 8% del total de las infecciones intrahospitalarias ^{3,4}.

La proporción de infecciones intrahospitalarias reportadas debido a micosis aumentó de 6% en 1980 a 10.4% en 1990 siendo los mayores sitios de infección heridas quirúrgicas que pasó del 1.5% al 5.1%, infecciones del tracto urinario del 6.7% al 18.7% e infecciones sanguíneas de 5.4% a 9.9%. Dentro de los principales agentes causales de infecciones micóticas tenemos a hongos como *Aspergillus spp*, *Mucor spp*, *Rhizopus spp*, *Fusarium spp*, *Trichophyton rubrum* y *Malassezia furfur*, y diferentes especies de levaduras como *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichosporon spp*. En particular las infecciones por levaduras o relacionadas constituyen aproximadamente del 60 al 85% de todas las micosis nosocomiales ⁵. En nuestro hospital *Candida* también se encuentra entre los primeros cuatro agentes aislados en infecciones nosocomiales, siendo

el primero en la unidad de cuidados intensivos pediátricos y el tercero en las unidades de cuidados intensivos adultos ⁶.

En los últimos 25 años las micosis han ido adquiriendo mayor importancia, en los Estados Unidos, según los datos recopilados por el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales que ha observado un aumento en la incidencia de estas infecciones micóticas (2-3.8 por cada 1,000 egresos) ⁵, esta tendencia continuó en la década de los 90.

1.3 Características microbiológicas del género *Candida*

Las levaduras del género *Candida* son grampositivas, que miden de 2 a 3 por 4 a 6 μm ; sus células son alargadas semejantes a hifas (pseudohifas) las cuales se reproducen por gemación y existen formas sexuadas y asexuadas. En agar de Saboureaud incubado a temperatura ambiente se desarrollan colonias blandas de color cremoso y brillante con olor a levadura de pan. El desarrollo superficial consiste de células ovals en gemación y el desarrollo sumergido consiste en pseudomicelios. Este último está compuesto de pseudohifas que forman blastoconidias en los nódulos y algunas veces clamidoconidias en sus terminales. El hábitat de las diversas especies de *Candida* es el humano y algunos animales homeotérmicos. Estos microorganismos no se aíslan del suelo ni de los detritus vegetales. Los aislamientos que se han hecho de estas fuentes se consideran por contaminación fecal. El género *Candida* está compuesto de varias especies que se pueden diferenciar entre sí por su diversidad fermentativa y de asimilación

de varios carbohidratos. *Candida albicans* se diferencia de las demás especies por la producción de clamidosporas y la formación del tubo germinativo en suero ⁷.

Desde la antigüedad Hipócrates en su obra "Epidemias" describe que en niños recién nacidos y pacientes debilitados se presentaban placas blanquecinas en la boca, a los que denominó "estomatitis aftosa". En Francia fueron descritas diversas variedades clínicas por Veron y Berg en 1835 y no es sino hasta 1844 cuando Bennet y 1853 Robin, aíslan el hongo y propusieron que la enfermedad era propia de pacientes debilitados. A través de los años han sido muchos los autores que han descrito las variedades clínicas por medio de trabajos epidemiológicos. En la actualidad la candidiasis sigue siendo una de las enfermedades más estudiadas por su creciente importancia ⁷.

Actualmente *Candida* se sigue considerando como patógeno oportunista y afecta a pacientes en diversos estados como: aquellos sometidos a procedimientos invasivos, que están en uso de sondas urinarias y catéteres intravenosos, que utilizan antibióticos de amplio espectro, esteroides o en quimioterapia. También se presenta en pacientes con neutropenia o linfopenia, en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana, en pacientes con cáncer con o sin la utilización de la quimioterapia, en recién nacidos y pacientes inmunosuprimidos¹.

1.4 Especies de levaduras de importancia clínica

Aunque existen más de 100 especies de *Candida* las más comúnmente aisladas de casos clínicos son: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida norvegensis*, *Candida lusitanae*, así como especies de *Trichosporon* y *Rhodotorula*.

Candida albicans es la especie predominante en una gran variedad de cuadros clínicos. A nivel de infecciones en vías urinarias se le reconoce por que comparada con las otras especies posee menor capacidad de virulencia y tiene mayor susceptibilidad a antifúngicos de uso clínico. Sin embargo en reportes recientes su capacidad de virulencia y resistencia a los antifúngicos ha aumentado ^{8,9}.

Candida tropicalis ha sido reconocida como la mayor causa de candidiasis invasiva en pacientes con cáncer ⁹. En estudios tempranos se ha documentado diseminación hematológica en todos los pacientes que presentaron persistentemente colonización con esta especie, se ha reportado también que *Candida tropicalis* es la más frecuentemente aislada en infecciones de vías urinarias. Esto es quizá debido a que *Candida tropicalis* presenta factores de virulencia como mayor capacidad de adherencia e invasividad. *Candida tropicalis* ha sido considerado como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos por neutropenia, con supresión de la flora bacteriana o con daño en la mucosa gastrointestinal ⁹.

Candida glabrata se ha reconocido como la tercer especie más comúnmente reportada en casos de candidemia y como la segunda en importancia a nivel de infecciones en vías urinarias. Se ha documentado una resistencia importante al fluconazol y otros azoles y se ha relacionado con una alta tasa de mortalidad ⁹.

Candida krusei es la especie que es aislada menos frecuentemente de pacientes con infección; ésta se presenta con menos frecuencia como colonizante (menos del 10%), y es considerada menos virulenta que *Candida albicans* o *Candida tropicalis*. Sin embargo es un patógeno considerable en pacientes granulocitopénicos, y lo notable es que esta especie está asociada a resistencia al fluconazol en concentraciones in vitro de 25 mg/mL las cuales son imposibles de alcanzar en la práctica clínica ⁹.

Candida parapsilosis se ha reconocido como causante de fungemia, endocarditis, artritis séptica y peritonitis y se aísla de un 7-10% de las infecciones hematógenas ⁹.

Candida lusitaniae podría ser considerada como una importante causa de infección nosocomial en personas inmunocomprometidas. Esta puede ser resistente a uno o más agentes antifúngicos incluyendo anfotericina B ⁹.

Existen también levaduras relacionadas al género *Candida* como *Trichosporon* y *Rhodotorula* cuyas infecciones se tratan igual a las producidas por las levaduras del género *Candida*.

1.5 Mecanismos fisiopatogénicos

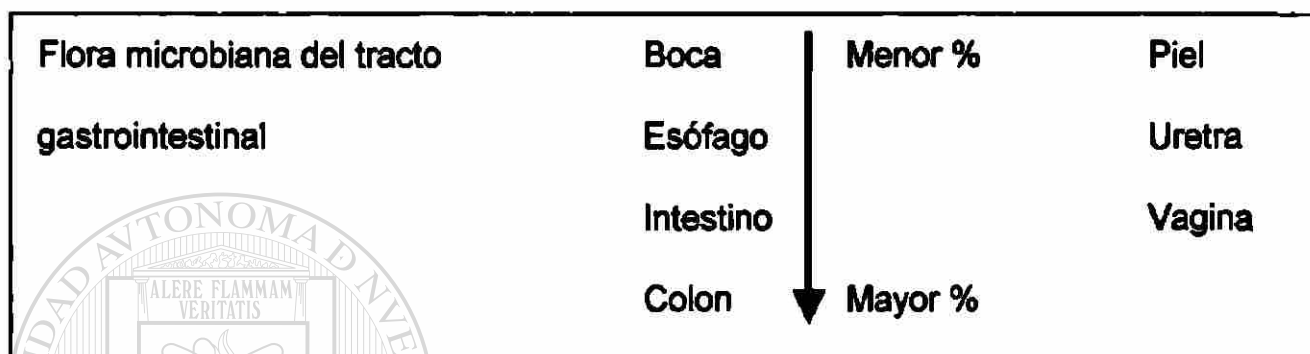
En el medio hospitalario, *Candida* ha pasado de ser un comensal que forma parte de la flora gastrointestinal a ser un patógeno oportunista ¹⁰.

Diversas especies de *Candida* son componentes de la flora habitual del cuerpo, se presentan desde los primeros días del nacimiento y tienen una fuerte predilección hacia las mucosas¹¹. Se pueden encontrar en el tracto gastrointestinal habitando boca y faringe y su número se puede incrementar por múltiples factores tales como una simple falta de aseo bucal. Estas levaduras colonizan con facilidad el intestino delgado y grueso, de aquí que sea común encontrarlas en la materia fecal y en la región perianal. La flora intestinal compuesta por *Candida* y otras levaduras como *Saccharomyces* y *Torulopsis* se incrementa con dietas ricas en carbohidratos y sobre todo con frutas.

Diversos estudios reportan que las diferentes especies de *Candida* no son frecuentes en piel sana, llegándose a aislar esporádicamente en región perianal, interdigital y umbilical. Cuando la piel está enferma sobre todo por algunas dermatosis (dermatitis por contacto o del área del pañal) la flora de *Candida* se incrementa¹¹. En vías respiratorias superiores y urinarias se encuentran frecuentemente. Las mucosas genitales son también colonizadas, en el hombre es menos frecuente y se puede encontrar hasta en un 5%¹¹. En las mujeres no embarazadas se encuentra en la vagina aproximadamente también en un 5%, sin embargo en mujeres embarazadas o que ingieren anticonceptivos orales, ésta proporción se incrementa hasta en un 30%¹¹.

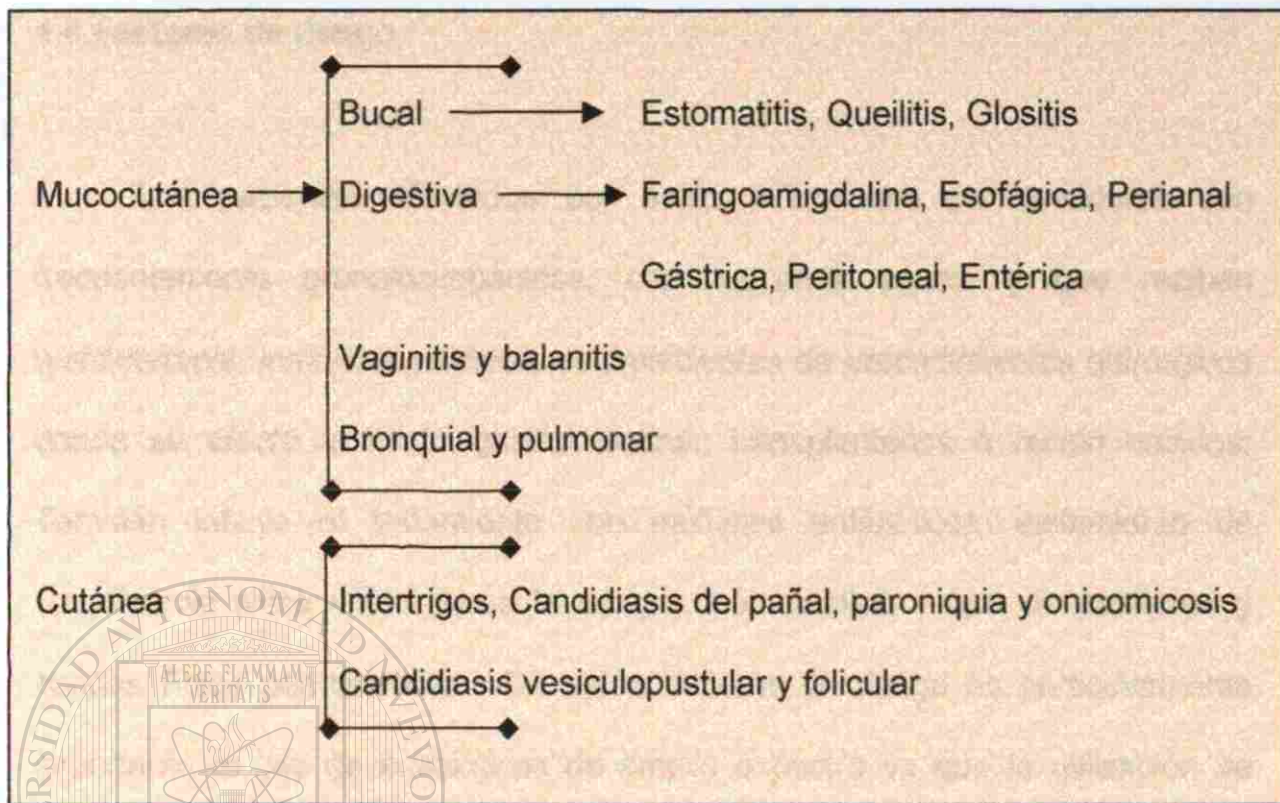
En la figura 1 se muestra como el porcentaje de colonización por *Candida* es diferente en los distintos segmentos del tracto gastrointestinal, siendo menor en la boca y mayor en el colon.

Figura 1.- Colonización de la levadura *Candida* a través del tracto gastrointestinal.



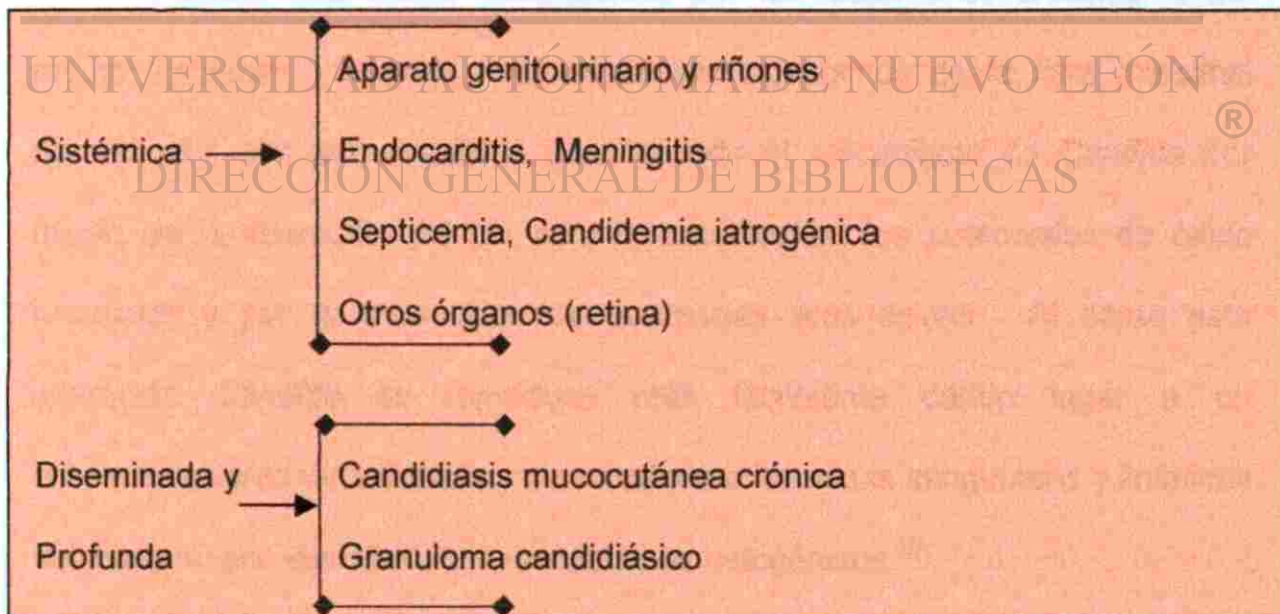
Los pacientes que se encuentran internados en los hospitales presentan los factores de riesgo mencionados anteriormente, y esto contribuye a que las infecciones locales se compliquen a infecciones diseminadas y sistémicas como se observa en la Figura 2 y 3.

Figura 2.- Espectro clínico de la candidiasis localizada.



(11)

Figura 3.- Espectro clínico de la candidiasis diseminada.



(11)

1.6 Factores de riesgo

Los pacientes afectados por estas infecciones por levaduras son frecuentemente granulocitopénicos, con leucemia aguda y que reciben quimioterapia, inmunosuprimidos, convalecientes de procedimientos quirúrgicos donde se afecta al tracto gastrointestinal, transplantados ó recién nacidos. También influye el tratamiento con múltiples antibióticos, aislamiento de *Candida* de sitios diferentes a la sangre, hemodiálisis y uso de catéteres y sondas Foley permanentes. De estos factores de riesgo es particularmente importante el uso de antibióticos de amplio espectro ya que la utilización de estos rompe el equilibrio normal entre los habitantes microbiológicos del intestino delgado. Una disminución en la población de las bacterias puede traer como resultado una menor competencia por los factores de crecimiento del medio ambiente. Además muchos de los organismos de la flora intestinal normal han mostrado habilidad para impedir el crecimiento de *Candida* por medio de la alteración del pH normal, cambios en los potenciales de óxido reducción y por la producción de sustancias antifúngicas. Al darse esta alteración *Candida* se reproduce más fácilmente dando lugar a un sobrecrecimiento de la misma y se introduce a los vasos sanguíneos y linfáticos del intestino por sus diferentes mecanismos patogénicos ¹⁰.

Wey y col¹². demostraron en un estudio de casos y controles, que el factor de riesgo independiente más fuertemente asociado a candidemia es el

uso de antibióticos y que dicho riesgo aumentaba según el número de antibióticos utilizados, siendo más importante en aquellos con dos o más antibióticos.

Por otra parte Karabinis y col¹³. reportaron los resultados de un estudio de casos y controles en el cual utilizaron análisis multivariado para determinar factores de riesgo en 33 pacientes con cáncer y candidemia, encontrando que el factor más importante fue la colonización por *Candida spp* en otro sitio diferente a la sangre y el uso de antibióticos¹³.

En las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) la candidemia se ha asociado hasta en un 40% de aumento en la mortalidad de los pacientes, ésta es una complicación importante por que el tratamiento es costoso y tóxico, además que ya se mencionó que varias de las especies de *Candida* son resistentes al fluconazol^{3,8}. De las infecciones causadas por *Candida* el 46% son en vías urinarias, esta candiduria es el paso previo a la candidemia y puede ser prevenible por lo que es importante entender sus mecanismos fisiopatogénicos¹⁴.

1.7 Tipos de colonización

La candiduria como otras infecciones nosocomiales pueden provenir de fuentes exógenas como endógenas. El principal reservorio y puerta de entrada de la candiduria es generalmente, la flora del tracto gastrointestinal¹⁵. La colonización por *Candida* en la mucosa del tubo digestivo ocurre normalmente

desde las primeras horas de vida y en diferentes muestreos de adultos sanos se han cuantificado en saliva desde 0 hasta 500 ufc/mL y en heces desde 0 hasta 1,000 ufc/gramo ¹⁶. Estas cuentas normalmente se encuentran contenidas por la flora microbiana, pero este equilibrio constante se ve amenazado por la tendencia proliferativa de las levaduras, el cual se rompe a favor de éstas con presencia de antibióticos con actividad sobre la flora intestinal.

En un estudio realizado por Krause y col. a voluntarios sanos se les administró por vía oral en una suspensión 80 gramos de *Candida albicans*, lo cual equivale a aproximadamente 1×10^{12} células de levaduras, en este experimento se logró recuperar el hongo, tanto en sangre como en orina a las tres horas siguientes, este fenómeno lo llamó persorción, como una forma de absorción. Esto demuestra que la *Candida* es capaz de pasar del tracto gastrointestinal a la sangre ^{17,18}.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Aunque no existen estudios controlados que demuestren la cifra necesaria de levaduras en heces para su invasividad, lo anteriormente dicho hace suponer que una cuenta mayor de 10^9 colonias de levaduras por mL en las heces puede resultar en invasión hematógica y excreción por la orina ^{17,18}. Por todos estos puntos mencionados se asume que la mayoría de las candidurias provienen de origen endógeno, sin embargo existen también fuentes exógenas que se relacionan con el medio ambiente hospitalario, infusiones contaminadas, lavado inapropiado de manos, métodos invasivos

tanto diagnósticos como terapéuticos, como sondas urinarias, sondas nasogástricas y catéteres intravenosos. Este origen se ha demostrado sobre todo en estudios a nivel de neonatos donde se ha encontrado colonización en el catéter y esta cepa corresponde a cepas encontradas en las manos del personal, existen también estudios donde se han recolectado muestras de las manos del personal que trabaja en las UCI y ha sido posible el aislamiento de *Candida* de las mismas ^{19,20}.

A nivel de candidurias no existen estudios que determinen que proporción corresponde a cada uno de los mecanismos, aún así el porcentaje que se esperaría de origen exógeno no sería mayor al 20%.

El origen exógeno no es tan fácilmente demostrable debido a que sería necesario tomar muestras de todo el personal de la sala así como del instrumental médico y otros probables reservorios. En este estudio decidimos demostrar el origen endógeno y asumir un origen exógeno en las que no correlacionen con la cepa endógena.

Es importante entender los mecanismos en las candidurias debido a que esto permitirá orientar con mayor eficacia las medidas preventivas, si es de origen endógeno modificando las condiciones que alteran la flora intestinal con el control de antibióticos y la profilaxis con antimicóticos. Sin embargo si es de origen exógeno se tendrá que dar énfasis al lavado de manos por parte del personal y a evitar la manipulación innecesaria de la sonda.

1.8 Identificación de especies de levaduras

1.8.1 Métodos fenotípicos

Las especies de *Candida* deben ser identificadas correctamente a nivel del laboratorio de microbiología. Los métodos tradicionales para la identificación de especies de *Candida* y otras levaduras incluyen el análisis de características morfológicas y la utilización de carbohidratos en pruebas de fermentación y asimilación ^{21,22}.

Wickerham y Burton demostraron el uso de las pruebas de asimilación de carbohidratos para la clasificación de levaduras en 1948, los cuales fueron simplificados en 1975 ²³, sin embargo estos métodos tradicionales de laboratorio son laboriosos y el tiempo de procedimiento es largo, es por eso que se han desarrollado numerosos sistemas comerciales que pueden identificar las levaduras entre 4 y 72 horas dependiendo del sistema ²¹.

Idealmente, estos sistemas deben tener las siguientes características:

- 1.- La identificación de levaduras que se aíslan de todos los especímenes clínicos debe ser rápida y precisa.
- 2.- Facilitar el proceso y la inoculación para permitir el procesamiento rápido de varios aislamientos.
- 3.- Capacidad para identificar aislamientos que son poco comunes recuperados del material biológico ²⁴.

El sistema API 20C fue uno de los primeros sistemas comerciales introducidos para la identificación de levaduras, y actualmente es considerado un sistema confiable el cual puede ser comparado con otros, este sistema utiliza ambas pruebas, fermentación y asimilación de carbohidratos. Otro

sistema de identificación es el AUXACOLOR, su principio es similar al API 20C, y utiliza también ambas pruebas. Ambos sistemas han sido reportados como métodos simples, rápidos y proveen un medio preciso para la identificación de levaduras en aislamientos clínicos ²⁵. El sistema RapID es otra alternativa para la identificación de levaduras, este sistema se basa en reacciones bioquímicas y requiere solamente 4 horas de incubación, lo cual permite una identificación muy rápida de las levaduras ²¹.

1.8.2 Métodos genotípicos

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 ²⁶.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La electroforesis en gel por campo pulsado es considerada el estándar de oro de los métodos de tipificación molecular. El aislamiento del DNA cromosómico intacto es un requisito previo para la generación reproducible de los fragmentos, los cuales son cortados con enzimas de restricción que tienen pocos sitios de reconocimiento. Para el análisis por electroforesis en gel se prepara una lisis in situ de las células, las cuales son preparadas en bloques de agarosa. Esto provee un medio ambiente protegido de fuerzas moleculares. Con el microorganismo en el bloque se realiza una lisis enzimática con

detergentes y la digestión con la enzima de restricción, esta técnica puede separar fragmentos en un rango de 10 a 800 kb ²⁷. La electroforesis es multidireccional, y continuamente hay cambios en la localización de la carga positiva. Las moléculas de DNA responden continuamente reorientando su dirección de migración a través del gel de agarosa. Los pulsos electroforéticos de duración diferente favorecen la reorientación de diferentes tamaños de moléculas de DNA (un pulso de mayor duración favorece la reorientación de moléculas grandes y viceversa). Los patrones electroforéticos pueden ser visualizados en geles teñidos con bromuro de etidio²⁸. Uno de los factores que ha limitado el uso de la electroforesis en gel por campo pulsado es el tiempo, el cual es largo y se necesitan de 2 a 3 días para completar todo el procedimiento. Esto tiene impacto en los laboratorios debido a que no se puede analizar un número grande de muestras ²⁷.

Los métodos de hibridación con sondas de DNA han sido utilizados por años para detectar y localizar secuencias genómicas en células eucarióticas y procarióticas. En este método se realiza una digestión del DNA cromosomal y los fragmentos son separados por electroforesis a través de un gel de agarosa. Los fragmentos de DNA separados son transferidos a un papel de nitrocelulosa o membrana de nylon para la hibridación con la sonda de DNA. La membrana con los ácidos nucleicos es hibridada con una o más sondas para el gene que se requiere encontrar. Las sondas están unidas a una enzima, la cual reacciona con un sustrato el cual es colorimétrico, con esto es posible visualizar si el gen que se está buscando se encuentra presente o no. Este método ha

sido adaptado para la diferenciación de cepas bacterianas en base a la observación que la localización de varios sitios cortados con la enzima de restricción da como resultado bandas que difieren en tamaño entre las mismas cepas.

La ribotipificación es una variación del análisis con enzimas de restricción e hibridación con sondas, en este método se utilizan sondas que provienen para el 16S y 23S de los genes del RNA ribosomal. Esto ha sido aplicado en muchos estudios para la diferenciación de cepas bacterianas. La ventaja de esta técnica es que la cantidad de bandas que se detectan es limitada simplificando la interpretación. Sin embargo esto dificulta la habilidad para distinguir entre cepas muy relacionadas ²⁷.

En la amplificación al azar del DNA polimórfico se utilizan iniciadores al azar en la reacción en cadena de la polimerasa, este ensayo fue descrito por Williams²⁹ y col. y Welsh and McClelland³⁰. El ensayo de amplificación al azar se basa en el uso de secuencias cortas de iniciadores de 9 a 10 bases de longitud, los cuales se aparean a secuencias del DNA. Las temperaturas de apareamiento son muy bajas. El número y la localización de los iniciadores al azar varían para diferentes cepas de la misma especie; esto da como resultado la amplificación de bandas de diferente tamaño. El producto de la amplificación se separa por electroforesis en gel de agarosa, dándonos el patrón de bandas distintivo para cada cepa ²⁷.

La desventaja de esta técnica es que el proceso es extremadamente sensible respecto a cambios en la temperatura de apareamiento, lo cual puede causar variabilidad en el patrón de bandas. Además la utilización de iniciadores empíricos dificulta la estandarización de la técnica ²⁷.

En el método de fragmentos de restricción a lo largo del DNA polimórfico se analiza la secuencia de variación del genoma usando endonucleasas de restricción. Estas enzimas de restricción reconocen secuencias específicas del DNA, usualmente de 4-6 nucleótidos y corta el DNA dentro o cerca de la secuencia de reconocimiento. Las alteraciones de las secuencias por sustitución de nucleótidos alteran el patrón electroforético de la cepa. Mutaciones en los sitios de corte de la enzima pueden cambiar también el patrón electroforético. Cualquier región del DNA puede ser utilizada para el análisis con enzimas de restricción ²⁶.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Todos estos métodos de genética molecular para distinguir los subtipos de microorganismos están basados en diferencias en la secuencia del DNA, lógicamente la secuenciación del DNA es el método más apropiado para diferenciar subtipos. Esta técnica emplea nucleótidos fluorescentes para marcar el DNA, y se realiza en un aparato automatizado ²⁷.

Hay varias consideraciones que deben tomarse en cuenta para la utilización de la secuenciación del DNA para subtipificación de microorganismos: Primero para propósitos prácticos en el laboratorio clínico la

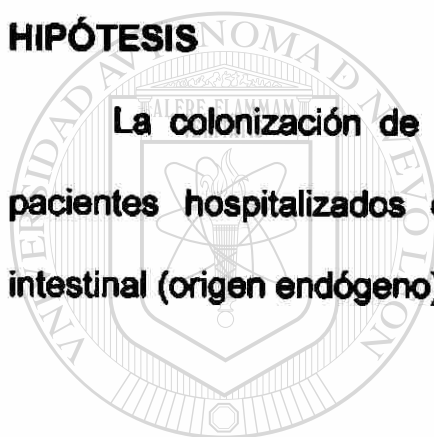
secuenciación debe ser directamente en solo una pequeña región del cromosoma de un organismo. Esto es impráctico para secuencias de múltiples regiones o regiones largas del cromosoma. En contraste en las técnicas de electroforesis en gel por campo pulsado o amplificación al azar del DNA se examina el cromosoma entero. La secuenciación examina solo una pequeña parte del genoma, el cual puede variar potencialmente sobre todo en bacterias o cepas de levaduras y hongos ²⁷.

La secuenciación es considerada como el estándar de oro para la tipificación viral. La secuenciación de ácidos nucleicos tiene mayor poder discriminatorio por ejemplo para genotipos de hepatitis C y detección de mutaciones en el virus de la inmunodeficiencia humana ²⁷.

En el presente trabajo se realizó la técnica de amplificación al azar del DNA polimórfico para la diferenciación genotípica de las diferentes cepas de *Candida* obtenidas a lo largo del estudio.

HIPÓTESIS

La colonización de las vías urinarias por levaduras, observada en los pacientes hospitalizados con catéter vesical, proviene de su propia flora intestinal (origen endógeno) en un 80% de los casos.



UANL

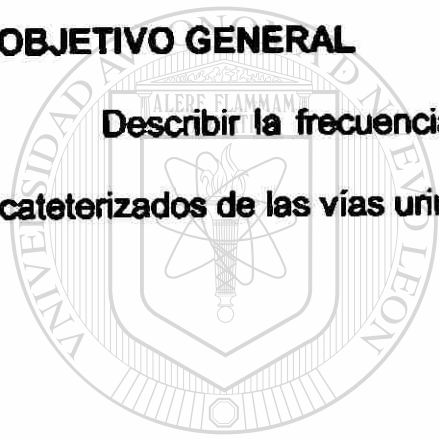
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVO GENERAL

Describir la frecuencia con la que la candiduria observada en pacientes cateterizados de las vías urinarias es de origen endógeno.



UANL

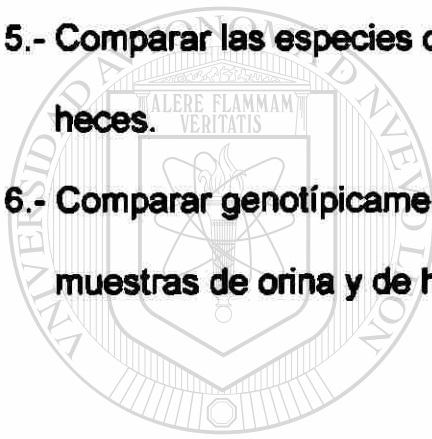
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Describir la frecuencia de colonización de las vías urinarias por levaduras en pacientes con catéter vesical.**
- 2.- Describir las características clínicas y demográficas de los pacientes que desarrollan candiduria.**
- 3.- Describir la frecuencia de colonización e infección urinaria por las diferentes especies de levaduras.**
- 4.- Describir la evolución clínica de los casos de candiduria.**
- 5.- Comparar las especies de levaduras que colonizan simultáneamente orina y heces.**
- 6.- Comparar genotípicamente los pares de levaduras provenientes de muestras de orina y de heces de la misma especie.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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 clorhídrico 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

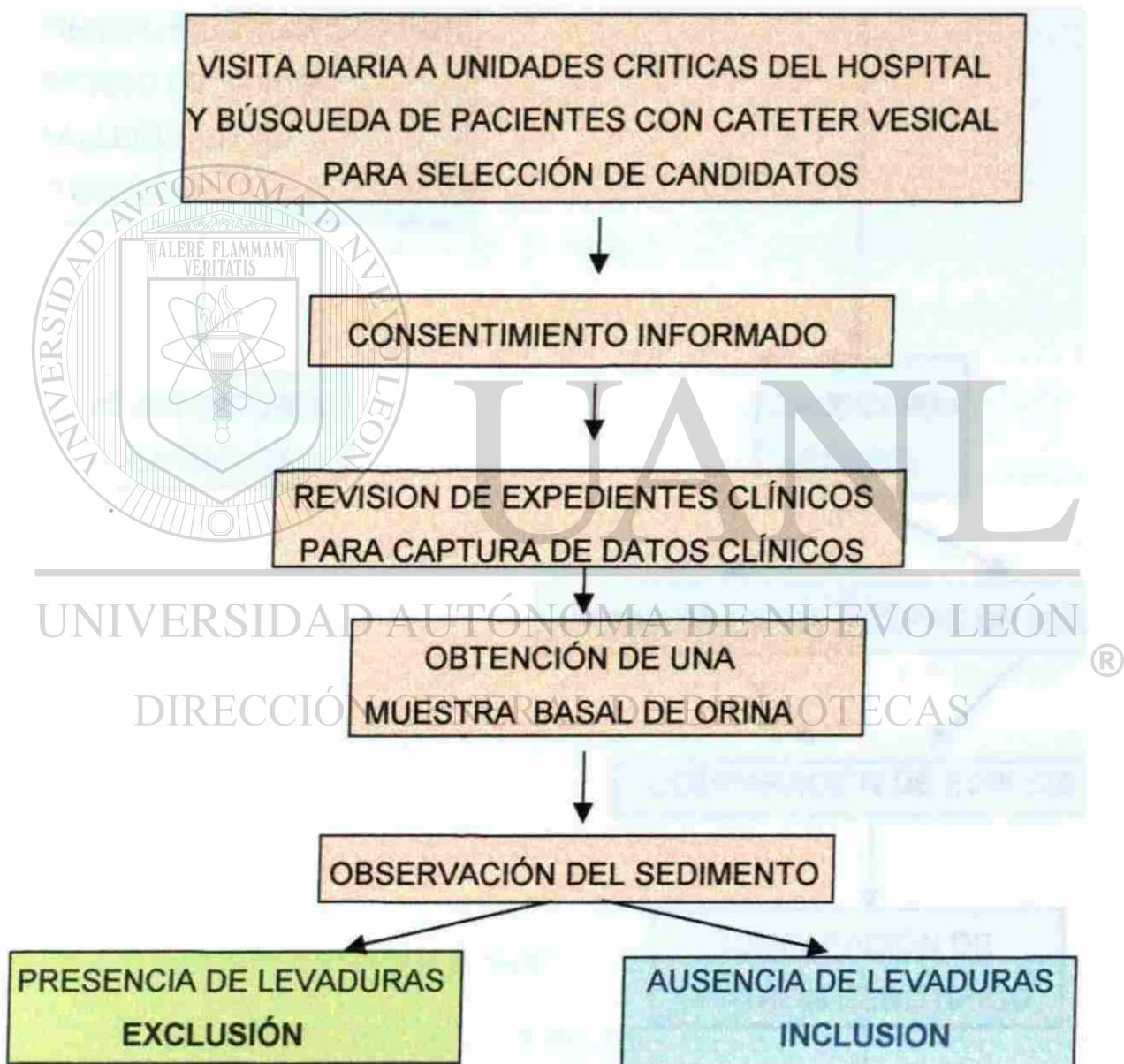
En la fase experimental se utilizó un termociclador PTC-200 de MJ Research, un microscopio standard 25 de Zeiss, una incubadora modelo 417 de Lab. Line Instruments, Inc, un refrigerador a 4°C Torrey, una centrífuga IEC HN-S Damon/lec Division, un autoclave modelo 254 M marca Tuttnaver, un baño de agua 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

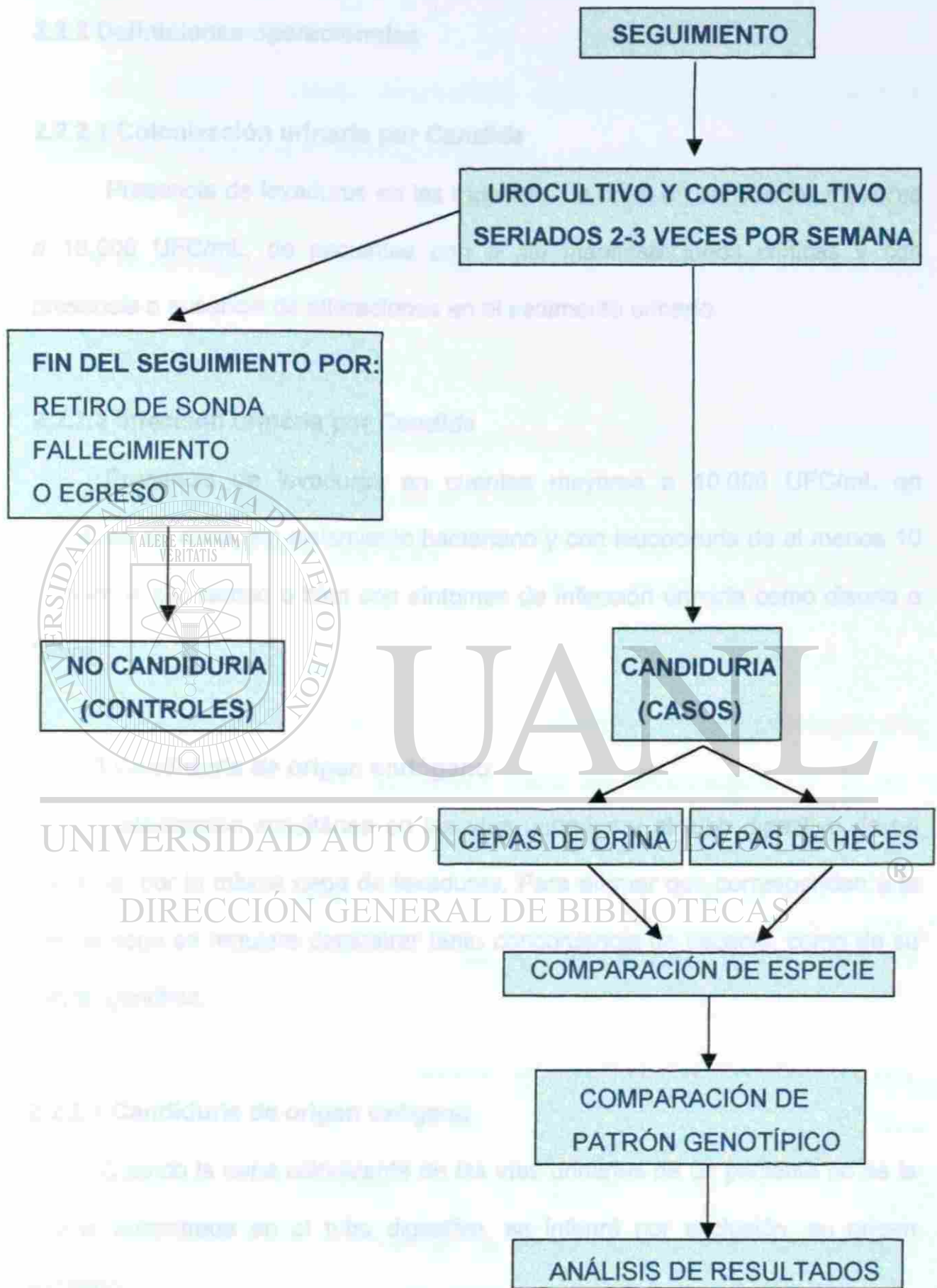
espectrofotómetro spectronic gol, de Milton Roy, un sistema analizador de geles de Bio-Rad, un analizador de Eastman Kodak Company, Rochester N.Y.

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





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 incluidos les fuera retirada la sonda, fallecieron o fueron 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 estreptomycinina (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 orina³².

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°C³².

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 blastosporas⁷. 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 hrs⁷. 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 positiva³³. 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 positivo³³. 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 μ L 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 liticosa 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 μ L de β -mercaptoetanol y 85 μ g de lincasa. Se incubó por 8 hrs a 37°C y se separó el paquete celular por centrifugación. Se añadieron 500 μ L de solución de lisis TSNT; se mezcló por inversión y se añadieron 200 μ L de fenol saturado; se mezcló por inversión y se le añadieron 100 μ L de solución Sevag. Se agitó en vortex por 5 minutos y se añadieron 200 μ L 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 μ L 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 μ L 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/ μ L.

La preparación de todas las soluciones utilizadas en las diferentes técnicas de biología molecular se encuentran en el Apéndice C³⁴.

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 Lehmann³⁶ 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 cols³⁸:

Concentración de iniciadores 0.8 μ M

Concentración de MgCl₂ 2.7 mM

Cantidad total de DNA 10 ng

Volumen final de reacción de 50 μ L

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°C³⁶.

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

2.- SOY - RP4-2

3.- SOY - RP1-4

4.- RP-2 - RP4-2

5.- RP-2 - RP1-4

6.- RP4-2 - RP1-4

La concentración de iniciadores: 1, 2 y 3 μ M

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}.

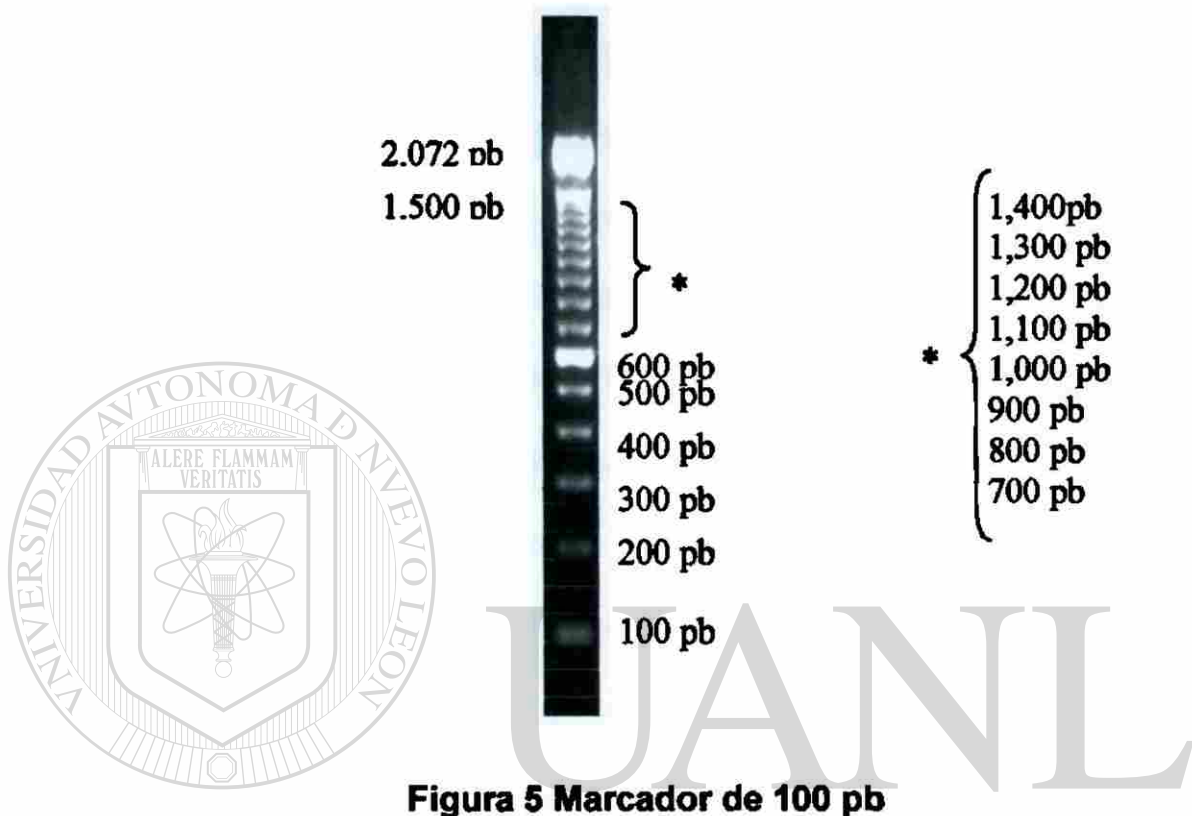
2.2.9.6 Conservación de las imágenes

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.



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 incluidos. 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:

<i>Candida tropicalis</i>	17 (56%)
<i>Candida glabrata</i>	6 (20%)
<i>Candida albicans</i>	4 (13%)
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (3%)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	1 (3%)
<i>Trichosporon beigelli</i>	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 1×10^8 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	6 (67%)	11 (52%)
Femenino	3 (33%)	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
<i>Candida tropicalis</i>	5 (30%)	12 (70%)
<i>Candida glabrata</i>	0 (0%)	6 (100%)
<i>Candida albicans</i>	3 (75%)	1 (25%)
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (100%)	0 (0%)
<i>Trichosporon beigelli</i>	0 (0%)	1 (100%)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	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	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
2	PNM	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
3	FHM	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
4	RLH	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
5	CGO	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
6	NMC	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
7	GPG	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
8	ROS	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
9	SQQ	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
10	EGR	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
11	JLHS	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
12	JLG	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
13	RPM	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
14	MIV	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
15	RCM	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Concordante
16	PRC	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida glabrata</i>	Discordante
17	MCM	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	Discordante
18	VIH	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	Concordante
19	GLP	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	Concordante
20	HGM	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	Concordante
21	RLH	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	Concordante
22	MAA	<i>Candida glabrata</i>	<i>Trichosporon spp</i>	Discordante
23	FUZ	<i>Candida glabrata</i>	<i>Trichosporon beigelli</i>	Discordante
24	MLR	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Concordante
25	ECS	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Concordante
26	PGE	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Concordante
27	FZC	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Concordante
28	CFE	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	Concordante
29	JGC	<i>Trichosporon beigelli</i>	<i>Trichosporon beigelli</i>	Concordante
30	FGV	<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>	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 líticosa 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:

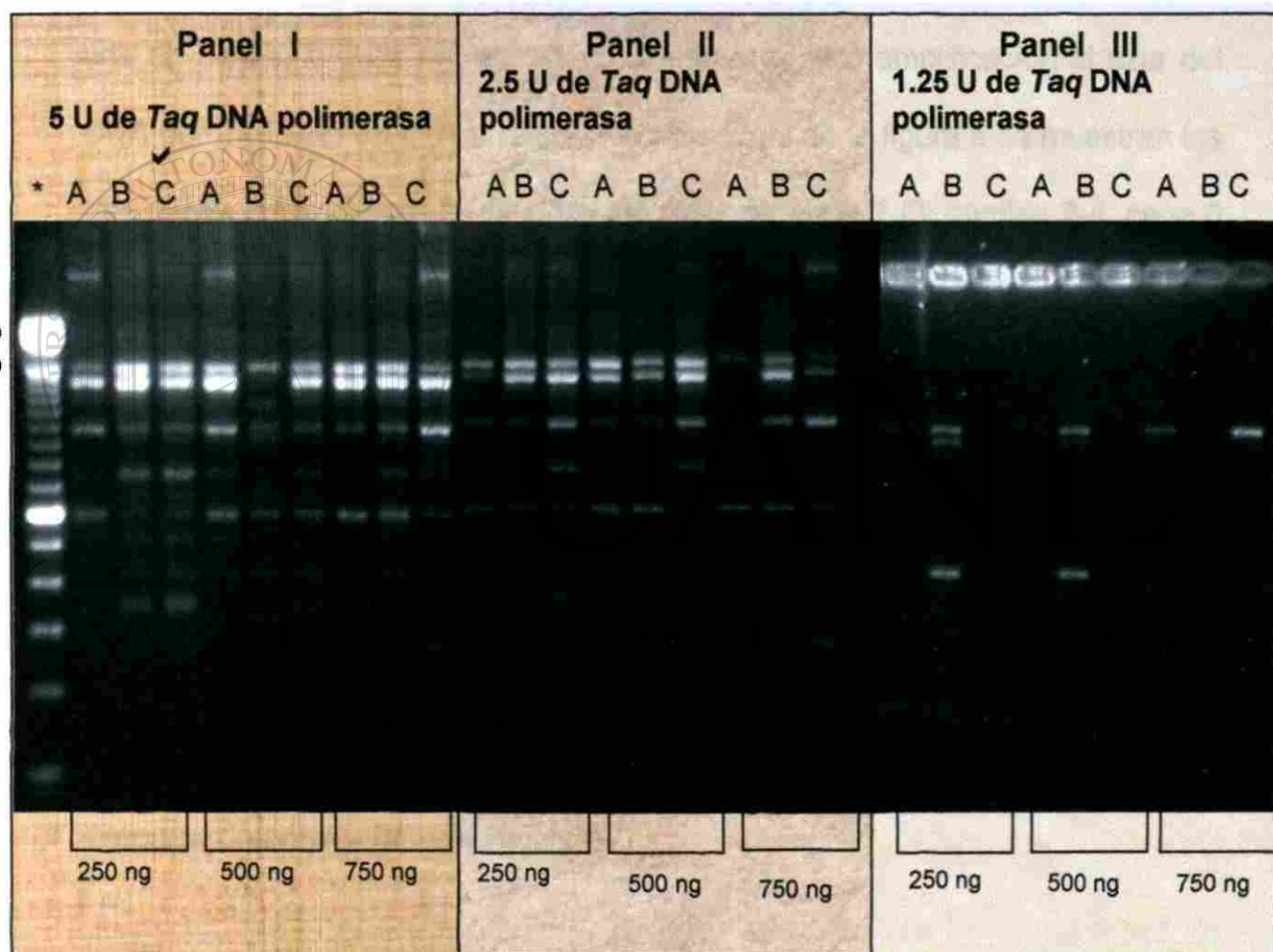


Figura 7.- Resultados de la estandarización de la técnica de amplificación al azar. Se probaron diferentes concentraciones de iniciadores 1 μ M (A), 2 μ M (B), y 3 μ M (C), y cantidad de *Taq* DNA polimerasa: 5, 2.5 y 1.25 Unidades y de DNA: 250, 500 y 750 ng. *Marcador de 100 pb

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 μ M 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.

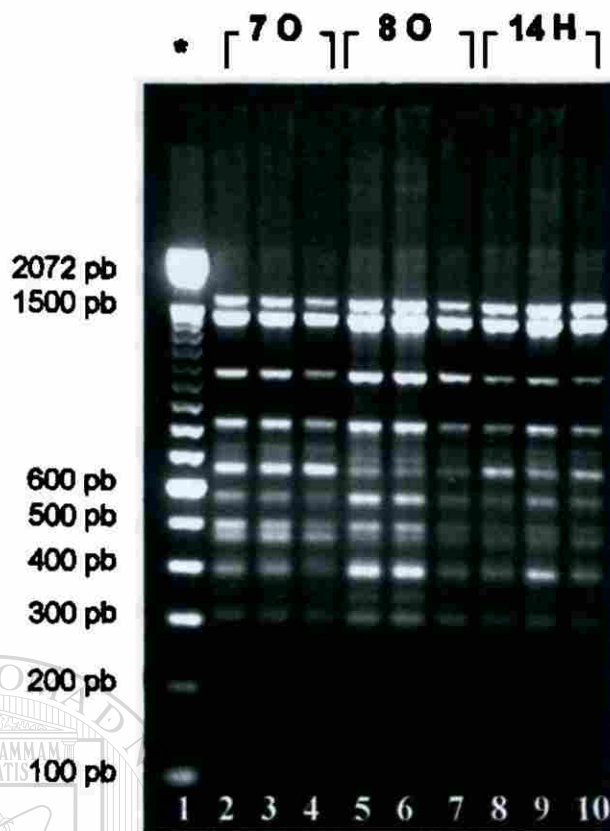


Figura 8.- Amplificación de 3 cepas de *Candida tropicalis* seleccionadas al azar, 7 O, carriles 2, 3 y 4, 8 O carriles 5, 6 y 7 y 14 H carriles 8, 9 y 10, las cuales fueron evaluadas por triplicado para el análisis de reproducibilidad. Carril 1 Marcador de 100 pares de bases.

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.

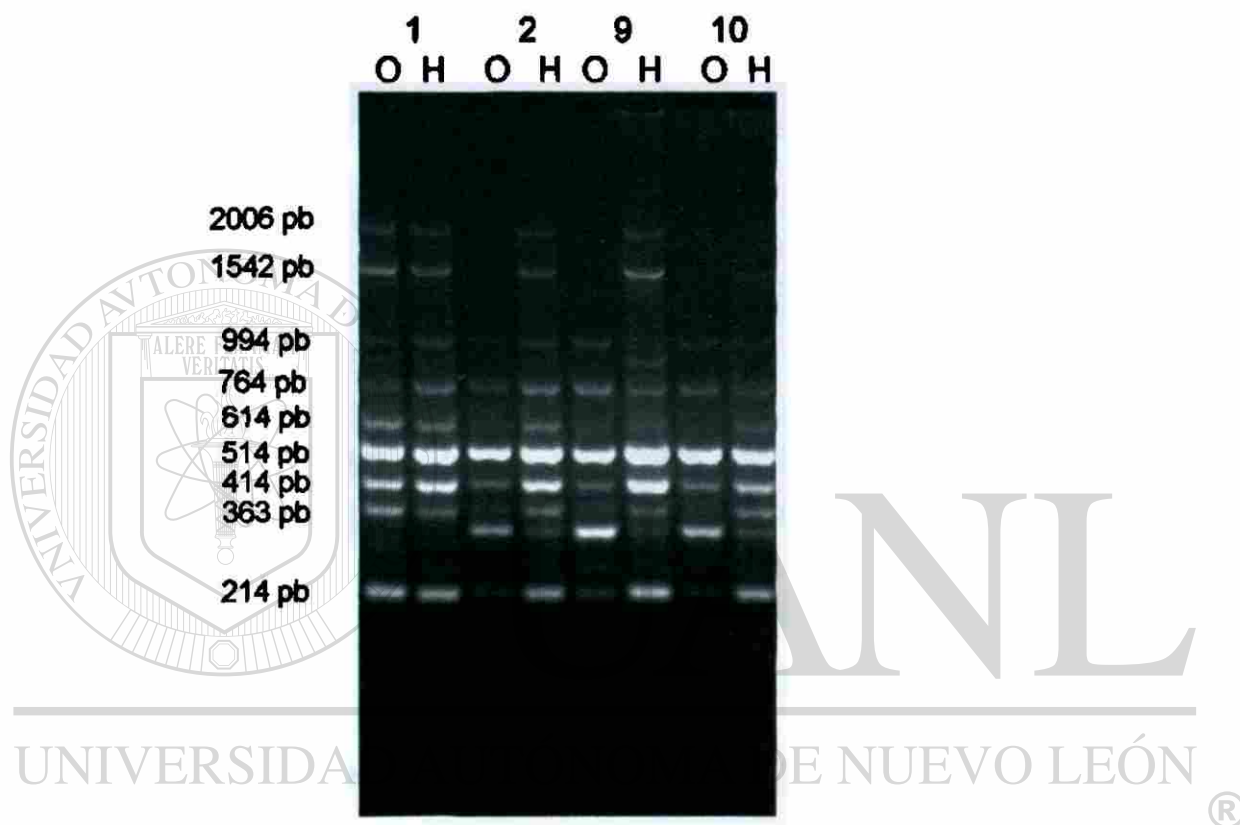


Figura 10.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* de orina y heces (1, 2 9 y 10) con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 a 36°C.

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	1		2	2		9	9		10	10
	O	H		O	H		O	H		O	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	<u>994</u>	<u>994</u>	B3	<u>994</u>	<u>994</u>	B3	911	911	B3	<u>995</u>	<u>995</u>
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	<u>515</u>	<u>515</u>	B6	<u>515</u>	<u>515</u>	B6	<u>515</u>	<u>515</u>	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	<u>318</u>	<u>318</u>	B9	<u>318</u>	<u>318</u>	B9	<u>318</u>	<u>318</u>
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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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	1		2	2		9	9		10	10
	O	H		O	H		O	H		O	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	<u>1148</u>	<u>1148</u>				B4	<u>1148</u>	<u>1148</u>	B4	<u>1148</u>	<u>1148</u>
B5	973	973	B4	973	973	B5	973	973	B5	973	973
			B5	896	896						
B6	760	760	B6	<u>729</u>	<u>729</u>	B6	<u>729</u>	<u>729</u>	B6	<u>729</u>	<u>729</u>
			B7	<u>644</u>	<u>644</u>	B7	<u>644</u>	<u>644</u>	B7	<u>644</u>	<u>644</u>
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	<u>426</u>	<u>426</u>	B10	409	409	B10	<u>426</u>	<u>426</u>	B10	<u>426</u>	<u>426</u>
B10	392	392	B11	<u>377</u>	<u>377</u>	B11	<u>377</u>	<u>377</u>	B11	<u>377</u>	<u>377</u>
B11	333	333	B12	333	333	B12	333	333	B12	333	333
B12	294	294	B13	<u>282</u>	<u>282</u>	B13	<u>282</u>	<u>282</u>	B13	<u>282</u>	<u>282</u>
B13	249	249									

L c J L c J L c J L c J[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

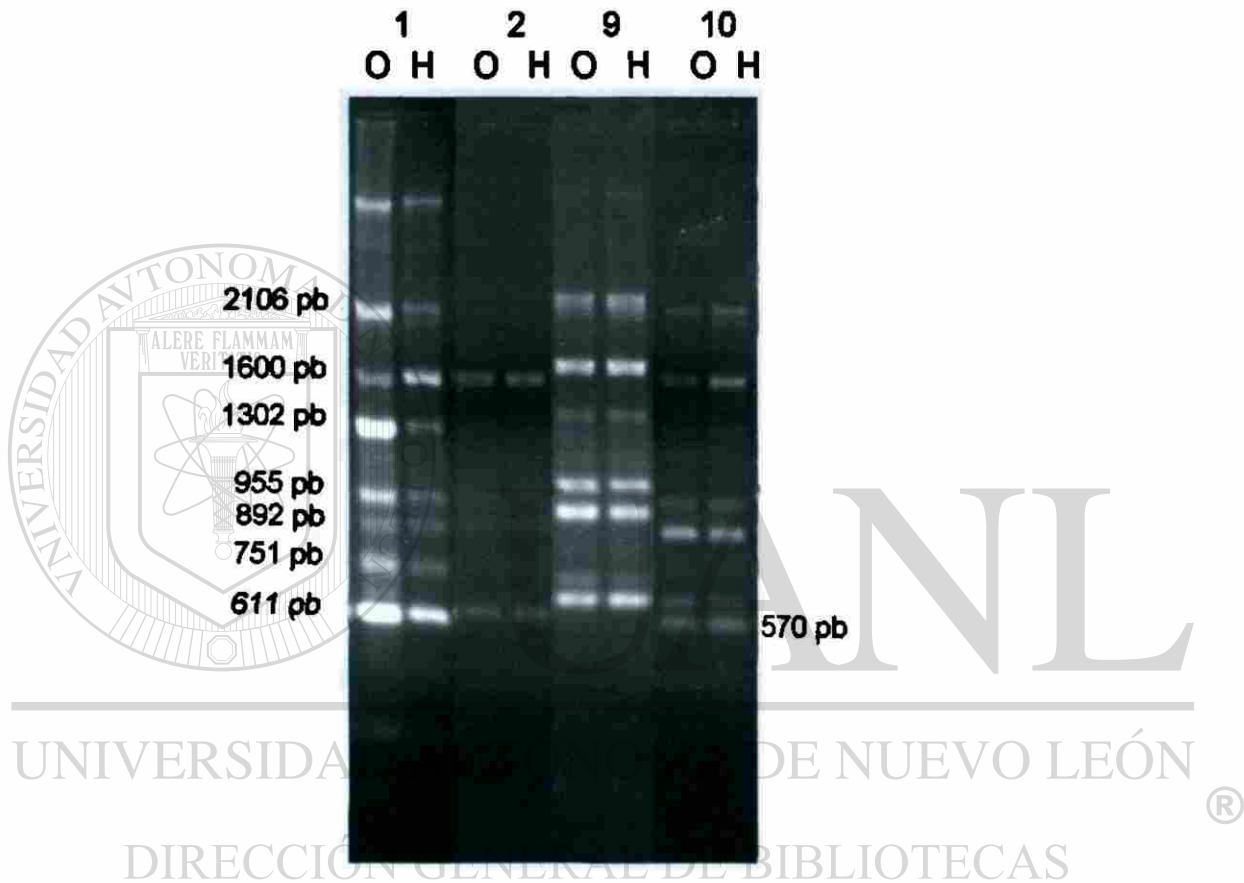


Figura 12.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida tropicalis* (orina y heces) (1,2 9 y 10) con el iniciador RP4-2 a 45°C.

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	1		2	2		9	9		10	10
	O	H		O	H		O	H		O	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	<u>611</u>	<u>611</u>				B6	<u>611</u>	<u>611</u>	B6	<u>611</u>	<u>611</u>
									B7	570	570

L c J

L c J

L c J

L c J

3.5.3 Demostración de dos pares de cepas discordantes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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.

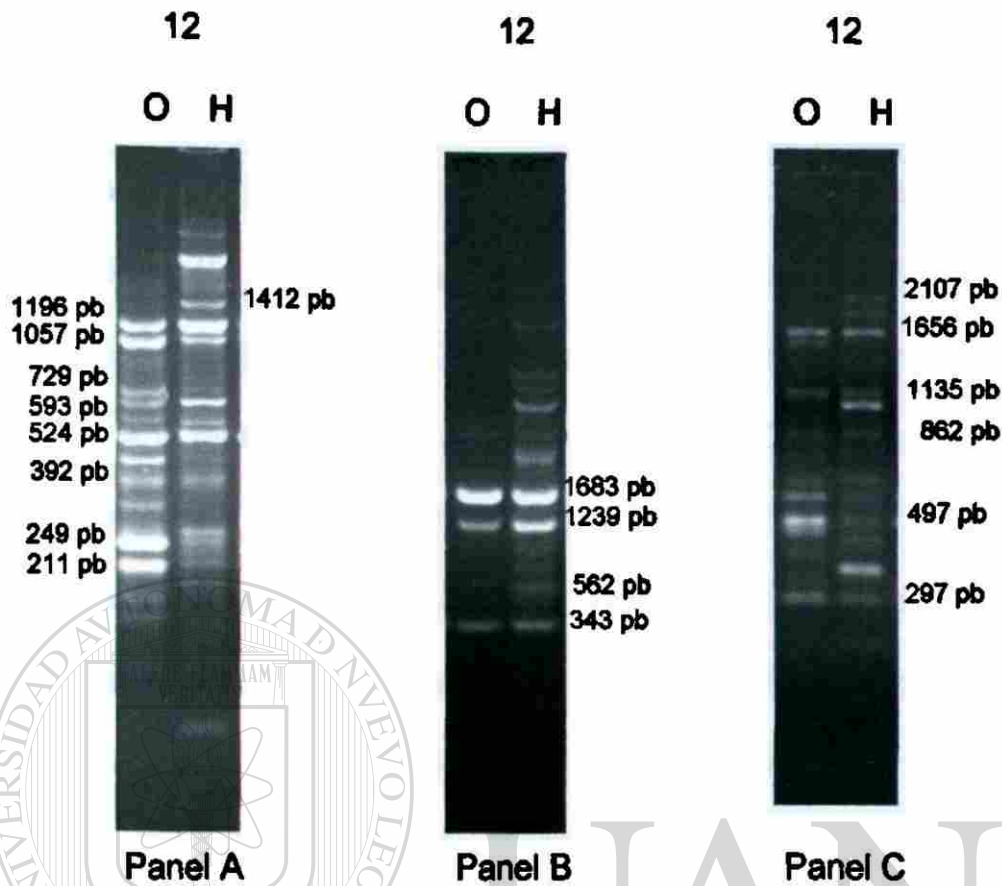
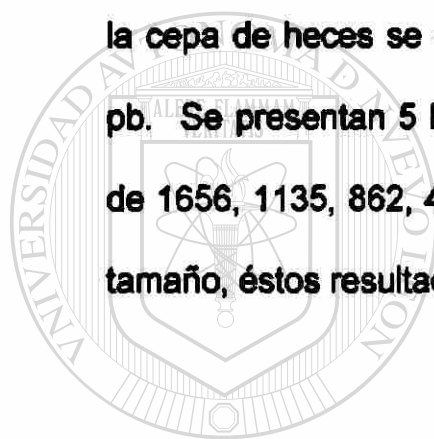


Figura 13.- Comparación genotípica de una cepa discordante de *Candida tropicalis* de orina y heces (12) con el iniciador RP4-2 (Panel A), con la mezcla de iniciadores RP2-RP1-4 (Panel B) a la temperatura de apareamiento de 36°C y con el iniciador RP4-2 con la temperatura de apareamiento de 45°C (Panel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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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										

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.

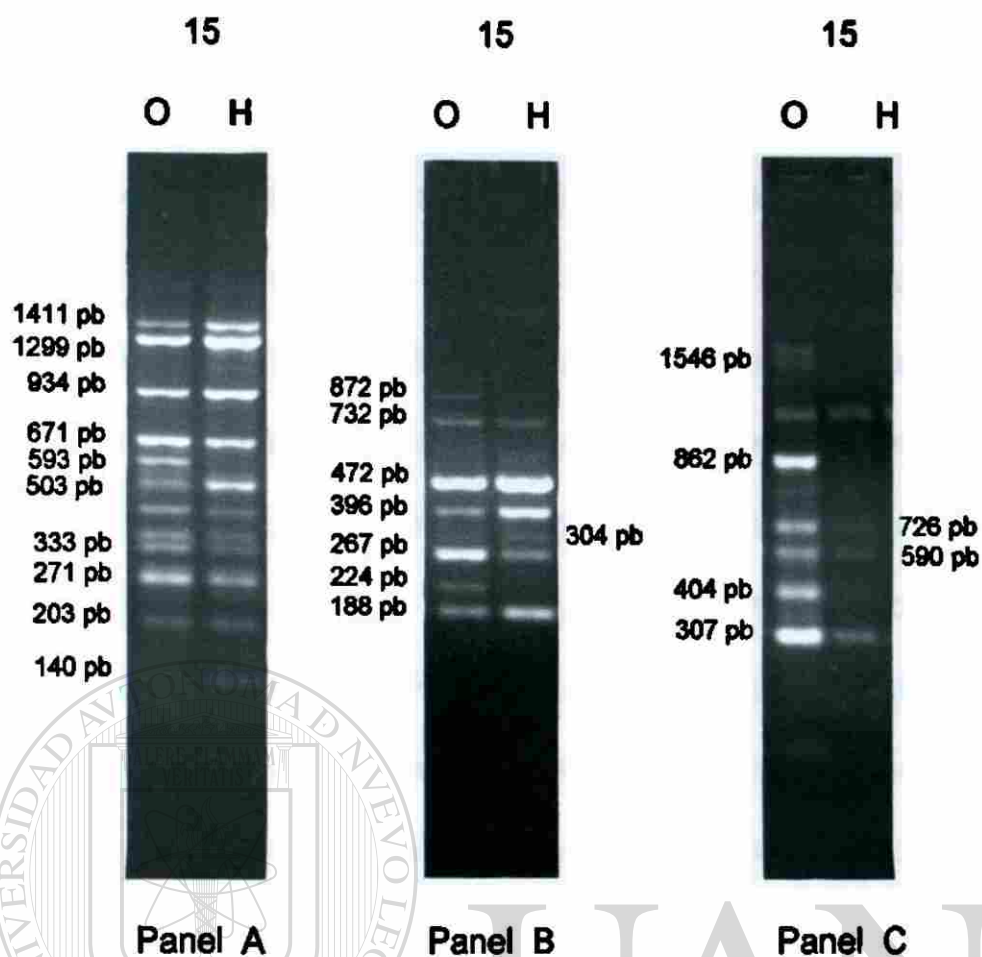


Figura 14.- Comparación genotípica de una cepa discordante de *Candida tropicalis* de orina y heces (15) con el iniciador RP4-2 (Panel A), con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (Panel B) a la temperatura de apareamiento de 36°C y con el iniciador RP4-2 con la temperatura de apareamiento de 45°C (Panel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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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				Panel B				Panel C			
	15 O	15 H			15 O	15 H			15 O	15 H	
B1	1411	1412	B1	B1	872			B1	1656		
B2	1299	1300	B2	B2	732	732	B1	B2	1546		
B3	934	934	B3	B3	472	472	B2	B3	1135	1135	B1
B4	671	671	B4	B4	396	396	B3	B4	862		
B5	593					304	B4	B5	726	726	B2
B6	503	503	B5	B5	267	267	B5	B6	590	590	B3
B7	426	426	B6	B6	224			B7	497	497	B4
B8	361	361	B7	B7	188	188	B6	B8	404		
B9	333	333	B8					B9	307	307	B5
B10	271	271	B9								
B11	203	203	B10								
B12	140	140	B11								

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

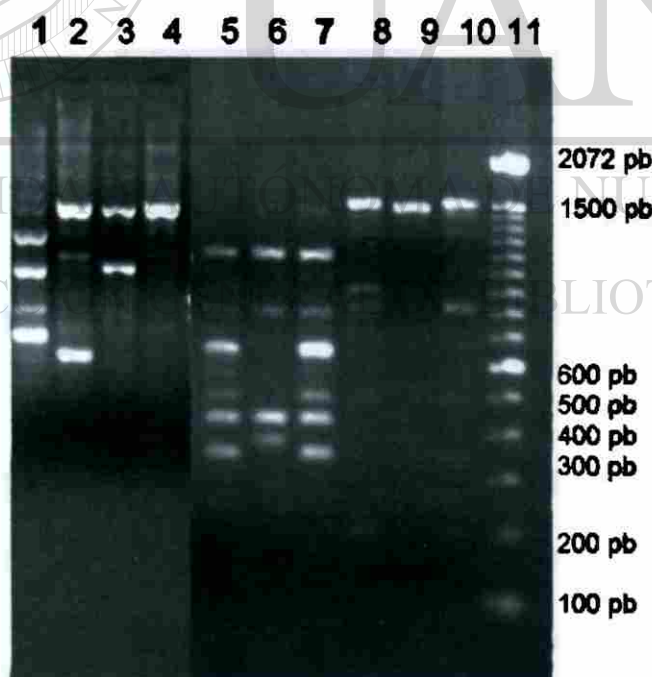


Figura 15.- Selección de iniciadores para *Candida glabrata*. Carril 1 al 4 se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 y en los carriles del 5 al 10 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente, en el carril 11 está el marcador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

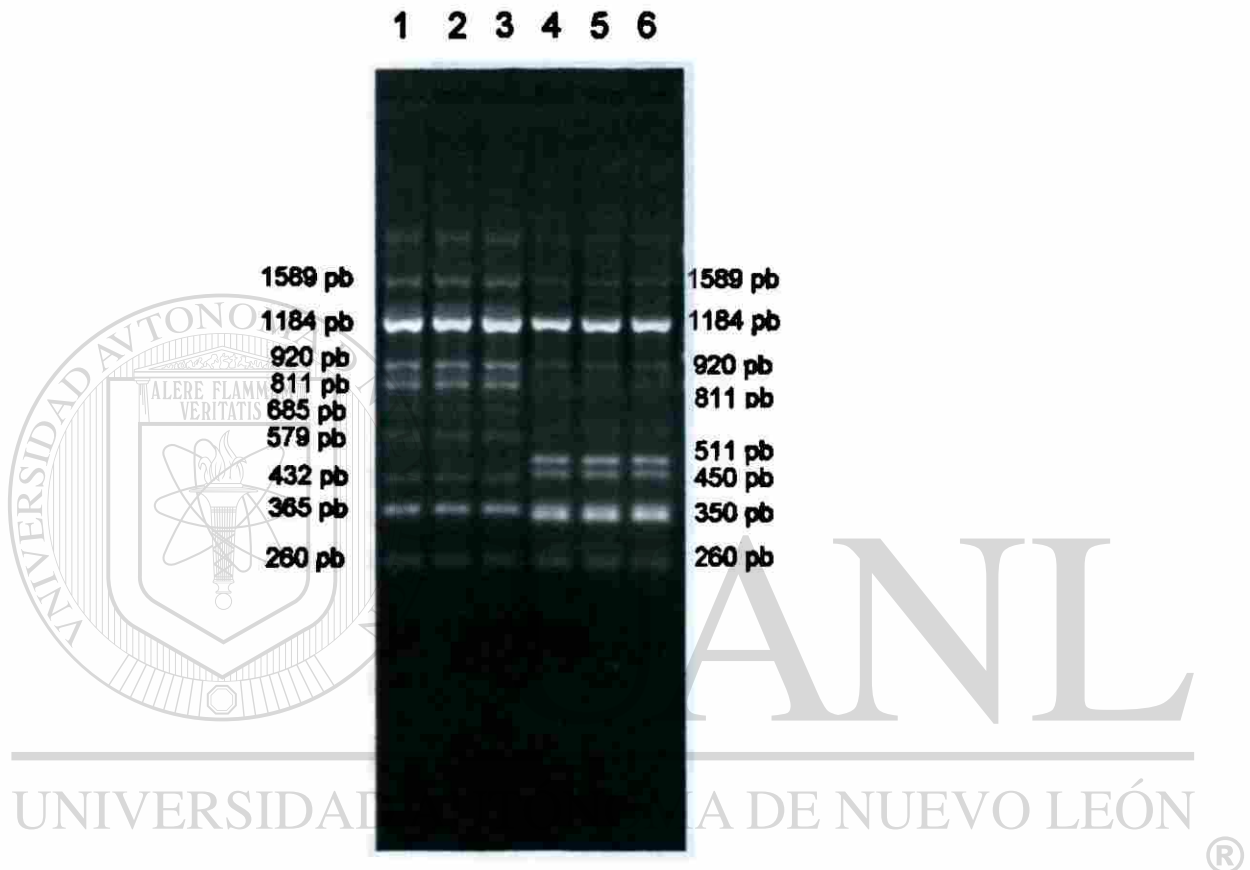


Figura 16.- Cepa control *Candida glabrata* ATCC 90030 con iniciador SOY, carriles 1 al 3 y con la mezcla SOY/RP1-4 en los carriles 4 al 6

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.

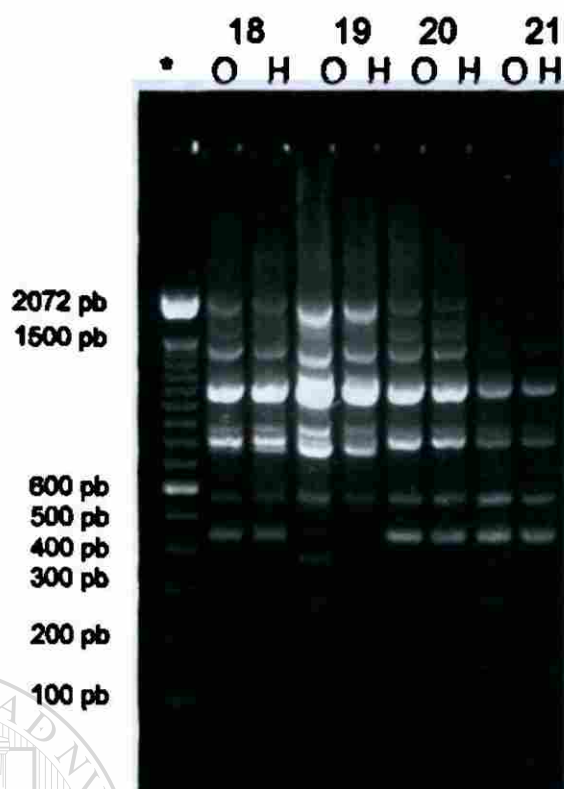


Figura 17.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* de muestras de orina y heces (18, 19, 20 y 21) con el iniciador SOY a 36°C. * Marcador de 100 pb

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		

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.

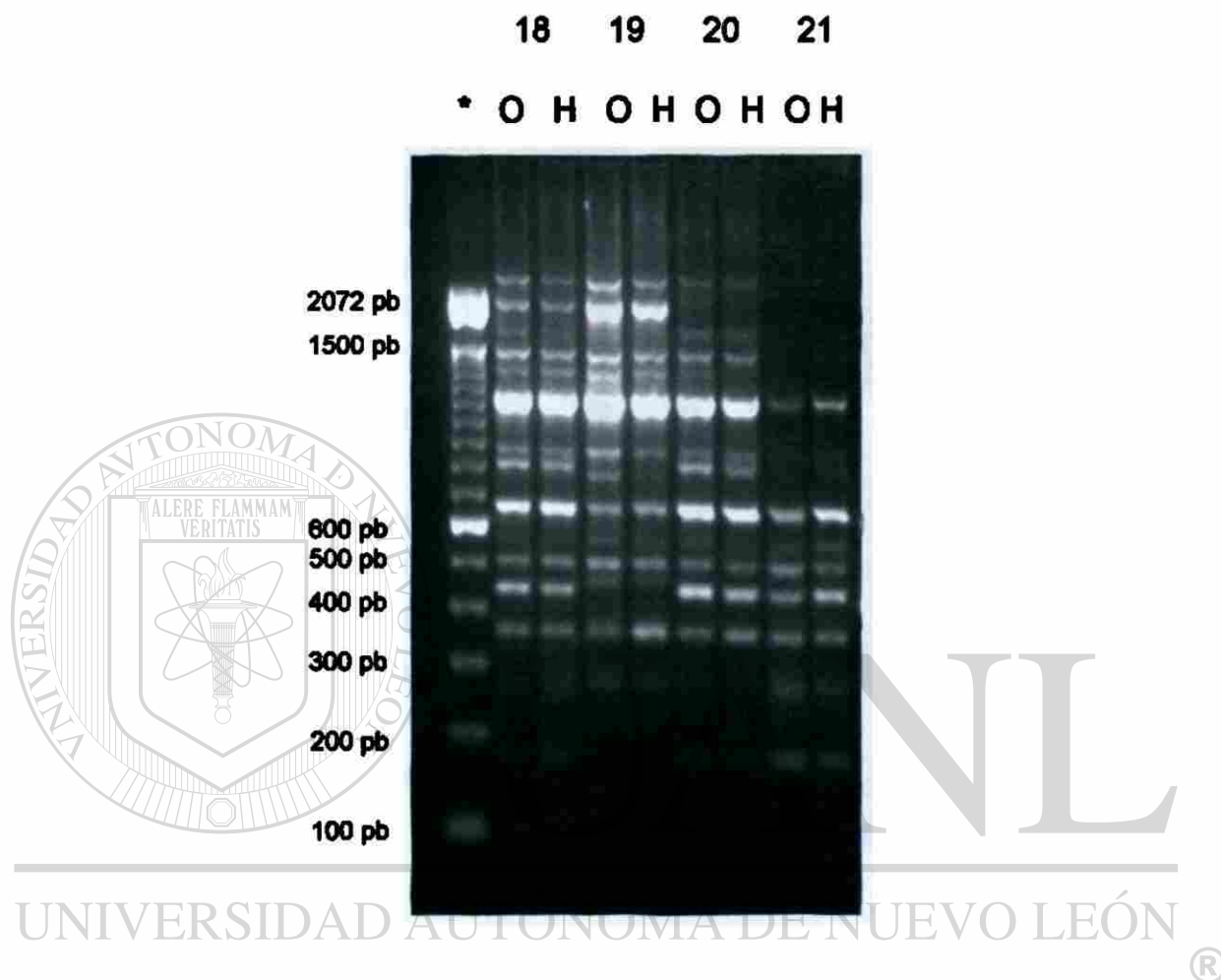


Figura 18.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida glabrata* de muestras de orina y heces (18, 19, 20 y 21) con mezcla de iniciadores SOY/RP1-4 a 36°C. * Marcador de 100 pb

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]
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
 ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

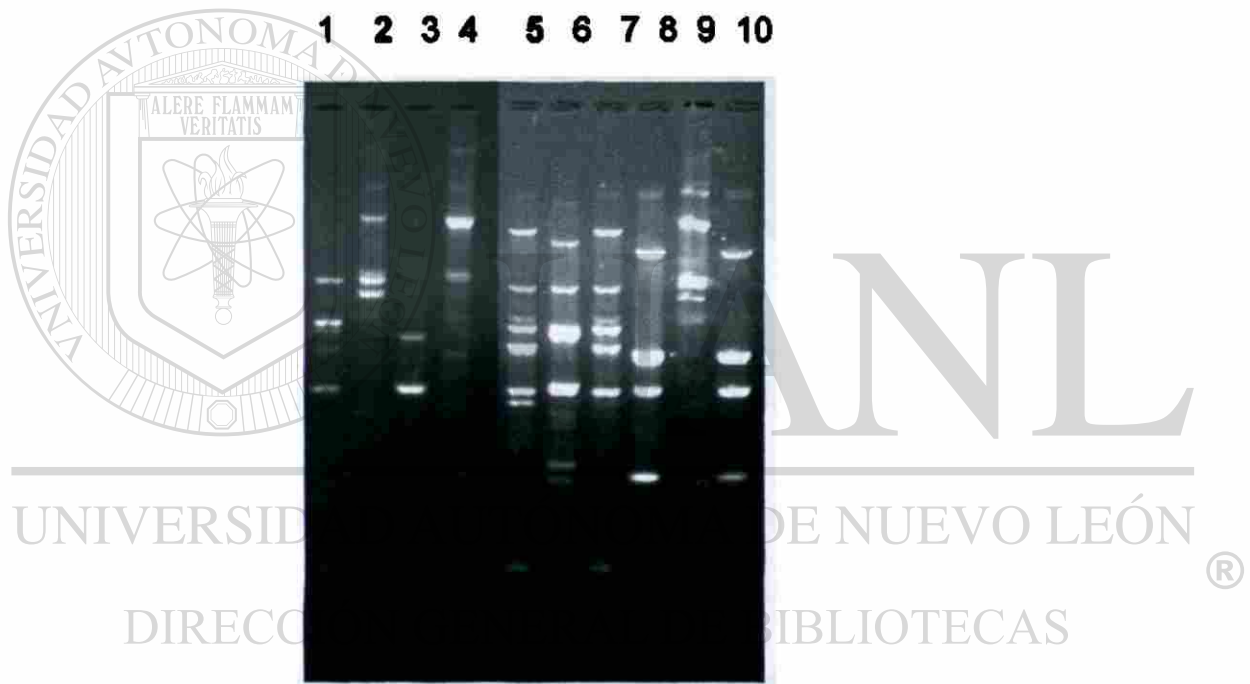


Figura 19.- Selección de iniciadores para *Candida albicans*. Carril 1al 4 se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 y en los carriles del 5 al 10 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente.

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.

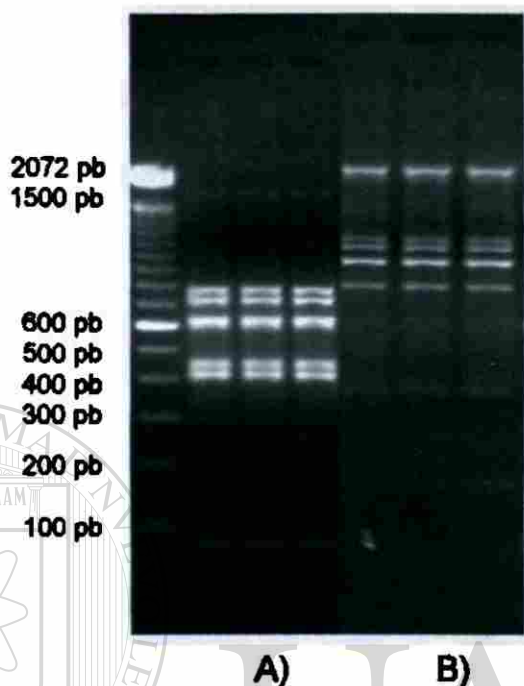


Figura 20.- Cepa control de *Candida albicans* ATCC 90028. A) Mezcla de iniciadores SOY/RP2, B) iniciador RP2

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.

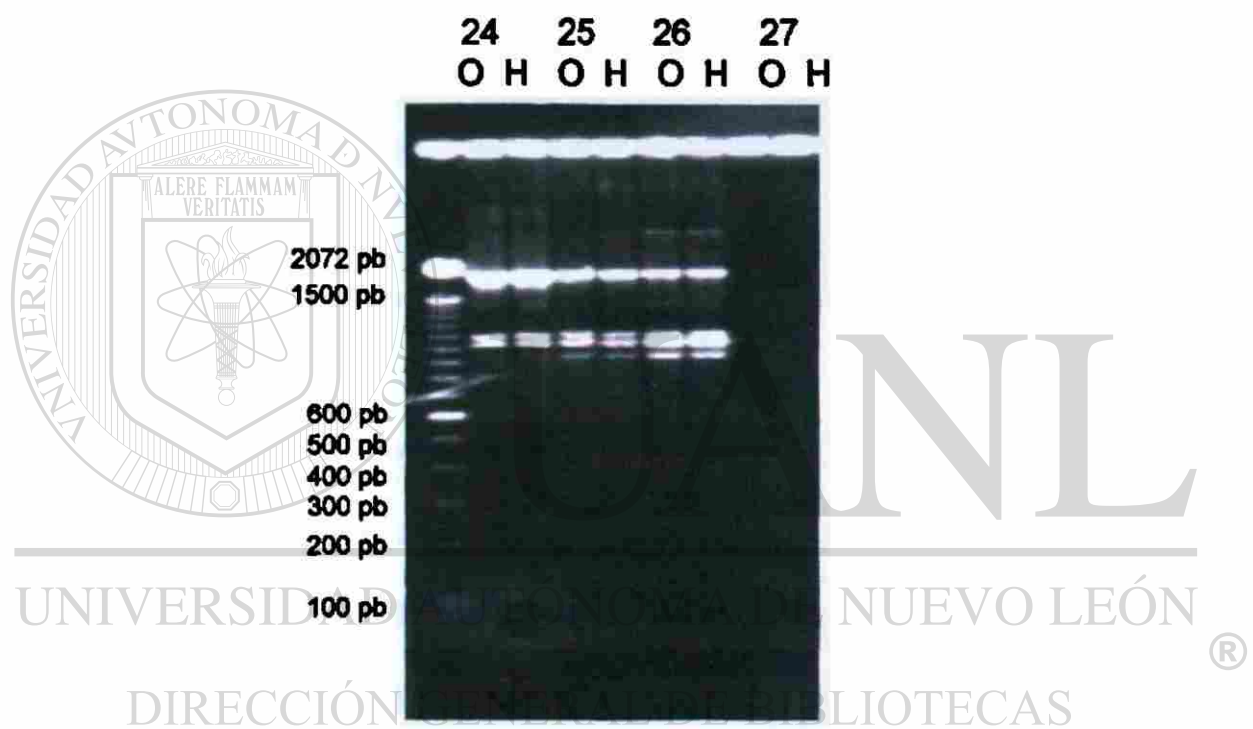


Figura 21.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida albicans* de muestras de orina y de heces (24, 25, 26 y 27) con el iniciador RP2 y a 36°C.

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

L c] L c] L c] L 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.

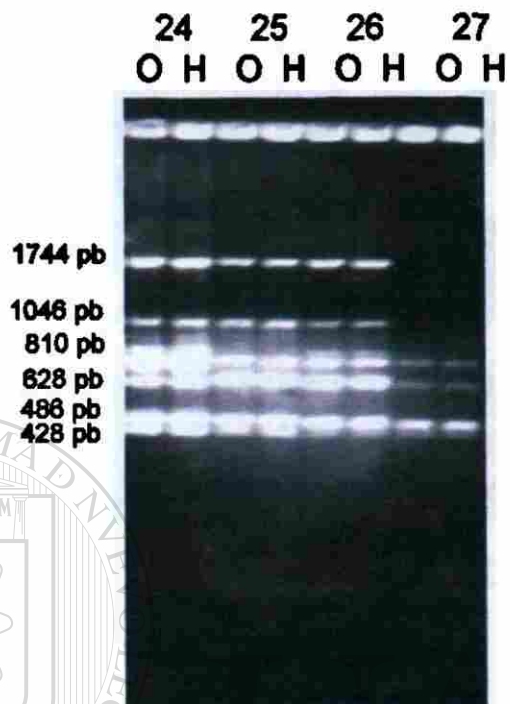


Figura 22.- Comparación genotípica de 4 cepas clínicas de *Candida albicans* de muestras de orina y de heces (24, 25, 26 y 27) con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 a 36°C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

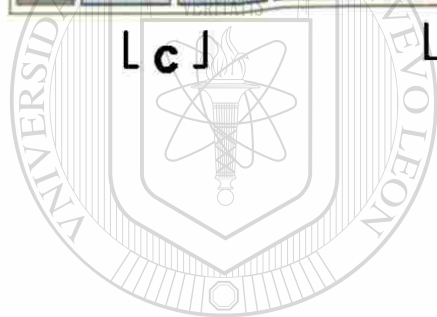
	24 O	24 H		25 O	25 H		26 O	26 H		27 O	27 H		ATCC 90028
B1	1744	1744	B1	1744	1744	B1	1744	1744					1804
B2	1046	1046	B2	1046	1046	B2	1046	1046					1066
B3	921	921	B3	921	921								855
B4	810	810	B4	810	810	B3	810	810	B1	810	810		
B5	760	760				B4	760	760					750
B6	713	713											
B7	628	628	B5	669	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

LcJ

LcJ

LcJ

LcJ



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

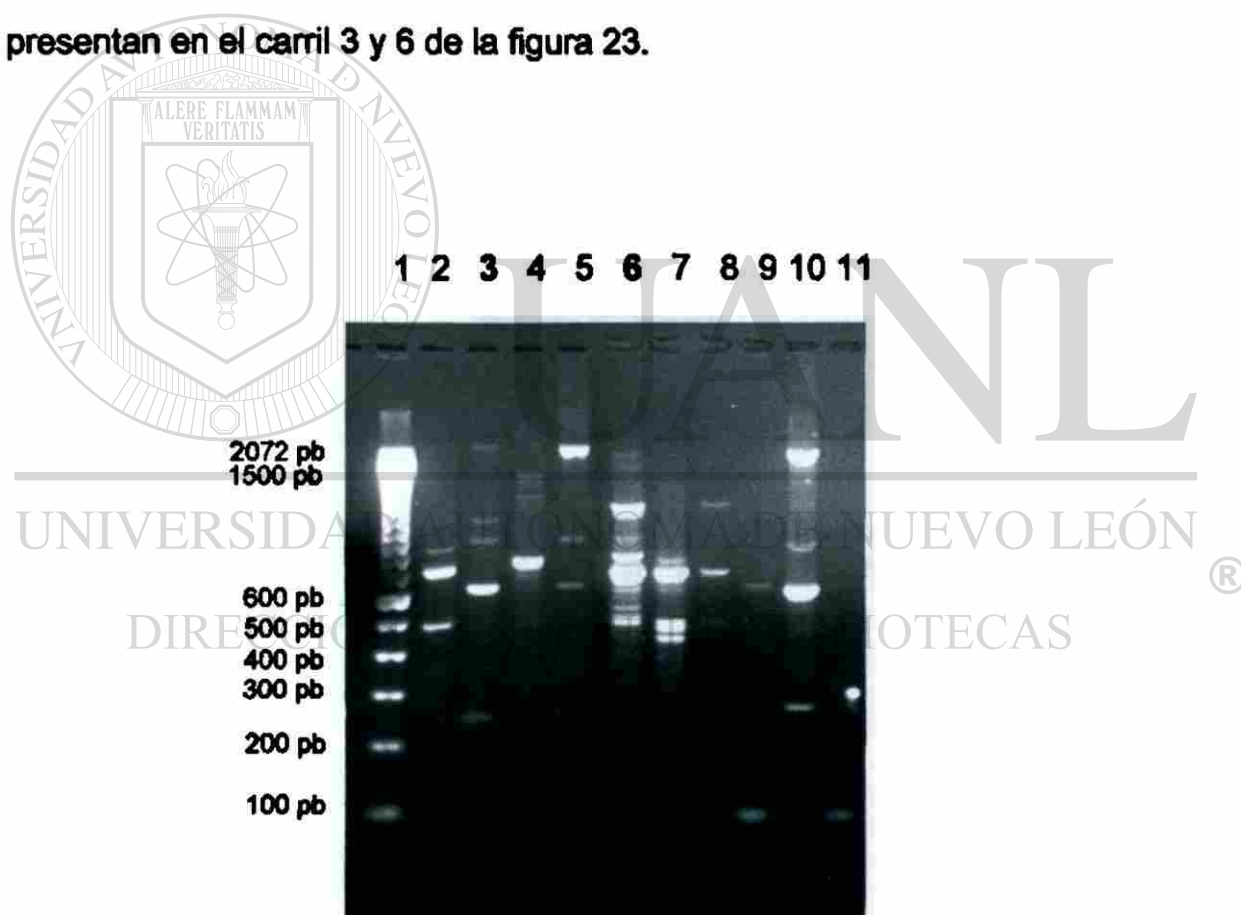


Figura 23.- Selección de iniciadores para *Candida parapsilosis*. Se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 en los carriles del 2 al 5 y en los carriles del 6 al 11 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente, en el carril 1 está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

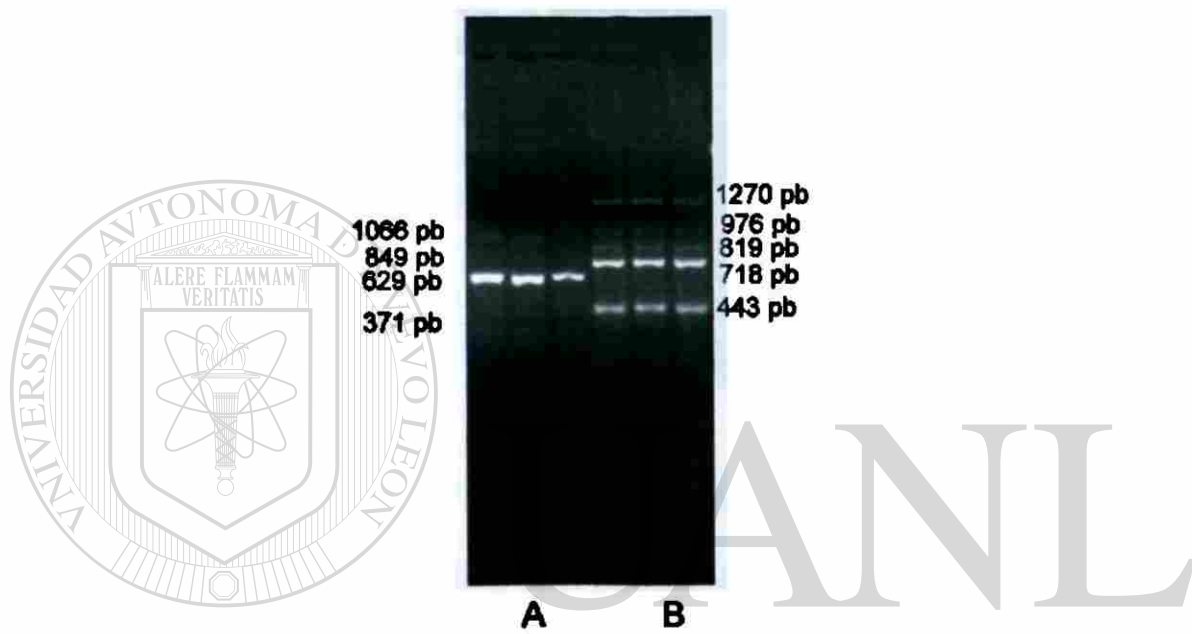


Figura 24.- Análisis molecular de la cepa control de *Candida parapsilosis* ATCC 22019. A) iniciador RP-2 B) mezcla de iniciadores SOY/RP2

3.8.3 Comparación genotípica de la cepa de *Candida parapsilosis* *Candida parapsilosis* en muestras de orina y de las heces, con uno y dos iniciadores y a 35°C. Cepa control (ATCC 22019)

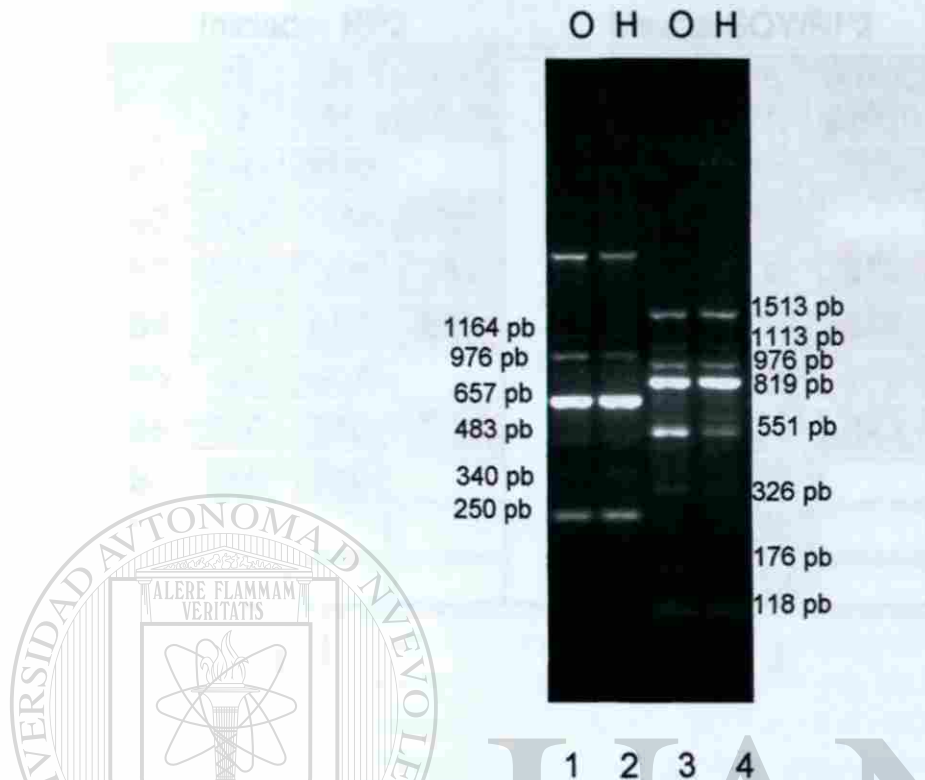


Figura 25.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Candida parapsilosis* orina y heces (28) con el iniciador SOY (carriles 1 y 2) y con la mezcla de iniciadores SOY/RP2 (carriles 3 y 4).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

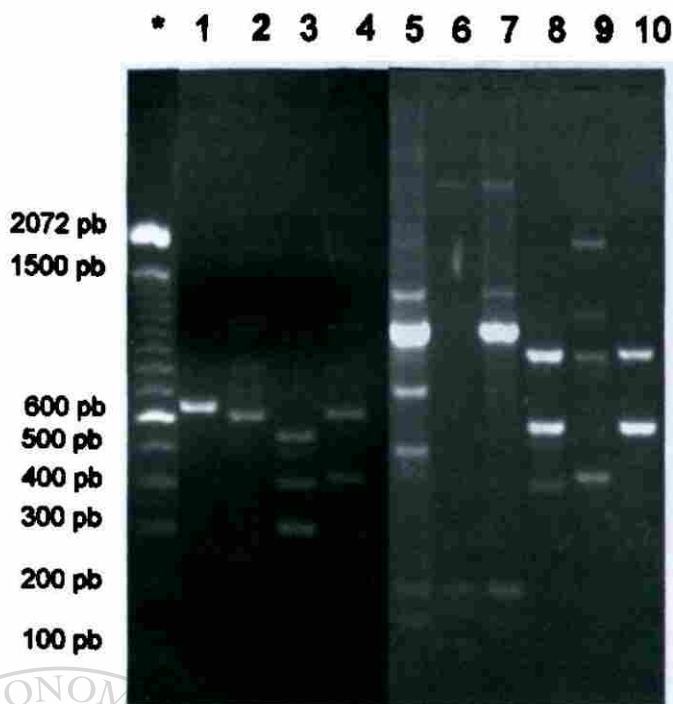


Figura 26.- Selección de iniciadores para *Trichosporon*. Carril 1al 4 se probaron los iniciadores SOY, RP2, RP4-2 y RP1-4 y en los carriles del 5 al 10 las mezclas de iniciadores SOY/RP2, SOY/RP4-2, SOY/RP1-4, RP2/RP4-2, RP2/RP1-4 y RP4-2/RP1-4 respectivamente. * Marcador de 100 pb

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.

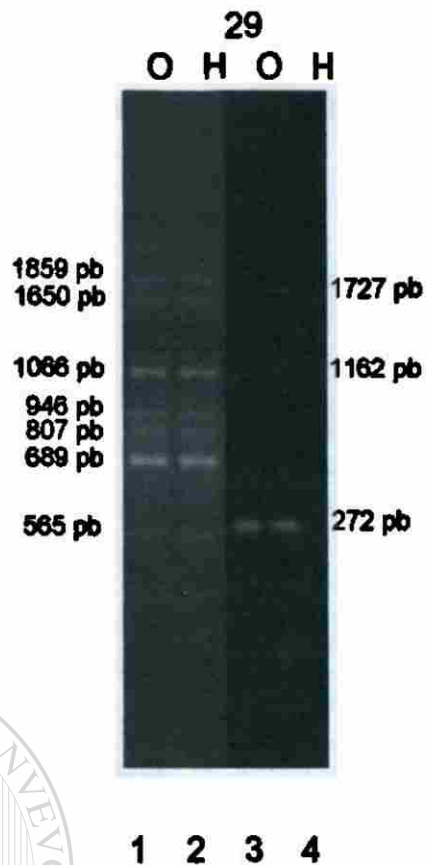


Figura 27.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Trichosporon beigelli* orina y heces (29) con el iniciador RP2 (carriles 1 y 2) y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (carriles 3 y 4).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

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, 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.

30

O H O H

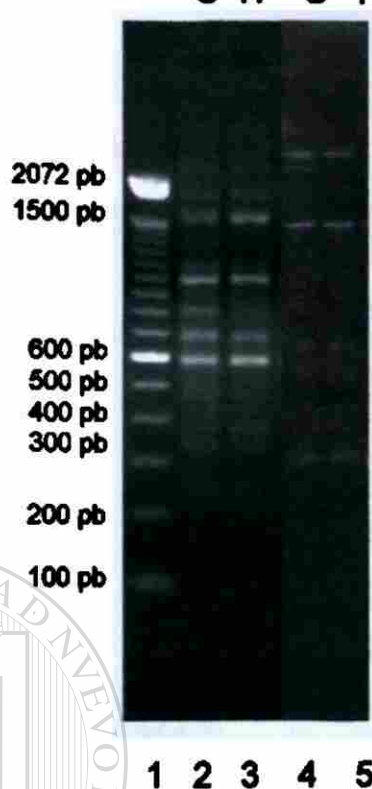


Figura 28.- Comparación genotípica de la cepa clínica de *Trichosporon cutaneum* orina y heces (30) con el iniciador RP2 (carriles 2 y 3) y con la mezcla de iniciadores RP2/RP1-4 (carriles 4 y 5). Carril 1 Marcador 100 pb

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

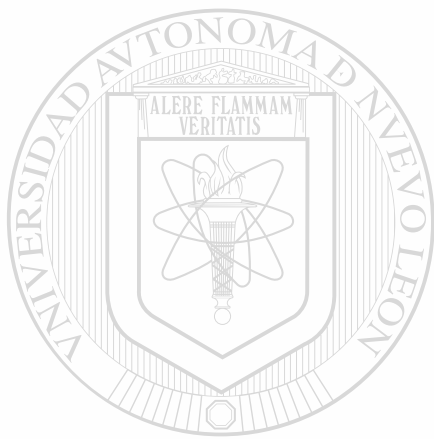
	[A]			[B]	
	30	30		30	30
	O	H		O	H
B1	2267	2267		1727	1727
B2	1859	1859		1616	1616
B3	1586	1586		1162	1162
B4	1066	1066		562	562
B5	1025	1025		272	272
B6	807	807			
B7	662	662			
B8	565	565			
B9	351	351			
B10	311	311			
B11	209	209			

[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%.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 Pediátricos⁶. 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 mayor³.

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 año³⁷.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 masculino³⁸, 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 mismas⁴², 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 col⁴². 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 lusitanae*.

Sin embargo la distribución de especies ha mostrado ciertas diferencias dependiendo del país. En un estudio multicéntrico realizado por Pfaller y col⁴³, 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 col⁴⁴. 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 col³⁷ 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 col³⁷. 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 multiplicación⁴⁵.

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 proliferar⁴⁵. 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 cantidad⁴⁵. 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 mayor¹².

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 urinaria⁴⁵, sin embargo en infecciones por levaduras esta cuenta aún no está bien establecida, algunos autores consideran que una cuenta superior a 10,000 UFC/mL³⁷ o 100,000 UFC/mL³⁸ 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 1×10^8 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 sonda³⁸, la cantidad de antibióticos y si son de amplio espectro¹² 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 RapID²¹⁻²⁵. 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 sistemas²⁵. 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 clínicos²¹⁻²⁵.

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 otras²⁸⁻²⁸. 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 económico²⁷.

Para la extracción del DNA se propuso inicialmente realizar la técnica del TSNT³⁰, 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 col³¹, 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 TSNT³⁰.

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.

Lehmann³⁷ y col. utilizan 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa para su técnica, sin embargo, otros autores como Bostock³⁵ y Morales⁴⁷ utilizan 2.5 U, mientras que King⁴⁶ 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 microbiológicas⁷. 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 reproducibilidad²⁷, 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.

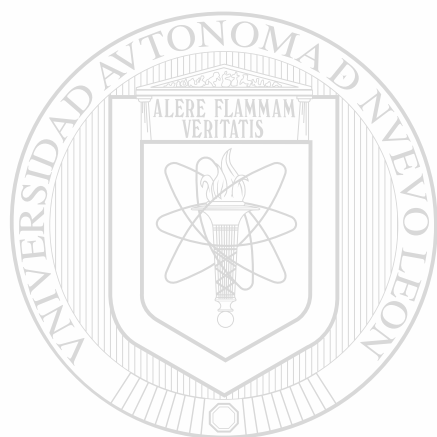
En el caso de infecciones urinarias por *Candida* siempre se ha considerado que su fuente de infección directa es el tracto gastrointestinal casi en el 100% de los casos, sin embargo se debe considerar el tipo de paciente que se está tratando, cuando los pacientes están con sonda y tienen alteración 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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%.

CAPÍTULO 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 Sequence of Colonization and Candidemia in Nonneutropenic 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

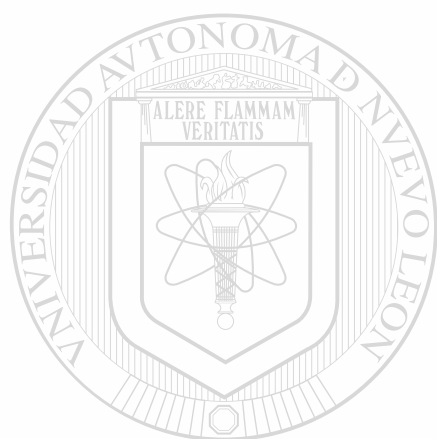
- 9.-Pfaller M. Nosocomial Candidiasis: Emerging Species, Reservoirs, and Modes of Transmission. (1996) Clin. Infec. Dis.. 22 (Suppl2):S89-94
- 10.-Seelig M. The Role of Antibiotics in the Pathogenesis of *Candida* Infections (1966) Am. J. Med. 40:887-917
- 11.-Ripon John W TRATADO DE MICOLOGÍA MÉDICA 3a Edición, Editorial Iiteramericana 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 resistance 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* outbreak 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
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- 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 lusitanae* *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

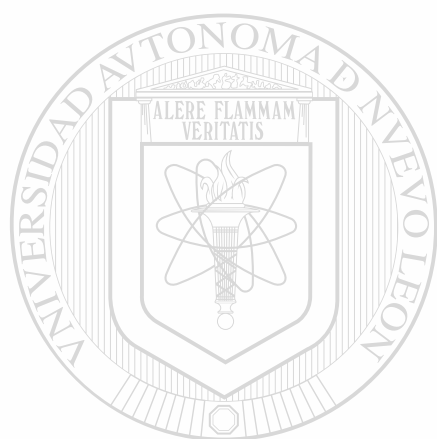


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



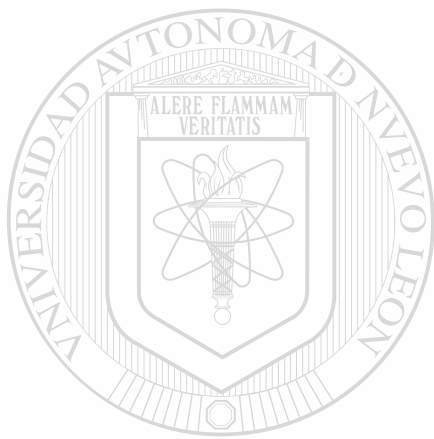
APÉNDICES

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APÉNDICE A

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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. Inmunesupresora 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: _____ []
_____ [] _____ [] _____ []

Inmunesupresores: 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. _____ [/ /] _____ []

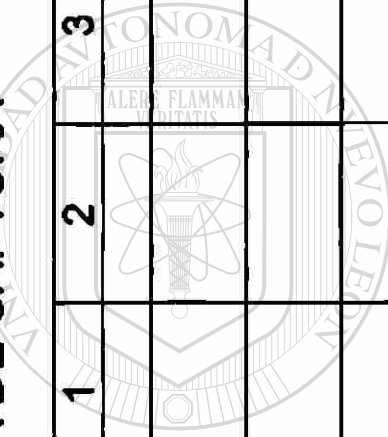
1. IVU's, 2. Diarrea, 3. Dermatitis, 4. Estomatitis, 5. Neumonía, 6. Inf. SNC, 7. Bacteremia/Sepsis, 8. Muerte.

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

Observaciones: _____
_____ Situación final: _____ []

HOJA DE CAPTURA

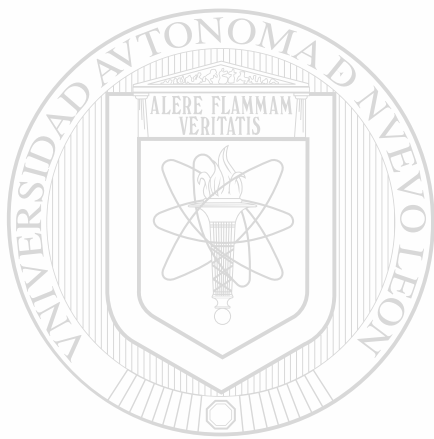
	1	2	3	4	5	6
Día/Fecha	BASAL					
Leucocitos						
Levaduras						
Cuenta						
Especie						
Fecha						
Consistencia de heces						
Cuenta						
Especie						
Temperatura						
Disuria						
Diarrea						
INTERV. V. URINARIAS						
DIAGNOSTICOS						
ANTIBIÓTICOS						
INMUNOSUPRESORES						
CIRUGÍAS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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



APÉNDICE B

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla I.- Pruebas Biológicas del género *Candida*

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

+ Positivo - Negativo ± Casi siempre positivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla II.- Características fisiológicas del género *Candida*

AUXONOGRAMA

	INDISPENSABLE						ELECTIVO			
	Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf	Ino	Cel	Xil	Tre
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Candida stellatoidea</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Candida krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Candida zeylanoides</i>	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+
<i>Candida glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

+ Positivo - Negativo ± Casi siempre positivo
 V Variable

®

Tabla III.- Características fisiológicas del género *Candida*

ZIMOGRAMA

	Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf
<i>Candida albicans</i>	+	+	±	+	-	-
<i>Candida stellatoidea</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Candida zeylanoides</i>	V	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	-	-	-	-	-

+ Positivo
V Variable

- Negativo

± Casi siempre positivo

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

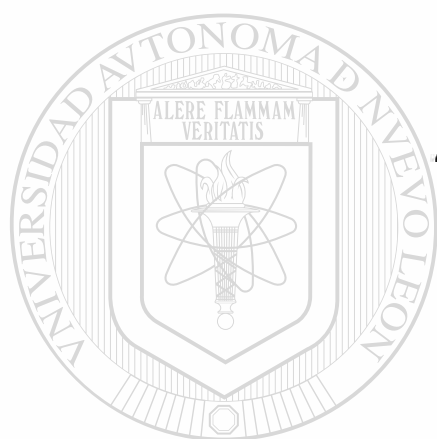
®

Tabla IV SISTEMA API 20-C

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

A: Acidificación positiva (A): Acidificación posible Ag: Acidificación y producción de gas + : Positivo V: Variable (+): Generalmente
 O: Control negativo - : Control negativo A(g): Generalmente producción de gas - : Negativo - : Negativo - : Negativo - : 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 filamentosos su crecimiento inicialmente puede ser semejante a una levadura



APÉNDICE C

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 esterizaron 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 esterizaron 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 lbs. 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 μ L 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 Lítica

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 esterilizó 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).

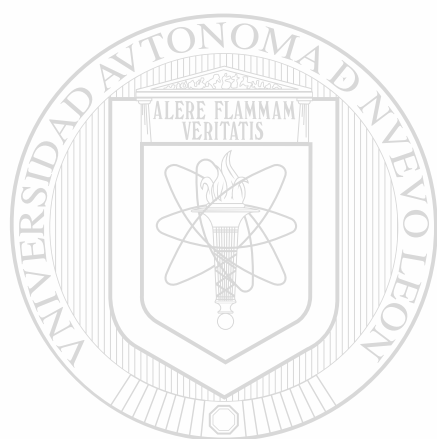


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APÉNDICE D

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

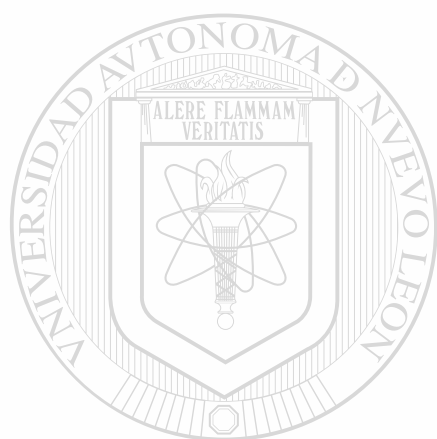
EXTRACCIÓN DE DNA POR LA TÉCNICA DE ANN BOSTOCK.

- 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) Centrifugar 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

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 porciento 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 por ciento 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 por ciento 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

Tabla VII Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 7 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

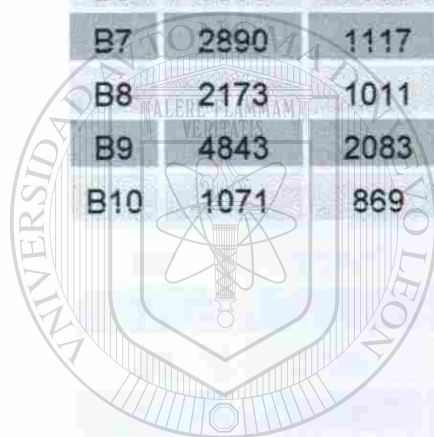
CARRIL 7						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV(%)
B1	41190	30276	4672	25379.0	18745.0	74
B2	50661	40137	8084	32960.8	22176.8	67
B3	16284	13539	2011	10611.2	7573.7	71
B4	9193	8156	24562	13970.6	9187.4	66
B5	1324	548	14830	5567.3	8030.8	144
B6	4212	4437	13160	7269.7	5102.5	70
B7	1589	1975	13565	5709.5	6805.5	119
B8	1860	1533	36291	13228.1	19973.9	151
B9	3163	2412	24797	10124.0	12712.5	126
B10	645	712	7008	2788.1	3654.6	131

Tabla VIII Cálculo del coeficiente de variación en porciento del carril 8 de los 3 geles realizados en fechas diferentes.

CARRIL 8						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	31024	22038	2105	18388.8	14800.9	80
B2	44338	37860	7576	29924.8	19623.5	66
B3	16057	15454	11101	14203.9	2704.1	19
B4	8021	7645	760	5475.3	4088.0	75
B5	1689	699	11568	4651.9	6009.9	129
B6	6909	6095	10458	7820.5	2319.9	30
B7	470	1117	10202	3929.4	5441.7	138
B8	1996	1011	28539	10515.4	15616.7	149
B9	2254	2083	17726	7354.2	8983.0	122
B10	936	869	15257	5687.3	8287.8	146

Tabla IX Cálculo del coeficiente de variación en porcentaje del carril 9 de los 3 gels realizados en fechas diferentes.

CARRIL 9						
	GEL 1	GEL 2	GEL 3			
	IN 1	IN 2	IN 3	PROM	DE	CV (%)
B1	51160	22038	2105	25100.9	24670.7	98
B2	62062	37860	7576	35832.9	27299.3	76
B3	29628	15454	11101	18727.6	9687.7	52
B4	16140	7645	760	8181.9	7704.3	94
B5	1685	699	11568	4650.6	6010.9	129
B6	5659	6095	10458	7404.0	2653.6	36
B7	2890	1117	10202	4736.3	4815.7	102
B8	2173	1011	28539	10574.4	15568.7	147
B9	4843	2083	17726	8217.5	8349.8	102
B10	1071	869	15257	5732.3	8249.4	144



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

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

Para este calculo se analizaron los 3 carriles de una misma muestra en un solo gel.

Tabla I.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa GPG U3 en los 3 carriles en el gel 1.

CEPA	GPG U3					
	C1	C2	C3	PROM	DE	CV (%)
B1	1	1	1	1	0	0
B2	2.983	3.19	2.853	3.01	0.17	6
B3	1.521	1.515	1.033	1.36	0.28	21
B4	0.68	0.759	0.626	0.69	0.07	10
B5	0.073	0.095	0.098	0.09	0.01	15
B6	0.492	0.501	0.744	0.58	0.14	25
B7	0.167	0.178	0.087	0.14	0.05	34
B8	0.376	0.314	0.177	0.29	0.10	35
B9	0.309	0.295	0.268	0.29	0.02	7
B10	0.225	0.246	0.284	0.25	0.03	12

Tabla II.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa ROS U4 en los 3 carriles en gel 1.

CEPA	ROS U4					
	C1	C2	C3	PROM	DE	CV (%)
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	1.926	1.653	1.815	1.80	0.14	8
B3	1.407	1.247	0.829	1.16	0.30	26
B4	0.471	0.427	0.311	0.40	0.08	21
B5	0.074	0.029	0.009	0.04	0.03	89
B6	0.18	0.123	0.068	0.12	0.06	45
B7	0.149	0.111	0.044	0.10	0.05	52
B8	0.117	0.062	0.122	0.10	0.03	33
B9	0.387	0.288	0.162	0.28	0.11	40
B10	0.113	0.089	0.061	0.09	0.03	30

Tabla III.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa MIV C1 en los 3 carriles en gel 1.

CEPA	MIV C1			PROM	DE	
	C1	C2	C3			
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	1.23	1.429	1.213	1.29	0.12	9
B3	0.395	0.518	0.579	0.50	0.09	19
B4	0.223	0.259	0.315	0.27	0.05	17
B5	0.032	0.054	0.033	0.04	0.01	31
B6	0.102	0.223	0.111	0.15	0.07	46
B7	0.039	0.015	0.056	0.04	0.02	56
B8	0.045	0.064	0.042	0.05	0.01	24
B9	0.077	0.073	0.095	0.08	0.01	14
B10	0.016	0.03	0.021	0.02	0.01	32

Tabla IV.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa GPG U3 en los 3 carriles en gel 2.

CEPA	GPG U3			PROM	DE	CV(%)
	C1	C2	C3			
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	2.773	3.247	3.312	3.11	0.29	9
B3	1.399	1.485	1.326	1.40	0.08	6
B4	0.569	0.629	0.771	0.66	0.10	16
B5	0.099	0.136	0.129	0.12	0.02	16
B6	0.473	0.545	1.029	0.68	0.30	44
B7	0.191	0.206	0.184	0.19	0.01	6
B8	0.286	0.39	0.344	0.34	0.05	15
B9	0.294	0.476	0.474	0.41	0.10	25
B10	0.243	0.304	0.2	0.25	0.05	21

Tabla V.- Cálculo del coeficiente de variación en por ciento de la cepa ROS U4 en los 3 carriles en gel 2.

CEPA	ROS U4			PROM	DE	CV (%)
	C1	C2	C3			
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	2	1.876	2.763	2.21	0.48	22
B3	1.443	1.201	1.607	1.42	0.20	14
B4	0.652	0.546	0.662	0.62	0.06	10
B5	0.106	0.075	0.102	0.09	0.02	18
B6	0.131	0.101	0.218	0.15	0.06	41
B7	0.276	0.195	0.237	0.24	0.04	17
B8	0.213	0.157	0.201	0.19	0.03	15
B9	0.231	0.248	0.394	0.29	0.09	31
B10	0.444	0.431	0.122	0.33	0.18	55

Tabla VI.- Cálculo del coeficiente de variación en por ciento de la cepa MIV C1 en los 3 carriles en gel 2.

CEPA	MIV C1			PROM	DE	CV (%)
	C1	C2	C3			
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	1.326	1.718	1.556	1.53	0.20	13
B3	0.447	0.701	0.668	0.61	0.14	23
B4	0.269	0.347	0.346	0.32	0.04	14
B5	0.018	0.032	0.034	0.03	0.01	31
B6	0.147	0.277	0.106	0.18	0.09	51
B7	0.065	0.051	0.08	0.07	0.01	22
B8	0.051	0.046	0.05	0.05	0.00	5
B9	0.08	0.095	0.175	0.12	0.05	44
B10	0.024	0.039	0.039	0.03	0.01	25

Tabla VII.- Cálculo del coeficiente de variación en porcentaje de la cepa GPG U3 en los 3 carriles en gel 3.

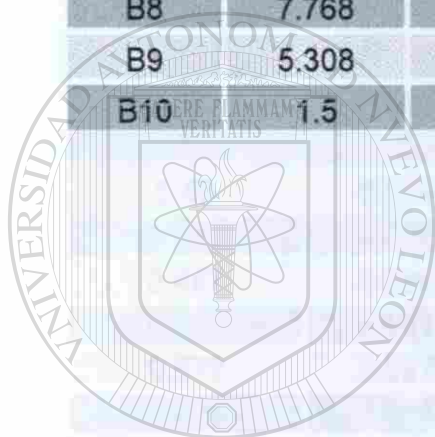
CEPA	GPG U3					
	C1	C2	C3	PROM	DE	CV (%)
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	2.959	2.767	2.541	2.76	0.21	8
B3	1.29	1.29	1.131	1.24	0.09	7
B4	4.595	5.742	3.042	4.46	1.36	30
B5	5.847	6.079	0.082	4.00	3.40	85
B6	3.482	4.005	4.455	3.98	0.49	12
B7	4.089	5.408	4.552	4.68	0.67	14
B8	2.692	5.394	5.879	4.66	1.72	37
B9	2.555	4.038	4.542	3.71	1.03	28
B10	1.157	2.449	0.5	1.37	0.99	72

Tabla VIII.- Cálculo del coeficiente de variación en porcentaje de la cepa ROS U4 en los 3 carriles en gel 2.

CEPA	ROS U4					
	C1	C2	C3	PROM	DE	CV (%)
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	3.527	1.659	1.766	2.32	1.05	45
B3	2.765	1.883	1.855	2.17	0.52	24
B4	3.496	1.352	1.021	1.96	1.34	69
B5	0.092	0.048	0.05	0.06	0.02	39
B6	3.772	1.201	1.738	2.24	1.36	61
B7	4.733	2.518	0.173	2.47	2.28	92
B8	4.849	2.667	1.295	2.94	1.79	61
B9	4.385	1.621	0.456	2.15	2.02	94
B10	0.506	0.457	0.067	0.34	0.24	70

Tabla IX.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa MIV C1 en los 3 carriles en gel 3.

CEPA	MIV C1					
	C1	C2	C3	PROM	DE	CV (%)
B1	1	1	1	1.00	0.00	0
B2	1.731	3.599	1.953	2.43	1.02	42
B3	0.43	5.274	2.948	2.88	2.42	84
B4	3.285	0.361	0.165	1.27	1.75	138
B5	3.174	5.496	3.102	3.92	1.36	35
B6	2.817	4.968	2.898	3.56	1.22	34
B7	2.904	4.847	2.959	3.57	1.11	31
B8	7.768	13.559	8.689	10.01	3.11	31
B9	5.308	8.422	6.102	6.61	1.62	24
B10	1.5	7.249	4.542	4.43	2.88	65



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



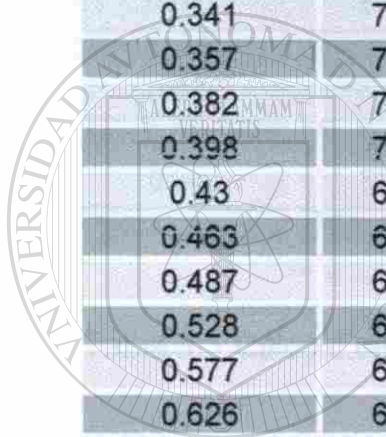
Tabla I.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 1 para los carriles 1, 2 y 3

EL TAMAÑO DE LAS BANDAS EN LOS 3 GELES SE OBTUVO POR MEDIO DE UNA CURVA DE CALIBRACIÓN.

Tabla I.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 1 para los carriles 1, 2 y 3

RF	LN PB	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.268	7.636	3.7	0.301	7.433	1691
0.325	7.313	4	0.325	7.338	1537
0.341	7.244	4.9	0.398	7.051	1154
0.357	7.170	5.7	0.463	6.797	895
0.382	7.090	6.3	0.512	6.606	740
0.398	7.003	6.5	0.528	6.543	694
0.43	6.908	7	0.569	6.384	592
0.463	6.802	7.7	0.626	6.161	474
0.487	6.685	8.3	0.675	5.970	392
0.528	6.551	9.2	0.748	5.684	294
0.577	6.397				
0.626	6.215	12.3			
0.682	5.991				
0.764	5.704				
0.845	5.298				
1	4.605				

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Tabla II.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 1 para los carriles 4, 5 y 6

RF	LN PB	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.268	7.636	3.8	0.309	7.401	1638
0.325	7.313	4.1	0.333	7.306	1489
0.341	7.244	5	0.407	7.020	1118
0.357	7.170	5.9	0.480	6.733	840
0.382	7.090	6.2	0.504	6.638	764
0.398	7.003	6.7	0.545	6.479	651
0.43	6.908	7.3	0.593	6.288	538
0.463	6.802	7.9	0.642	6.097	445
0.487	6.685	8.5	0.691	5.907	367
0.528	6.551	9.3	0.756	5.652	285
0.577	6.397				
0.626	6.215				
0.682	5.991	12.3			
0.764	5.704				
0.845	5.298				
1	4.605				

Tabla III.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 1 para los carriles 7, 8 y 9

RF	LN PB	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.268	7.636	3.7	0.301	7.433	1691
0.325	7.313	4.1	0.333	7.306	1489
0.341	7.244	4.9	0.398	7.051	1154
0.357	7.170	5.8	0.472	6.765	867
0.382	7.090	6.4	0.520	6.574	717
0.398	7.003	6.6	0.537	6.511	672
0.43	6.908	7.4	0.602	6.256	521
0.463	6.802	7.9	0.642	6.097	445
0.487	6.685	8.4	0.663	5.939	379
0.528	6.551	9.2	0.748	5.684	294
0.577	6.397				
0.626	6.215	12.3			
0.682	5.991				
0.764	5.704				
0.845	5.298				
1	4.605				

Tabla IV.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 2 para los carriles 1, 2 y 3

RF	LN PB	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.329	7.636	3.5	0.372	7.385	1612
0.404	7.313	3.8	0.404	7.299	1478
0.414	7.244	4.8	0.511	7.011	1108
0.436	7.170	5.7	0.606	6.751	855
0.468	7.090	6	0.638	6.665	784
0.5	7.003	6.5	0.691	6.521	679
0.542	6.908	7	0.745	6.377	588
0.574	6.802	7.7	0.819	6.175	481
0.627	6.685	8.3	0.883	6.002	404
0.68	6.551	9.2	0.979	5.743	312
0.744	6.397				
0.808	6.215				
0.893	5.991	9.4			
1	5.704				

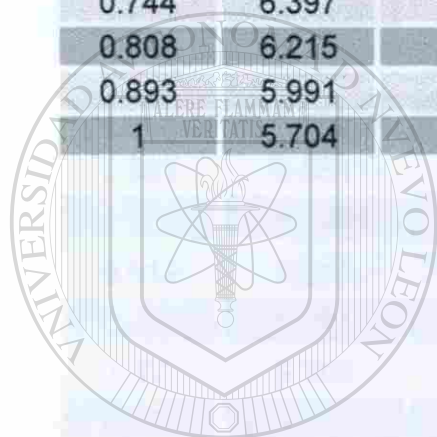
Tabla V.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 2 para los carriles 4, 5 y 6

RF	LN PB	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.329	7.636	3.5	0.372	7.385	1612
0.404	7.313	3.8	0.404	7.299	1478
0.414	7.244	4.8	0.511	7.011	1108
0.436	7.170	5.6	0.596	6.780	880
0.468	7.090	6	0.638	6.665	784
0.5	7.003	6.4	0.681	6.550	699
0.542	6.908	7	0.745	6.377	588
0.574	6.802	7.7	0.819	6.175	481
0.627	6.685	8.3	0.883	6.002	404
0.68	6.551	9.2	0.979	5.743	312
0.744	6.397				
0.808	6.215	9.4			
0.893	5.991				
1	5.704				

Tabla VII - Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 2 para los carriles 7,8 y 9

Tabla VI.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 2 para los carriles 7,8 y 9

RF	LN PB	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.329	7.636	3.5	0.372	7.385	1612
0.404	7.313	3.9	0.415	7.270	1436
0.414	7.244	4.8	0.511	7.011	1108
0.436	7.170	5.7	0.606	6.751	855
0.468	7.090	6.1	0.649	6.636	762
0.5	7.003	6.5	0.691	6.521	679
0.542	6.908	7	0.745	6.377	588
0.574	6.802	7.7	0.819	6.175	481
0.627	6.685	8.4	0.894	5.973	393
0.68	6.551	9.3	0.989	5.714	303
0.744	6.397				
0.808	6.215				
0.893	5.991				
1	5.704				



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla VII.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 3 para los carriles 1, 2 y 3

RF	LN	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.26	7.636	2.7	0.293	7.409	1651
0.315	7.313	3.1	0.337	7.245	1401
0.326	7.244	3.8	0.413	6.957	1051
0.336	7.170	4.4	0.478	6.711	821
0.369	7.090	4.8	0.522	6.547	697
0.391	7.003	5.1	0.554	6.423	616
0.423	6.908	5.4	0.587	6.300	545
0.445	6.802	5.8	0.630	6.136	462
0.489	6.685	6.3	0.685	5.931	376
0.521	6.551	7	0.761	5.643	282
0.576	6.397				
0.619	6.215				
0.684	5.991				
0.76	5.704	9.2			
0.869	5.298				
1	4.605				

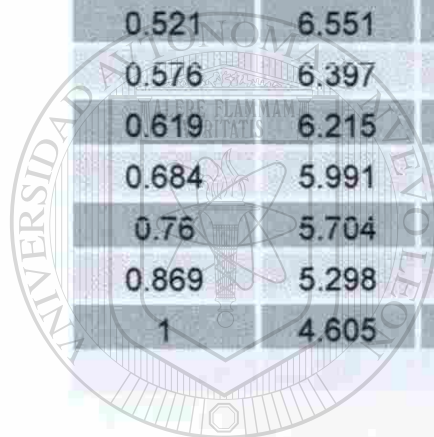
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla VIII.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 3 para los carriles 4,5 y 6

	LN	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.26	7.636	2.7	0.293	7.409	1651
0.315	7.313	3	0.326	7.286	1459
0.326	7.244	3.7	0.402	6.998	1095
0.336	7.170	4.4	0.478	6.711	821
0.369	7.090	4.7	0.511	6.588	726
0.391	7.003	5	0.543	6.464	642
0.423	6.908	5.4	0.587	6.300	545
0.445	6.802	5.9	0.641	6.095	444
0.489	6.685	6.4	0.696	5.890	361
0.521	6.551	7.1	0.772	5.602	271
0.576	6.397				
0.619	6.215				
0.684	5.991	9.2			
0.76	5.704				
0.869	5.298				
1	4.605				



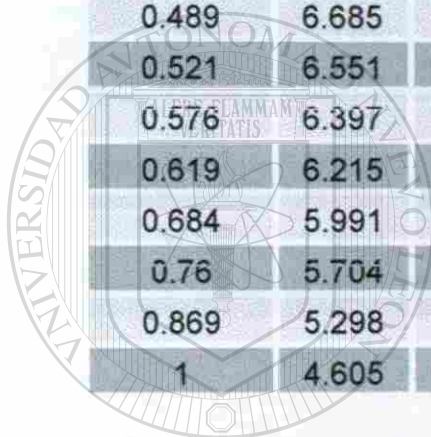
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Tabla IX.- Cálculo del tamaño de las bandas en el gel 3 para los carriles 7,8 y 9

RF	LN	DIST (CM)	RF	LN PB	TAMAÑO
0.26	7.636	2.7	0.293	7.409	1651
0.315	7.313	3.1	0.337	7.245	1401
0.326	7.244	3.7	0.402	6.998	1095
0.336	7.170	4.4	0.478	6.711	821
0.369	7.090	4.7	0.511	6.588	726
0.391	7.003	5	0.543	6.464	642
0.423	6.908	5.4	0.587	6.300	545
0.445	6.802	5.9	0.641	6.095	444
0.489	6.685	6.3	0.685	5.931	376
0.521	6.551	7	0.761	5.643	282
0.576	6.397				
0.619	6.215	9.2			
0.684	5.991				
0.76	5.704				
0.869	5.298				
1	4.605				



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CALCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN INTERENSAYO POR BANDA

Se calculó el coeficiente de variación interensayo por banda para las 3 cepas en los 3 geles

Tabla I.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa 70 en los 3 geles.

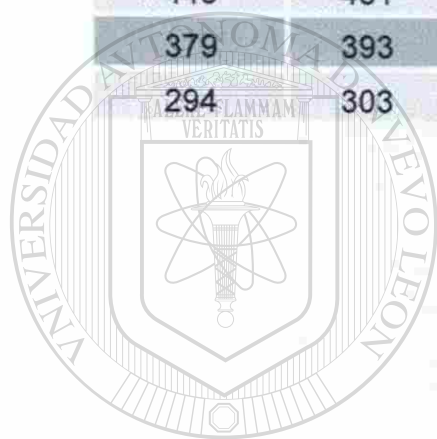
GEL 1	GEL 2	GEL 3	PROMEDIO	DE	CV (%)
1691	1612	1651	1651.33	39.50	2.39
1537	1478	1401	1472.00	68.20	4.63
1154	1108	1051	1104.33	51.60	4.67
895	855	821	857.00	37.04	4.32
740	784	697	740.33	43.50	5.88
694	679	616	663.00	41.39	6.24
592	588	545	575.00	26.06	4.53
474	481	492	482.33	9.07	1.88
392	404	376	390.67	14.05	3.60
294	312	282	296.00	15.10	5.10

Tabla II.- Cálculo del coeficiente de variación en porciento de la cepa 80 en los 3 geles.

GEL 1	GEL 2	GEL 3	PROM	DE	CV (%)
1638	1612	1651	1633.67	19.86	1.22
1489	1478	1459	1475.33	15.18	1.03
1118	1108	1095	1107.00	11.53	1.04
840	880	821	847.00	30.12	3.56
764	784	726	758.00	29.46	3.89
651	699	642	664.00	30.64	4.61
538	588	545	557.00	27.07	4.86
445	481	444	456.67	21.08	4.62
367	404	361	377.33	23.29	6.17
285	312	271	289.33	20.84	7.20

Tabla III.- Cálculo del coeficiente de variación en porcentaje de la cepa 14 H en los 3 geles.

GEL 1	GEL 2	GEL 3	PROM	DE	CV (%)
1691	1612	1651	1651.33	39.50	2.39
1489	1436	1401	1442.00	44.31	3.07
1154	1108	1095	1119.00	31.00	2.77
867	855	821	847.67	23.86	2.81
717	762	726	735.00	23.81	3.24
672	679	642	664.33	19.66	2.96
521	588	545	551.33	33.95	6.16
445	481	444	456.67	21.08	4.62
379	393	376	382.67	9.07	2.37
294	303	282	293.00	10.54	3.60

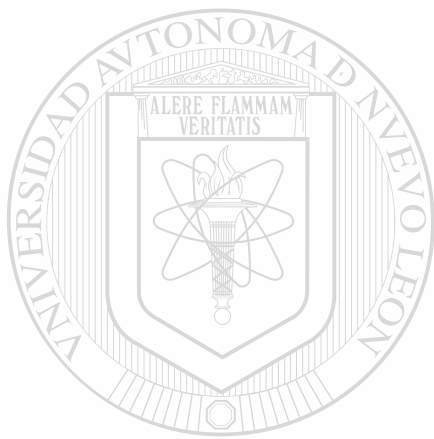


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



