



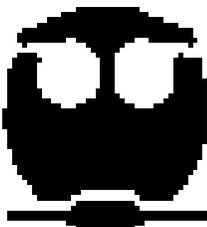
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*
MEDIANTE LA FORMACION DE CLAMIDOCONIDIAS EN
DIFERENTES MEDIOS LIQUIDOS Y CONDICIONES DE
INCUBACION**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A

KARLA JUAREZ REYES



MEXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	Prof. José Alexandro Bonifaz Trujillo
Secretario	Prof. Maria del Pilar Granada Macias
1er. Suplente	Prof. Misael González Ibarra
2do. Suplente	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Micología
Servicio de Dermatología
Hospital General de México

Asesor:

M. en C. José Alexandro Bonifaz Trujillo

Supervisor técnico:

Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez

Sustentante:

Karla Juárez Reyes

*“La perseverancia y la voluntad,
son la fuerza que impulsa para
llegar a la cima y el conocimiento
la luz que ilumina el camino”*

INDICE

Introducción	1
1. Generalidades	4
1.1. Candidosis	5
1.1.1. Epidemiología	5
1.1.2. Patogenia	8
1.1.3. Aspectos clínicos	9
1.2. <i>Candida</i>	10
1.2.1. Micología	10
1.2.2. Tipificación	10
1.2.2.1. Obtención de cultivos	10
1.2.2.2. Filamentación	11
1.2.2.3. Producción de pseudohifas y clamidoconidias	12
1.2.2.4. Pruebas bioquímicas	13
1.2.2.5. Otras pruebas de tipificación	14
1.2.3. <i>Candida dubliniensis</i>	15
1.2.4. Diagnostico de laboratorio	15
1.3. Técnicas de diferenciación para <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	18
1.3.1. Técnicas fenotípicas	18
1.3.2. Técnicas genotípicas	20
1.4. Formulación de medios de cultivo	21
1.4.1. Componentes	22
1.4.1.1. Harina de maíz	22
1.4.1.2. Harina de arroz	23
1.4.1.3. Avena	23
1.4.1.4. Cerelac®	25
1.4.1.5. Miel	26
1.4.1.6. Leche	27
1.4.1.7. Tween 80	28

1.5. Condiciones de incubación	29
1.5.1 Temperatura	29
1.5.2. Aeración	30
1.6. Preparación del Inóculo	30
1.6.1. Turbidimetría	31
1.6.2. Escala de Mc Farland	32
1.7. Pruebas estadísticas	32
1.7.1. Concordancia	33
1.7.2. Prueba ji cuadrada χ^2	36
2. Justificación	38
3. Objetivos	40
2.1. Objetivo general	41
2.2. Objetivos particulares	41
4. Hipótesis	42
4.1. Hipótesis verdadera	43
4.2. Hipótesis nula	43
5. Metodología	44
5.1. Cepas de trabajo	48
5.2. Preparación de los medios de cultivo líquidos	48
5.3. Preparación del inóculo	50
5.4. Inoculación e Incubación	50
5.5. Preparación de las muestras para el análisis microscópico de clamidoconidias	50
6. Resultados	51
6.1. Selección de la cepas de trabajo	52
6.2. Selección de las medios de cultivo	52
6.3. Análisis microscópico de las cepas	54

6.4. Producción de clamidoconidias	56
6.5. Diferenciación de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	60
6.6. Comparación estadística de los medios de cultivo	61
7. Discusión	62
8. Conclusiones	66
Bibliografía	68
ANEXO I	72

INTRODUCCIÓN

La candidosis es la micosis oportunista más frecuente. Es ocasionada por diversas especies de levaduras del tipo *Candida*; siendo la más frecuente *Candida albicans*, es por ello, que se debe contar con técnicas que permitan identificar y diferenciar a esta especie de otras del mismo género. Las pruebas fenotípicas son una herramienta que nos ayudan a identificar a *C. albicans* de una manera fácil y sencilla, sin embargo, algunas de estas pruebas pueden perderse con los subcultivos sucesivos y condiciones de almacenamiento de las cepas.

Una característica importante que permite diferenciar a *Candida albicans* de otras especies, es su capacidad de producir **clamidoconidias**, que son formas de reproducción asexuadas de resistencia, inespecífica para la mayoría de hongos, pero no para *C. albicans*. Actualmente la formación de clamidoconidias se realiza en medios de cultivo sólidos, pobres en nutrientes, para obligar a la especie a pseudofilamentar y filamentar y de esta manera formar dichas estructuras. Estos medios sólidos en general son efectivos para la obtención de formas bien definidas, sin embargo, el principal inconveniente, es el tiempo de incubación que se emplea: superior a 48 h.

Actualmente se ha reportado, que con el empleo de medios de cultivo líquidos elaborados a base de harina de maíz y suplementos lácteos, se tiene la ventaja de producir clamidoconidias en periodos de tiempo más cortos que en los medios utilizados convencionalmente, además de tener la ventaja de ser medios económicos y de fácil elaboración.

En 1995, se reportó por primera vez, la presencia de una nueva especie, a la cual se denominó *Candida dubliniensis*, ésta presenta características, patogénicas y fenotípicas muy similares a *C. albicans*, sin embargo, una de las características que justamente ha marcado diferencia entre ambas cepas es la producción de

clamidoconidias, siendo para *C. albicans* terminales y únicas; mientras que para *C. dubliniensis* son múltiples.

En este trabajo fueron utilizados medios de cultivo líquidos no solamente a base de harina de maíz, también se empleó harina de arroz, avena, leche y miel, además de un medio líquido realizado con un producto comercial elaborado a base de harina de trigo (Cerelac®). Con el uso de estos medios de cultivo, se pretende identificar a *C. albicans* mediante la producción rápida y eficiente de clamidoconidias; logrando así la posibilidad de poder diferenciar entre las especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Capítulo 1

GENERALIDADES

1.1. Candidosis

Es una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*; en especial *Candida albicans* (60-85%), presenta una gran variedad de cuadros clínicos, afectando primordialmente mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones, intestinos, etc.^{3,5}

En estudios realizados^{15,26} en 1995 surgió una nueva especie, o probablemente antigua pero no reconocida, clasificada como *Candida dubliniensis*. Los primeros reportes se obtuvieron a partir de estudios genéticos, debido a que las principales pruebas bioquímicas, micológicas y fisiológicas, son prácticamente similares a *C. albicans*. Se ha reportado un incremento de esta especie causando algún cuadro clínico, particularmente los asociados a infecciones del VIH-SIDA. Es importante remarcar que este microorganismo se considera que genera más fácilmente resistencia a los derivados azólicos, que son los más empleados en la terapéutica¹⁵.

1.1.1. Epidemiología

La candidosis es una enfermedad cosmopolita, y sin duda es la micosis que más se presenta en todo el mundo. El hábitat de las diversas especies de *Candida* es el humano y algunos animales homeotérmicos. No se aísla del suelo ni del detritus vegetal⁵.

Diversas especies de *Candida* son componentes de la flora habitual del cuerpo, se presentan desde los primeros días de nacimiento y tienen una fuerte predilección por las mucosas. Se puede encontrar en el tracto gastrointestinal, habitando boca, laringe y faringe; su número se puede incrementar por múltiples factores, como falta de aseo bucal y embarazo. El estómago no es saprofitado por que presenta

un pH demasiado ácido (entre 1 y 3), sin embargo coloniza intestino delgado y grueso.

La flora intestinal compuesta por *Candida* y otras levaduras (*Saccharomyces* y *Geotrichum*) se incrementa con dietas ricas en carbohidratos, sobre todo a partir de frutas. Las mucosas genitales también son infectadas, en el hombre con menor frecuencia, entre el 0 al 10%; en cambio en vagina, *C. albicans* y *Candida stellatoidea* habitan en equilibrio con otros microorganismos; en mujeres embarazadas, dependiendo de sus hábitos higiénicos, del uso del dispositivos intrauterinos y tratamientos anticonceptivos orales, entre otros, se puede encontrar en un porcentaje que va desde 5 hasta 30%. Cuando la mujer se embaraza, la flora de *Candida* se incrementa del 30 hasta el 75% debido entre otras causas a desequilibrios con la flora bacteriana, aumento del glucógeno, cambios de pH, y baja respuesta inmune⁵. Diversas 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 incrementa. *C. albicans* no forma parte de la flora de uñas, su aislamiento de éstas por lo general indica candidosis. En vías respiratorias superiores y urinarias, se encuentran frecuentemente⁵.

Debido a que *C. albicans* y otras especies oportunistas son parte integral de la flora habitual del humano, regularmente provocan enfermedades endógenas favorecidas por factores predisponentes del paciente; sin embargo, hay ocasiones que la candidosis se presenta en forma exógena, por ejemplo por introducción de grandes inóculos de levaduras a través de catéteres y de jeringas no estériles. La balanitis, una enfermedad que afecta el aparato genital de hombre, muchas veces es a consecuencia de las relaciones sexuales con la pareja que cursa con vaginitis por *Candida*, o bien con una flora incrementada, de manera que este tipo de candidosis se considera exógena y adquirida por transmisión sexual⁵.

La candidosis se presenta en todas las edades, en lactantes, se origina por la infección de las mucosas a nivel del canal del parto, sobre todo cuando la madre cursó con candidosis en el último tercio del embarazo; en los adultos se presenta entre la 3ª y 4ª década, aunque en ancianos también es frecuente⁵.

En general para esta enfermedad, la ocupación no es un factor de importancia, pero hay algunos casos específicos, sobre todo de candidosis interdigital y onicomycosis en las manos, que están íntimamente relacionados y son consecuencia del tipo de trabajo, en especial de personas que mantienen las manos húmedas, como lavanderas, amasadoras de pan, tortilla, y limpiadoras de fruta y pescado⁵.

Los factores predisponentes más frecuentes y específicos para la candidosis son:

1. Factores fisiológicos: cambios de pH, sobre todo en vagina y boca, embarazo.
2. Enfermedades o procesos debilitantes: diabetes, tuberculosis, absceso hepático amibiano, desnutrición, etc.
3. Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, pacientes VIH positivos, SIDA, y para el caso específico de la candidosis mococutanea generalizada, agamaglobulinemias; síndrome de Di George, timomas, hipoparatiroidismo e hipoadenocortisismo.
4. Iatrogénicos: tratamientos prolongados con antibióticos, corticoesteroides y citotóxicos; tratamientos anticonceptivos orales y dispositivos intrauterinos (DIU). Cateterismo y procesos quirúrgicos invasivos.
5. Misceláneos: dermatosis inflamatorias previas (dermatitis de contacto y del área del pañal), traumatismos ungueales, mal estado de la dentadura, prótesis mal adaptadas y humedad⁵.

1.1.2. Patogenia

La candidosis es la clásica enfermedad oportunista que requiere forzosamente de factores predisponentes, la mayoría de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a dos procesos:

- a) Por el desequilibrio de la flora microbiana, que hace que incremente la presencia de levaduras como *Candida*, esto se puede deber a cambios de pH, cúmulos de nutrientes como el glucógeno, o por disminución de la flora bacteriana por antibióticos.
- b) Por enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos de polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y B.

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, un ejemplo de ello es por cateterismo, ya que se inoculan directamente los microorganismos al torrente circulatorio como ya se indico⁵.

Se ha atribuido la patogenicidad de *Candida* a algunas toxinas, se han reportado más de 50 tipos y también diversos tipos de enzimas, dentro de las que destacan: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas, hialuronidasas, entre otras. Otro factor de virulencias de las cepas, es la capacidad de adherirse a los diferentes tejidos (particularmente mucosas), lo hacen mediante sustancias de tipo mananas; posteriormente es de igual importancia la capacidad que tienen de transformarse de una fase levaduriforme a una fase micelial o pseudomicelial (fase infectante). Esto comprueba porqué dos variedades de la misma especie pueden tener diferente virulencia (DL₅₀)⁵.

1.1.3. Aspectos clínicos

El nivel de profundidad o sistematización de la candidosis no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor predisponente con el que se asocie. Las variedades clínicas que se presentan son las siguientes:

Candidosis	Tipo clínico
Mucocutánea	Oral Genital Gastrointestinal Broncopulmonar Mucocutánea-crónica
Cutánea	Intertrigos Onicomicosis Del área del pañal Pustulosis Granuloma
Sistémica	Septicemia Tracto urinario Meningitis Endocarditis

Tabla 1.1. Variedades clínicas de la candidosis

1.2. *Candida*

1.2.1. Micología

Clasificación:

Clase: *Deuteromycetes*

Subclase: *Blastomycetidia*

Orden: *Cryptococcal*

Familia: *Cryptocaceae*

Genero: *Candida*

Especie: *albicans, dubliniensis, tropicalis, stellatoidea, glabrata, pseudotropicalis, guillermundii, famata, lusitaniae, kefyr y zeylanoides.*

Candida glabrata es la única especie oportunista que no genera pseudohifas, lo que complica su identificación en estado virulento, por eso durante mucho tiempo fue clasificada dentro del género *Torula* o *Torulopsis*⁵.

1.2.2. Tipificación

Para la identificación del género *Candida* se llevan a cabo la siguiente secuencia de pruebas de laboratorio:

1.2.2.1. Obtención de cultivos

Se desarrollan en el medio agar Sabouraud en un tiempo promedio de 48 a 72 horas a 25 °C, dando colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, generalmente lisas, aunque algunas veces se presentan rugosas, de color blanco o blanco

amarillento, rara vez pueden dar tonalidades rosas (*C. guilliermondii*). En algunas especies es posible ver formaciones de pseudomicelio que se entremete en el agar.

Todas las especies de *Candida* se reproducen por blastoconidias (blastosporas), el tamaño de cada una de ellas fluctúa entre 2 a 10 μm de diámetro, formando gemas de la mitad de su tamaño; en ocasiones se logra observar pseudohifas o pseudomicelio, sobre todo cuando provienen de medios muy pobres o viejos; hay que remarcar que *C. glabrata* no forma pseudohifas^{3,5}.



Figura 1.1. Levaduras y pseudohifas de *C. albicans*

1.2.2.2. Filamentación

Esta prueba se realiza en suero humano o sueros con albúmina, glucosa, glucosamina o sales de amonio. Se siembra la cepa a investigar en 0.5mL del suero, se incuba a 37°C entre 3 a 3 y media horas, posteriormente se practica un examen en fresco con algún colorante o tinción (Gram). Esta prueba es presuntiva de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y se considera (+) sí se forma un tubo germinal de aproximadamente 5 a 15 μm de largo, que parte de la célula levaduriforme. Es

importante remarcar que después del periodo indicado de incubación, todas las especies de *Candida*, con excepción de *C. glabrata*, pueden formar tubos germinativos. Mucho se ha discutido sobre el valor de esta prueba debido a que se presentan falsos resultados positivos y negativos, que dependen tanto de la cepa como de las condiciones del medio^{3,5}.



Figura 1.2. Tubos germinativos de *Candida dubliniensis*

1.2.2.3. Producción de pseudohifas y clamidoconidias

Se lleva a cabo en medios pobres y tensos, como harina de maíz agar (corn meal) o papa-zanahoria agar, a los que se les agrega 1% de algún tensoactivo como el Tween 80. Cualquiera de los medios utilizados se siembra en cajas Petri por estrías, incubándose a 25°C durante 72 horas, para hacer la observación se agrega una gota de colorante y un cubreobjetos sobre la colonia; posteriormente la caja se coloca encima de la platina del microscopio para su investigación microscópica. Todas las especies oportunistas de *Candida* presentan pseudohifas largas, ramificadas, con cúmulos de blastoconidias; con excepción de *C. glabrata*. En el caso específico de *C. albicans* se ven clamidoconidias terminales o intercalares que miden entre 14 y 12µm de diámetro, con una doble membrana bien formada. Esta prueba biológica es determinante para diferenciar *C. albicans* y

C. dubliniensis, en raras ocasiones *C. stellatoidea* da positiva esta prueba, esta última especie era considerada una variante de *C. albicans*^{3,5}.

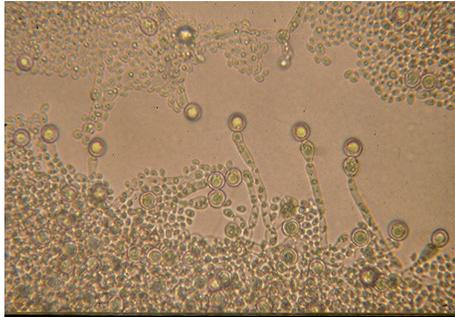


Figura 1.3. Clamidoconidias únicas de *C. albicans*

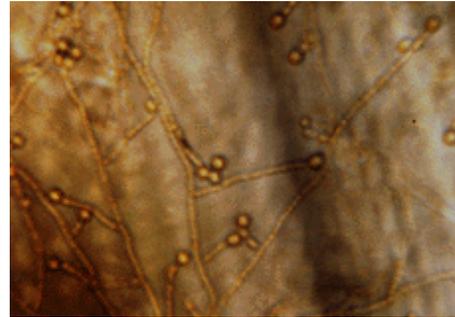


Figura 1.4. Clamidoconidias múltiples de *C. dubliniensis*

1.2.2.4. Pruebas bioquímicas

Se basan en la fermentación (zimograma) y utilización (auxonograma) de carbohidratos. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de *Candida*^{3,5}.

Zimograma: Debe realizarse en medio de cultivo líquido con una proporción de carbohidrato entre 1 y 5%, agregándole un indicador para pH ácido (rojo fenol o púrpura de bromocresol) y una campana de fermentación, para detectar la producción de gas. Los medios se siembran a partir de colonias diferenciadas, posteriormente se incuban a 25 °C durante 5 a 15 días, la lectura debe hacerse por el viraje del indicador, así como por la formación de gas^{3,5}.

Auxonograma: Se realiza en medio sólido con base peptonada, ausente de carbohidratos, estos se agregan en forma de penicilindros o sensidiscos (de manera similar a como se emplean en los antibiogramas), previamente se siembra

la cepa problema y el carbohidrato a investigar se aplica en una solución del 1 al 2%, se incuban a 25 °C durante 5 a 15 días. El desarrollo de la colonia alrededor del sensidisco indica una lectura positiva^{3,5}.

Especie	Zimograma						Auxonograma					
	Glu	Gal	Man	Sac	Lac	Raf	Glu	Gal	Man	Sac	Lac	Raf
<i>C. albicans</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	V	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. famata</i>	V	-	-	-	-	V	+	+	+	+	V	+
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	-	-	-	V	V	+	+	-	-

Tabla 1.2. Zimograma y auxonograma del género *Candida*. Glu = glucosa, Man = Manosa, Sac = Sacarosa, Lac = Lactosa, Raf = rafinosa; + = positivo, - = negativo, V = variable.

1.2.2.5. Otras pruebas de tipificación

La reducción de las sales de tetrazolio es una prueba importante cuando hay confusión entre *C. stellatoidea* con clamidoconidias positivas y *C. albicans*⁵. Pueden valorarse otras características que nos ayudan en la tipificación, como son resistencia a la cicloheximida (actidione), utilización de nitratos y presencia de ureasa. La resistencia al actidione puede medirse simplemente con el crecimiento en medio de Micosel (Sabouraud con cicloheximina). La utilización de nitratos, y la presencia de ureasa permite distinguir de otros géneros de levaduras como *Cryptococcus*^{3,5}.

1.2.3. *Candida dubliniensis*

C. dubliniensis es una especie oportunista, descrita por primera vez en 1995. Principalmente esta asociada con candidosis oral en pacientes VIH-positivos y pacientes con SIDA²⁶. Esta especie presenta gran similitud fenotípica y genotípica con *C. albicans*.

La incidencia de *C. dubliniensis* observable en algunas cepas que anteriormente se habían clasificado como *C. albicans* se estima que es aproximadamente de un 2%^{14,21}.

1.2.4. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico clínico adecuado y oportuno es muy importante, pero en especial un diagnóstico diferencial, puesto que esta patología puede ser confundida con otras. Es importante el aislamiento e identificación de la especie causal, debido a la presencia de especies resistentes a algunos antifúngicos, como ya se había mencionado^{5,15}.

De acuerdo con la localización de las lesiones pueden observarse distintos tipos de materiales útiles para el diagnóstico de laboratorio, la toma de muestra puede ser variable como exudados, escamas, sangre, esputo, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), etc. Para el diagnóstico de laboratorio son necesarias las siguientes pruebas:

Exámenes directos: se realizan con soluciones aclarantes como KOH (10%) o dimetil sulfóxido (10%); tinciones como Gram, Wright, Giemsa y ácido peryódico de Schiff (PAS). En las observaciones al microscopio de los exámenes directos o tinciones, se presentan grandes cúmulos de blastoconidias y pseudohifas cortas o

largas que determinan el estado patógeno y virulento de la levadura, confirmando el diagnóstico. En el caso de piel y uñas no se encuentran pseudohifas, pero el solo aislamiento del hongo en medios de cultivo es indicativo de la enfermedad, debido a que *Candida sp* no es flora habitual de esta región^{3,5}.

Los medios de cultivo utilizados pueden ser: Sabouraud, Gelosa Sangre (GS), infusión de cerebro corazón (BHI) y micosel (Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida), sin embargo, en este último algunas especies como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida zeylanoides* son inhibidas. Las características de la colonias en la mayor parte de los medios son similares: crecen después de 2 o 3 días a 28 o 37°C, dando colonias blanquecinas, húmedas, limitadas, opacas y en algunas ocasiones se puede observar dentro del agar pseudohifas.



Figura 1.5. Colonia de *C. albicans* en medio Sabouraud.

Hay medios de cultivo selectivos para el género *Candida*, como el Biggy (Nickerson), que contiene gran cantidad de citratos que eliminan la flora bacteriana, y sulfitos que son reducidos a sulfuros por *Candida*; de manera que las colonias se ven de color café claro u oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes. Actualmente han surgido una serie de medios de cultivo,

que permiten una identificación de primoaislamiento de algunas especies, por ejemplo el medio comercial “Candiselect”, permite la diferenciación de *C. albicans* de las otras especies. El medio CHROMagar-Candida, está hecho a base de sales cromógenas, que permiten el desarrollo de las especies de *Candida* más comunes y otros hongos levaduriformes, mediante la formación de colonias coloridas, perfectamente bien diferenciadas: *C. albicans* (verde claro); *C. dubliniensis* (verde oscuro); *C. tropicalis* (azul-gris); *C. krusei* (rosa pálido); *Candida sp.* (blanco-crema); *Trichosporon sp.* (azul-gris) y *Geotrichum candidum* (púrpura)^{3,5,14,25}.

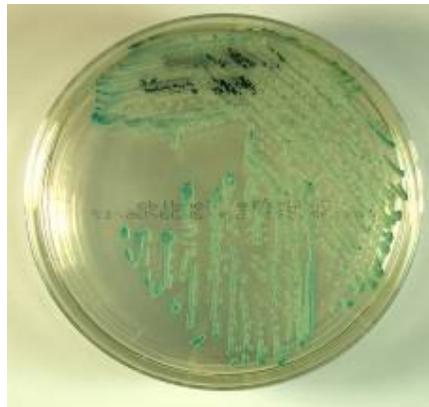


Figura 1.6. Colonia de *C. albicans* en medio CHROMagar-Candida.

Las biopsias son utilizadas en casos profundos. La histopatología por lo regular reporta granuloma tuberculoide acompañado por blastoconidias y pseudohifas, utilizando tinciones como PAS y Grocott⁵. Otras técnicas que también se pueden utilizar son rayos X, tomografías, pruebas inmunológicas como intradermorreacción (IDR) a la candidina y serología^{3,5}.

1.3. Técnicas de diferenciación para *C. albicans* y *C. dubliniensis*

1.3.1. Técnicas fenotípicas

Las características fenotípicas son una herramienta que nos ayudan a diferenciar a *C. albicans* de *C. dubliniensis* de una manera fácil y sencilla, sin embargo, algunas de estas pruebas pueden perderse dando falsos negativos debido a los subcultivos y a las condiciones en las que se almacenan las cepas^{14,25}.

C. dubliniensis crece bien entre 30 y 37 °C en medios de cultivo rutinarios usados para el crecimiento de especies de *Candida*. Las colonias formadas en medios sólidos como son agar Sabouraud o agar papa dextrosa (PDA), tienen un color crema, similares a las formadas por *C. albicans*. A una temperatura de 42 °C *C. dubliniensis* tiene un crecimiento muy pobre comparado con *C. albicans*²⁵. En los cultivos incubados a una temperatura de 45 °C, el desarrollo de *C. dubliniensis* se ve inhibido mientras que *C. albicans* tiende a desarrollarse sin ningún problema a dicha temperatura^{8,14,18}.

Algunas veces es imposible distinguir entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* en medios sólidos convencionales, sí se utilizan medios cromogénicos como lo es el CHROMagar-Candida, en donde a las 48 h de crecimiento a una temperatura de 37 °C, se pueden observar colonias de *C. albicans* verde claro y colonias verde oscuro de *C. dubliniensis*^{14,25}.



Figura 1.7. Colonia de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en medio CHROMagar-Candida.

El medio agar Sabouraud con azul de metileno, también nos ayuda a distinguir entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*; en este medio *C. albicans* produce una fluorescencia de color amarillo al ser expuesta a la luz ultravioleta de baja intensidad (UV), mientras que *C. dubliniensis* carece de dicha capacidad²⁵.

Una diferencia importante entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* es la inhabilidad que tiene *C. dubliniensis* a expresar la actividad de la β -glucosidasa²⁵. La utilización de xilosa y α -metil-D-glucosido por *C. albicans*, también es una herramienta eficiente para diferenciarla de *C. dubliniensis*, ya que esta última no presenta esta capacidad. Esta prueba se lleva a cabo mediante la utilización de los sistemas comerciales API 20C AUX y Vitek YBC que son sistemas capaces de diferenciar en forma rápida a *C. albicans* y *C. dubliniensis*^{8,14}.

Uno de los aspectos más importantes para la identificación de estas especies, es la producción de clamidoconidias, característica que permite la diferenciación entre ambas especies y por ello es de gran utilidad. Se han desarrollado medios que nos permiten diferenciarlas, siendo estos medios específicos para la producción de clamidoconidias. Un ejemplo es el agar Staib (ácido cafeínico) en el

cual se pueden observar que *C. albicans* desarrolla una colonia lisa, brillante, y microscópicamente se observan blastoconidias e hifas, mientras que *C. dubliniensis* presenta una colonia opaca, rugosa, con blastoconidias, hifas y clamidoconidias^{2,23}.

El medio Staib líquido (medio de *Guizotia abyssinica* + creatinina), también induce la formación de clamidoconidias en *C. dubliniensis*; en este medio se presentan abundantes clamidoconidias y pseudohifas, en cambio *C. albicans*, sólo presenta desarrollo de blastoconidias. Con la misma eficiencia, también se puede usar el medio líquido sustituyendo a *Guizotia abyssinica* por *Helianthus annuus*, medio en el cual se presentan las mismas características que el anterior²⁴. En el agar Ácido cafeínico-citrato férrico, la producción de clamidoconidias se ve inhibida para *C. albicans* mientras que *C. dubliniensis* si hay producción de dichas estructuras². El agar caseína también sirve para diferenciarlas, en este medio *C. dubliniensis* produce abundantes clamidoconidias mientras que *C. albicans* no las produce¹⁶. En el agar Pal's (agar semilla de girasol), se puede observar la producción de hifas alrededor de la colonia de *C. dubliniensis*, mientras que para *C. albicans* sólo se observan las colonias sin la producción de hifas¹.

1.3.2. Técnicas genotípicas

Las pruebas más precisas para diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis* son las técnicas moleculares, algunos ejemplos de estas son DNA "fingerprinting"²⁵, análisis por RAPD^{25,21} ("randomly amplified polymorphic DNA"), electroforesis de campo pulsado²⁵ o una técnica más específica, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{25,14}.

1.4. Formulación de medios de cultivo

La diversidad de los microorganismos hace que su nutrición sea también diversa, y por ello, los medios de cultivo varían en función del grupo microbiano para el cual se utilizan. Tomando en cuenta lo anterior, se diseñan medios de cultivo que contienen todos los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas para los requerimientos específicos de cada tipo de microorganismo^{4,10,19}. El empleo adecuado de algún componente en un medio de cultivo, puede ayudar a obtener variaciones específicas en las características del crecimiento de algún microorganismo en especial; un ejemplo de ello puede ser la inducción de la producción de estructuras morfológicas características del microorganismo a estudiar, y con ello auxiliarnos a su identificación o diferenciación con otros microorganismos.

La formación de clamidoconidias, es un ejemplo de característica morfológica específica que nos ayuda a diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* de otras especies del género *Candida*, por ello, el empleo de medios de cultivo que nos permitan inducir la producción de éstas, nos son de gran utilidad.

La obtención de clamidoconidias, comúnmente se lleva a cabo en medios de cultivo sólidos elaborados a base de agar Harina de maíz + Tween 80, agar arroz^{3,5} y agar con Cerelac® + Tween 80³, sin embargo, se ha observado que con el uso de medios de cultivo líquidos enriquecidos con leche^{9,11,17}, se obtiene una producción más eficiente de clamidoconidias en tiempos de incubación más cortos^{9,11,17}.

En este proyecto se probaron medios de cultivo líquidos utilizando como base varias harinas y cereales, como fueron: harina de maíz, harina de arroz, avena y Cerelac®; también se emplearon leche bronca y leche entera, Tween 80 y miel; los resultados del crecimiento en estos medios se utilizaron para obtener un estudio comparativo referente a la eficiencia de estos medios para inducir la producción de clamidoconidias.

1.4.1. Componentes

Analizaremos ahora de manera general a cada uno de los componentes que se utilizaron en los medios propuestos.

1.4.1.1 Harina de maíz

Ingredientes: Maíz blanco, *Ácido fólico, *Mononitrato de Tiamina (vit. B₁), Hierro reducido, *Riboflavina (vit. B₂), Oxido de zinc (zinc), *Nicotinamida (Niacina), Trazas de cal.

*Vitaminas del complejo B

Compuesto	Cada 100 g contiene
Proteínas	8.0 g
Carbohidratos totales	75.4 g
del cual :	
Azúcares	0 g
Fibra dietética	8.0 g
Grasas totales	3.9 g
del cual:	
Grasa saturada	0.5 g
Grasa monoinsaturada	1.0g
Grasa poliinsaturada	2.3 g

Tabla 1.3. Composición de la harina de maíz

Una de las formas de consumo del maíz, es en forma de harina como base de fabricación de algunos productos. La cocción destruye parte de las proteínas, que se reducen a 1/3, y le hace perder hasta un 30% de agua; la grasa se conserva, se predigieren los hidratos de carbono y se conservan el 60% de sales minerales y parte de las vitaminas. Un 57.5% de las sales minerales que contiene son ácidas. Es por lo tanto un alimento ligeramente acidificante⁶.

1.4.1.2. Harina de arroz

La composición de la harina de arroz se muestra en la siguiente tabla:

Compuesto	Cada 100 g contiene
Proteínas	8.5 g
Grasas totales	1.3 g
Carbohidratos totales	82.5 g
Sodio	5 mg

Tabla 1.4. Composición de la harina de arroz

Al hervir el arroz, se disuelven las albúminas y a ebullición prolongada se pierden sales minerales y vitaminas. Las grasas y los hidratos de carbono se conservan⁶.

1.4.1.3. Avena

La avena aporta minerales y constituye reservas de glicógeno. Es cinco veces más rica en grasas que el trigo y le sobrepasa en hidratos de carbono, proteínas y diversos minerales. La avena posee un 58.8% de sustancias minerales ácidas y un 41.2% de sustancias alcalinas. Es, por tanto, un alimento acidificante⁶.

Compuesto		Cada 100 g contiene
Principios Inmediatos	Agua	12 g
	Grasas	5 g
	Proteínas	13 g
	Almidón	55 g
	Azúcar	1 g
	Dextrina	2 g
	Celulosa	9 g
	Cenizas	3 g
Sales minerales	Sodio	0.451 g
	Potasio	0.431 g
	Calcio	0.082 g
	Magnesio	0.157 g
	Hierro	0.013 g
	Fósforo	0.406 g
	Azufre	0.209 g
	Cloro	0.064 g
	Cobre	0.001 g
	Zinc	0.005 g
	Manganeso	0.005 g
	Flúor	0.000025 g
	Yodo	0.000004 g
Cobalto	0.000001 g	
Vitaminas	Vitamina A	5 U.I.
	Vitamina D	50 U.I.
	Vitamina K	10 U.I.
	Vitamina B ₁	0.56 mg
	Vitamina B ₂	0.14 mg
	Vitamina PP	1.1 mg
	Vitamina E	1.9 mg

Tabla 1.5. Composición de la avena

1.4.1.4. Cerelac®

Ingredientes: Harina de trigo, Vitamina E (tocoferol), Leche parcialmente descremada, Niacina (nicotinamida), Azúcar, Vitamina A, Aceite de maíz, Vitamina B₁ (tiamina), Oligofructosa, Pantotenato de calcio, Inulina, Vitamina D (colecalfiferol), Carbonato de calcio, Vitamina B₆ (piridoxina), Cloruro de Sodio, Ácido fólico (folacina), Fumarato ferroso, Biotina, Sulfato de Zinc, Vitamina B₁₂ (cobalamina), Yoduro de Potasio, Saborizante natural Vainillina, Vitamina C (ácido ascórbico).

Compuesto	Cada 100 g contiene
Hidratos de carbono	67.8 g
Lípidos (grasas)	9.0 g
Proteínas	15.0 g
Sodio	165 mg
Potasio	530 mg
Calcio	410 mg
Fósforo	340 mg
Hierro	7.5 mg
Zinc	5.0mg
Vitamina C	40 mg
Vitamina E	3.0 mg
Niacina	2.4 mg
Ácido pantoténico	1.1 mg
Vitamina B ₁	0.50 mg
Vitamina B ₂	0.30 mg
Vitamina B ₆	0.20 mg
Vitamina A	375 µg
Ácido fólico	50 µg
Vitamina D	5.0 µg
Biotina	4.0 µg
Vitamina B ₁₂	0.70 µg

Tabla 1.6. Composición del Cerelac®

1.4.1.5. Miel

La miel es un alimento azucarado alcalino, el índice de alcalinidad de la miel es proporcional a la intensidad de su color. Es un elemento constructor y reparador de las células, gracias a que por haber sido predigerida por la abeja es directamente asimilable, conteniendo las radiaciones vitalógenas del sol y del aire captadas por las plantas. Proporciona diversos ácidos orgánicos como málico, vínico, cítrico, láctico, oxálico, fórmico y fosfórico; y la proteína xantofila, derivada de la clorofila⁶.

Compuesto		Cada 100 g contiene
Principios Inmediatos	Agua	18.4 g
	Proteínas	0.4 g
	Grasas	---
	Hidratos de carbono	
	Fructosa	38.5 g
	Glucosa	34.9 g
	Dextrina	4.8 g
	Sacarosa	3.0 g
Sales minerales	Potasio	0.010 g
	Sodio	0.005 g
	Calcio	0.006 g
	Magnesio	0.006 g
	Hierro	0.0009 g
	Fósforo	0.016 g
	Azufre	0.003 g
	Cloro	0.024 g
	Manganeso	0.0002 g
	Yodo	0.00001 g
	Cobre	0.00007 g
Vitaminas	Vitamina C	0.004 g
	Vitamina B ₁	0.00001 g
	Vitamina B ₂	0.000004 g
	Vitamina B ₆	0.00001 g
	Vitamina PP	0.00020 g
	Ácido pantoténico	0.00060 g

Tabla 1.7. Composición de la miel

1.4.1.6. Leche

Los principales ingredientes de la leche son: un azúcar (lactosa), tres proteínas (caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina), grasas y una variedad de vitaminas y minerales. La inoculación de un microorganismo en medios de cultivo que contienen leche descremada pueden determinar las siguientes actividades metabólicas: fermentación de la lactosa, hidrólisis de proteínas y actividad respiratoria. Cuando el microorganismo es incapaz de fermentar la lactosa, puede derivar su energía de las proteínas del medio. La degradación de las proteínas o peptonización resulta en la liberación de amoníaco, con lo que el pH se torna alcalino¹⁹.

Compuesto		Contenido
Principios Inmediatos	Agua	87.3 g
	Proteínas	3.2 g
	Grasas	3.5 g
	Hidratos de carbono	4.8 g
	Cenizas	1.2 g
Sales minerales	Potasio	0.190 g
	Calcio	0.175 g
	Fósforo	0.168 g
	Cloro	0.065 g
	Sodio	0.061 g
	Azufre	0.099 g
	Magnesio	0.016 g
	Hierro	0.0005 g
Vitaminas	Vitamina A	400 U.I.
	Vitamina B ₁	25 µg
	Vitamina B ₂	50 µg
	Vitamina B ₆	0.80 mg
	Vitamina C	1 mg
	Vitamina D	1 mg
	Vitamina K	5 mg
	Vitamina E	3 mg
	Vitamina H	1 mg

Tabla 1.8. Composición de la leche

Las variedades de la leche son leche fluida (entera), leches modificadas (descremadas – comerciales), leche en polvo, leche condensada²⁸.

Se entiende con el nombre de leche entera a la leche a granel higienizada, enfriada y mantenida a 5 °C, sometida opcionalmente a terminación, pasteurización y/o estandarización de materia grasa, transportada en volúmenes de una industria láctea a otra para ser procesada y envasada bajo normas de higiene. Puede ser sometida a procesos de ultra alta temperatura (UAT ó UHT), que consisten en llevar la leche homogenizada a temperaturas de 130° a 150°C durante 2 a 4 segundos lo cual permite higienizarla de forma apropiada y de manera que estas puedan llegar en forma segura al consumidor. Las leches puede ser modificada en su contenido graso²⁸.

La leche entera que se utilizó fue obtenida comercialmente, se encuentra adicionada con Vitamina A y Vitamina D. Otra de las leches utilizadas fue la leche “bronca” o fresca.

1.4.1.7. Tween 80

Los Tweens, también conocido como polisorbatos, son ésteres de ácido graso del sorbitol y sus anhídros copolimerizados con una cantidad variable de moles de óxido de etileno. Es una serie de materiales, Tweens o polisorbatos, que incluyen al 20, 40, 60 y 80. El polisorbato el 80 es una éster oleato; es un líquido oleoso color limón o ámbar; olor suave característico; sabor cálido, algo amargo, densidad 1.07 a 1.09, pH 6 – 8; muy soluble en agua; soluble en alcohol, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, acetato de etilo, metanol o tolueno; insoluble en aceite mineral²⁰.

Debido a sus características hidrófilas y liófilas, estos surfactantes no iónicos son agentes muy útiles para formar emulsiones²⁰.

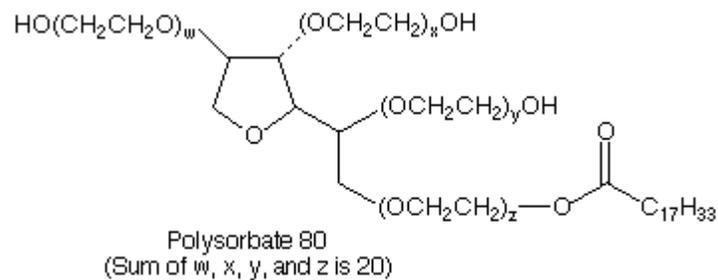


Figura 1.8. Estructura del polisorbato 80

1.5. Condiciones de incubación

El conocimiento de las condiciones físicas ambientales que regulan la sobrevivencia y multiplicación de los microorganismos, permite idear y aplicar métodos para cultivarlos en condiciones óptimas¹⁹. Estos factores se discuten a continuación

1.5.1. Temperatura

La temperatura es uno de los factores que afecta el índice de crecimiento de un microorganismo. Influye tanto en las reacciones químicas y en la configuración tridimensional de las proteínas, afectando los índices de actividad enzimática. Los microorganismos presentan distintas exigencias respecto a las temperatura que permiten su crecimiento; cada grupo microbiano crece dentro de una gama de temperaturas limitada¹⁹. La temperatura mínima es aquella por debajo de la cual cesa el crecimiento, pero no se produce necesariamente la muerte de los microorganismos; la temperatura óptima es la que proporciona un crecimiento más

abundante y la temperatura máxima es aquella por encima de la que cesa el crecimiento y se produce la muerte. El punto de muerte térmica de un microorganismo es la temperatura mínima por encima de la óptima donde se produce la muerte en un tiempo dado. El límite superior de temperatura tolerada por cualquier especie se correlaciona bien con la estabilidad térmica general de las proteínas de dicha especie⁴.

1.5.2. Aeración

Muchos microorganismos son aerobios obligados, requiriendo específicamente oxígeno como aceptor de hidrógeno, otros son facultativos y capaces de vivir aerobia o anaerobiamente; por último, algunos otros son anaerobios obligados, requiriendo una sustancia diferente del oxígeno como aceptor de hidrógeno¹⁰.

El aporte de aire a los cultivos de microorganismos se realiza, generalmente, agitando mecánicamente los recipientes para introducir el oxígeno en el medio, o bien el aire es forzado a través del mismo por presión. La velocidad de difusión de oxígeno hacia las células limita de manera brusca la velocidad de crecimiento¹⁰.

1.6. Preparación del inóculo

Para muchos tipos de pruebas es necesario emplear un inóculo con un número conocido de células. El número de microorganismos en un medio líquido puede determinarse contando las células individualmente en una cámara microscópica o midiendo la densidad óptica de un cultivo líquido del microorganismo y comparándolo con el número de colonias que se observa en un posterior subcultivo en un medio sólido, haciendo crecer el microorganismo hasta su fase estacionaria (cuando su número es aproximadamente 1×10^9 microorganismos/mL). Finalmente se puede comparar la turbidez del medio líquido

con un estándar que presenta una suspensión de un número conocido de microorganismos⁷. Esta última es la técnica llamada turbidimetría, que es la técnica que se utilizará en este proyecto.

1.6.1. Turbidimetría

La turbidez se debe a la capacidad de las partículas en suspensión para refractar y desviar los rayos de luz que pasan por la suspensión de modo que la luz sea reflejada nuevamente hacia los ojos del observador. Algunos de los instrumentos que miden la turbidez determinan la densidad óptica (DO) al comparar la cantidad de luz que atraviesa la suspensión (porcentaje de transmitancia) con la cantidad de luz que atraviesa una suspensión control sin partículas. Un fotómetro convierte la luz que incide sobre su superficie en un impulso eléctrico que puede ser cuantificado. Un segundo tipo de medición de turbidez se obtiene por nefelometría o dispersión de la luz. En este caso los fotómetros se colocan formando ángulos con la suspensión y se mide la luz dispersada, generada por un láser o lámpara incandescente. La cantidad de luz dispersada, depende del número y tamaño de las partículas en suspensión. Los resultados se comparan con una curva estándar construida con una suspensión testigo de concentración celular conocida. Las mediciones de turbidez se emplean para determinar si un organismo está presente en una muestra clínica o para establecer si una cepa determinada de una bacteria o levadura puede desarrollar en presencia de inhibidores específicos del crecimiento, influyendo agentes antimicrobianos^{7,19}. En una suspensión microbiana, la cantidad de microorganismos está directamente relacionada con la turbiedad o densidad óptica de la misma, e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma. De este modo se pueden precisar con bastante exactitud el número de microorganismos presentes en una suspensión mediante la determinación de la turbiedad¹⁹.

La metodología es útil con suspensiones de densidad microbiana baja y con cultivos, en donde los microorganismos son unicelulares y con un tamaño de unos cuantos micrómetros, característica que les permiten mantenerse suspendidos y homogéneamente distribuidos; en tanto que con microorganismos de mayor tamaño, así como con aquellos productores de polisacáridos, éste tipo de metodología no es adecuada¹⁹.

1.6.2. Escala de McFarland

Los estándares de turbidez se pueden preparar mezclando sustancias que precipitan formando una suspensión de turbidez reproducible; estas suspensiones, que emplean sulfato de bario, fueron desarrollada por McFarland y representan un número de microorganismos, para suspensiones de igual turbidez, que ha sido determinada por recuento de colonias⁷.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario al 1% (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Ácido sulfúrico al 1% (mL)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad celular aprox. ($\times 10^8/\text{mL}$)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Tabla 1.9. Estándar nefelométrico de McFarland

1.7. Pruebas estadísticas

Para el análisis comparativo de las cepas y los diversos medios de cultivo que serán utilizados, se emplearán pruebas estadísticas que permitirán obtener el medio de cultivo y las condiciones de incubación más eficientes.

1.7.1. Concordancia

La validación de un procedimiento permite conocer si las mediciones (recolección de datos) que se realizan son reproducibles, consistentes y exactas. La validación esta conformada por:

- Confiabilidad o precisión
- Validez o exactitud

Para conocer la confiabilidad del método es necesario emplear pruebas estadísticas dependiendo de la escala en la cual se encuentren los resultados, es decir, cuando los datos recolectados están dentro de una escala nominal dicotómica (+ ó -), la prueba estadística que se debe emplear para conocer la confiabilidad del método es coeficiente kappa, si lo datos están dentro de una escala ordinal (orden jerárquico grado I, II, III, etc.) la prueba estadística recomendable es kappa pesada¹³.

En este proyecto, los datos recolectados están dentro de la escala dicotómica, por lo que la prueba empleada para el análisis de estos resultados será coeficiente kappa¹³.

El cálculo del coeficiente kappa (κ) se lleva a cabo mediante el uso de tablas de contingencia de 2X2 (que es una variación de la prueba χ^2), los resultados son ordenados de la siguiente manera:

		Control	
		+	-
Muestra	+	a	b
	-	c	d
		n	

a = concordancia de (+) entre los observadores

b = no concordancia

c = no concordancia

d = concordancia de (-) entre los observadores

n = total de observaciones

$$\kappa = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

$$P_0 = \frac{a + d}{n}$$

$$P_e = \left(\frac{a+b}{n} \right) \left(\frac{a+c}{n} \right) + \left(\frac{b+d}{n} \right) \left(\frac{c+d}{n} \right)$$

Los valores de κ varían de +1 a -1, siendo +1 el completo acuerdo y -1 el completo desacuerdo, el valor 0 implica que el valor observado y el producido por el azar son iguales¹³.

Criterios de Fleiss para la interpretación de κ

0.75 – 1.00	Muy buena concordancia, no debida al azar
0.50 – 0.74	Buena, adecuada concordancia más grande que la debida al azar
0.00 – 0.49	Inadecuada, puede ser debida al azar
< 0	Menos que la debida al azar

La eficacia del procedimiento a utilizar, se puede conocer determinando su sensibilidad, especificidad y valores predictivos en relación al evento a investigar, por lo que el cálculo se lleva a cabo usando tablas de contingencia de 2X2, comparando las muestras problema con un estándar o control¹³.

		Control	
		+	-
Muestra problema	+	a	b
	-	c	d

a = concordancia de (+) entre el control y muestra

b = no concordancia

c = no concordancia

d = concordancia de (-) entre el control y muestra

Sensibilidad $S = \frac{a}{a + c}$

Especificidad $E = \frac{d}{b + d}$

Valor predictivo
Positivo $VPP = \frac{a}{a + b}$

Valor predictivo
Negativo $VPN = \frac{d}{c + d}$

1.7.2. Prueba de ji cuadrada (χ^2)

La finalidad de una prueba de k muestras es evaluar la aseveración que establece que todas las k muestras independientes provienen de poblaciones que presentan la misma proporción de algún elemento. De acuerdo con esto, la hipótesis nula y alternativa son:

H_0 : Todas las proporciones de la población son iguales

H_1 : No todas las proporciones de la población son iguales

Sí la hipótesis nula es verdadera, entonces las variaciones entre las muestras se deben únicamente al azar²².

Se pueden obtener fórmulas sencillas para el cálculo de χ^2 , que se basan únicamente en las frecuencias observadas, y las frecuencias esperadas. La diferencia entre los dos conjuntos de frecuencias se puede determinar calculando el siguiente valor estadístico de prueba²².

$$\chi^2 = \left[\frac{(\text{frecuencia observada} - \text{frecuencia esperada})^2}{\text{frecuencia esperada}} \right]$$

Esto equivale a 1) Restar la frecuencia esperada de la frecuencia observada para cada casilla; 2) Elevar al cuadrado cada una de estas diferencias; 3) “Estandarizar” las diferencias elevadas al cuadrado dividiendo cada una entre las frecuencia esperada de cada casilla; y finalmente, 4) Sumar todos los términos para obtener el valor total²².

La distribución χ^2 tiene una forma que depende del número de grados de libertad asociados a un determinado problema. Debido a esta tendencia, el valor crítico (valor que deja un determinado porcentaje de área en la cola) será función de los

grados de libertad. Así, para obtener un valor crítico a partir de una tabla de χ^2 , se debe seleccionar un nivel de significación y determinar los grados de libertad para el problema que se este analizando²².

Los grados de libertad son una función del número de casillas en una tabla de contingencia de $2 \times k$. Es decir los grados de libertad reflejan el tamaño de la tabla. Al calcular las frecuencias esperadas, tanto para las columnas como para las filas, el valor esperado de la última celda se podría obtener simplemente restando la suma de las otras frecuencias esperadas de esa fila o columna, de las filas o columnas totales. De este modo, las frecuencias esperadas se ven restringidas por el requisito de que se suman al total, y se utiliza este conocimiento para obtener las frecuencias finales. Para compensar esto, se dice que cada columna pierde un grado de libertad. Así, los grados de libertad de la columna son el número de filas (categorías) menos 1, o bien, $r - 1$. En forma similar, como también se conocían los totales de las hileras, podría obtenerse cualquier valor esperado de cada una de ellas utilizando la diferencia entre el total de la fila y la suma de las otras frecuencias de la misma. Por consiguiente, cada fila presenta un número de grados de libertad igual al número de columnas (muestras) menos 1, o bien $k - 1$ ²².

La prueba requiere la comparación del valor calculado de χ^2 con el obtenido a partir de una tabla de valores críticos de esta última, utilizando los grados de libertad apropiados. Si el valor estadístico de prueba es menor que el valor tabular, la hipótesis nula es aceptada; si no ocurre así, H_0 es rechazada²².

Capítulo 2.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *C. albicans* es la levadura más común causante de las candidosis, así como también la más asociada a infecciones en pacientes inmunocomprometidos, se requiere de un diagnóstico rápido y eficiente de su etiología, por lo que es necesario innovar técnicas de laboratorio que nos permitan obtener resultados confiables. La existencia de *C. dubliniensis*, y el incremento en su frecuencia como causante de candidosis, cada vez es más importante, debido a que se asocia a la resistencia de antimicóticos azólicos, sus características tan similares a *C. albicans*, hacen que sean especies que fácilmente se confunden con las pruebas estándares de identificación, por lo que se requiere de técnicas fenotípicas como el desarrollo de clamidoconidias múltiples que nos diferencien entre estas especies.

Una técnica que se puede integrar a la rutina de cualquier laboratorio, es el uso de medios de cultivo líquidos enriquecidos con leche, que nos permitan identificar a *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la formación de clamidoconidias, esto nos llevará a un diagnóstico rápido, ya que estos medios están elaborados para producir clamidoconidias en un corto tiempo; otra ventaja importante es que su composición principalmente a base de harinas, los hace ser medios muy económicos.

Capítulo 3.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Identificar a *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* mediante la producción rápida y eficiente de clamidoconidias en medios de cultivo líquidos elaborados a base de harina de maíz, harina de arroz, avena y Cerelac®, enriquecidos con leche.

3.2. Objetivos particulares

- Disminuir el tiempo de incubación para la formación de clamidoconidias en *C. albicans* y *C. dubliniensis*
- Desarrollar un medio de cultivo líquido, eficiente para la producción rápida de clamidoconidias en *C. albicans* y *C. dubliniensis*
- Diferenciar a *C. albicans* y *C. dubliniensis* mediante la producción de clamidoconidias únicas y múltiples
- Comparar el rendimiento de producción de clamidoconidias utilizando diferentes medios de cultivo líquidos y condiciones de incubación
- Aplicar un método estadístico comparativo de los diversos medios utilizados, con respecto a las diferentes condiciones de incubación (temperatura y nutrientes).
- Proponer el uso de medios de cultivo líquidos como una metodología de producción de clamidoconidias en *C. albicans* y *C. dubliniensis*

Capítulo 4.

HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis verdadera

El uso de medios de cultivo líquidos elaborados a base de harina de maíz, harina de arroz, avena y Cerelac®, enriquecidos con leche y condiciones de incubación determinadas, ayudará a incrementar la velocidad de producción de clamidoconidias para *C. albicans* y *C. dubliniensis*, característica que será utilizada como herramienta para la diferenciación entre ambas especies.

4.2. Hipótesis nula

El uso de medios de cultivo líquidos elaborados a base de harina de maíz, harina de arroz, avena y Cerelac®, enriquecidos con leche y condiciones de incubación determinadas, no ayudará a incrementar la velocidad de producción de clamidoconidias para *C. albicans* y *C. dubliniensis*, haciendo de este un método indeficiente, por lo que dicha característica no podrá ser utilizada como herramienta para la diferenciación entre ambas especies.

Capítulo 5.

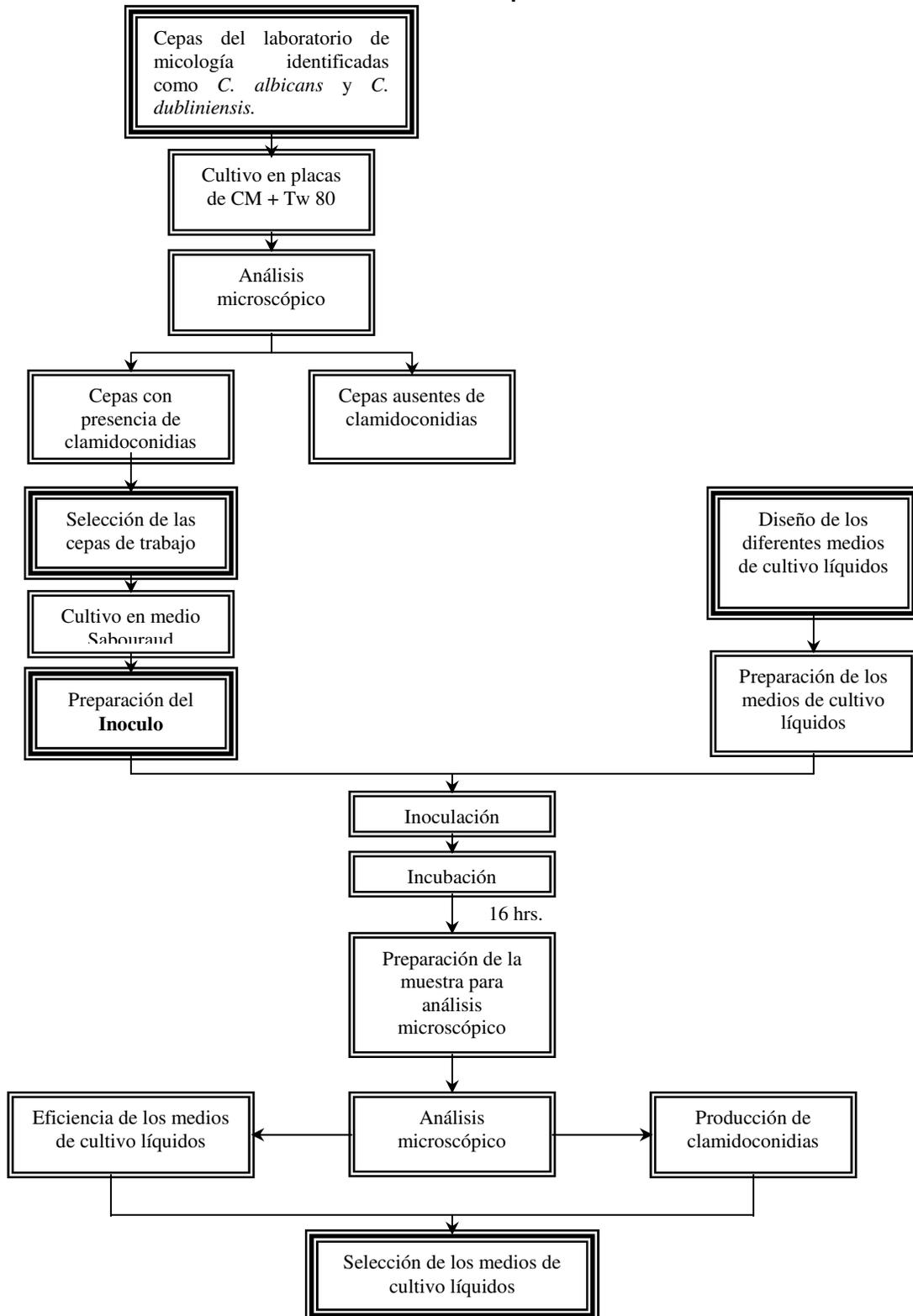
METODOLOGÍA

Este proyecto se llevó a cabo en dos etapas:

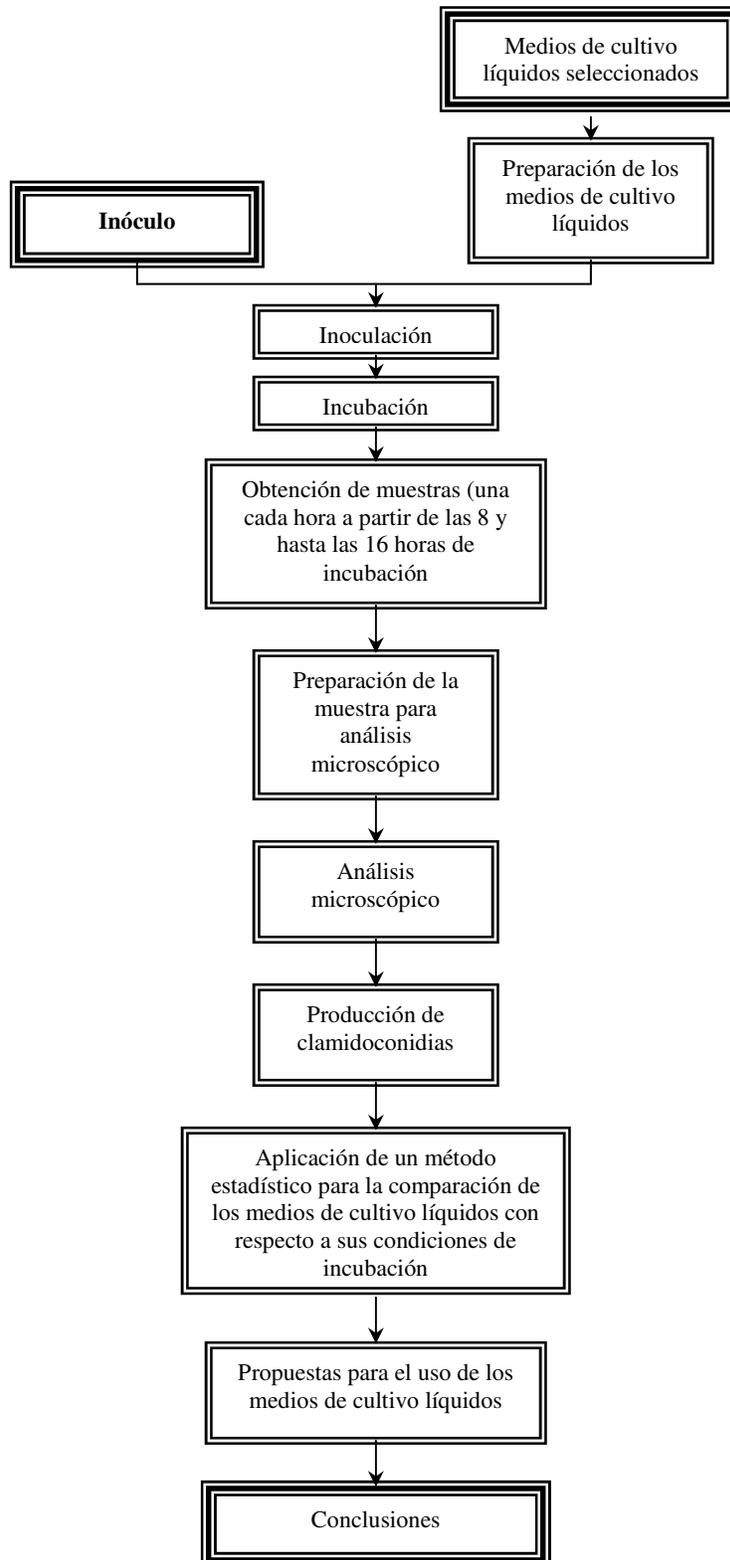
- 1ª etapa: Se realizó una selección de cepas que se encontraban en el cepario del laboratorio de Micología, tal como se indica en el apartado 5.1. de este capítulo. Se trabajó con seis cepas seleccionadas las cuales fueron inoculadas en los 16 medios de cultivo diseñados, se incubaron a 28 °C, 150 rpm y con un tiempo de 16 h de crecimiento. Esta prueba se realizó por triplicado para cada uno de los medios, de los resultados obtenidos se calculó el promedio y fueron registrados en una tabla. Por último se seleccionaron los cuatro medios de cultivo en los cuales se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la producción de clamidoconidias.

- 2ª etapa: Para la producción de clamidoconidias, se utilizaron los cuatro medios de cultivo líquidos seleccionados, y cada uno de ellos fue inoculado con las cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 1525, *C. dubliniensis* 4 y *C. dubliniensis* 30; se realizó un monitoreo a partir de las 8 h de incubación y hasta las 16 h, para cada una de las cepas, tomando muestras hora a hora durante este periodo de tiempo, esto fue realizado con la finalidad de encontrar condiciones de incubación más adecuadas para aumentar la producción de clamidoconidias, disminuir el tiempo de incubación y determinar la formulación más eficiente. Las condiciones de incubación de las pruebas fueron a temperaturas de 28 y 41 °C, 150 rpm. Por último, se realizó un análisis estadístico comparativo de los medios de cultivo y las condiciones de incubación.

Primera etapa



Segunda etapa



5.1. Cepas de trabajo

Para probar los diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación, se utilizaron cepas de *C. dubliniensis* y *C. albicans* conservadas en el cepario del Laboratorio de Micología del Hospital General de México; se seleccionaron aquellas cepas que desarrollaron la mayor cantidad de clamidoconidias.

Como controles se utilizaron cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. albicans* ATCC 90028.

5.2. Preparación de los Medios de cultivo líquidos

Se utilizaron 16 medios de cultivo líquidos:

1. Harina de maíz (3%) + tween 80 (1%) (HMTw)
2. Harina de maíz (3%) + leche entera (5%) (HMLE)
3. Harina de maíz (3%) + leche entera (5%) + miel (1%) (HMLEMi)
4. Harina de maíz (3%) + leche bronca (5%) (HMLB)
5. Harina de maíz (3%) + leche bronca (5%) + miel (1%) (HMLBMi)
6. Harina de arroz (3%) + tween 80 (1%) (HATw)
7. Harina de arroz (3%) + leche entera (5%) (HALE)
8. Harina de arroz (3%) + leche entera (5%) + miel (1%) (HALEMi)
9. Harina de arroz (3%) + leche bronca (5%) (HALB)
10. Harina de arroz (3%) + leche bronca (5%) + miel (1%) (HALBMi)
11. Avena (3%) + tween 80 (1%) (AvTw)
12. Avena (3%) + leche entera (5%) (AvLE)
13. Avena (3%) + leche entera (5%) + miel (1%) (AvLEMi)
14. Avena (3%) + leche bronca (5%) (AvLB)
15. Avena (3%) + leche bronca (5%) + miel (1%) (AvLBMi)
16. Cerelac® (3%) + tween 80 (1%) (CTw)

Los medios de cultivo líquidos, fueron preparados de la siguiente manera:

La harina o avena se pesó y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 o 500mL, dependiendo de la cantidad de medio a utilizar. Se agregó el agua y esta mezcla se calentó agitando constantemente y se llevó a ebullición por 5 min. Se filtraron todos los medios con ayuda de un embudo de vidrio y una gasa. Aquellos medios en los que se requirió el uso de la miel o el Tween 80, se adicionaron después de filtrarlos. Se recuperó el volumen de agua en todos los medios líquidos, calculándose el requerido para una concentración final de 3% de harina o avena en agua destilada, 5% de leche y 1% en el caso del Tween 80⁹ y miel³. Los medios líquidos preparados con Tween 80 se vaciaron en tubos de 13 x 100 y se esterilizaron, el resto de los medios se esterilizaron en el matraz en los que se encontraban. Todos los medios se esterilizaron en autoclave (121 °C por 20 min.). Al término del ciclo de esterilización se retiraron los medios, aquellos en los cuales se tenía que agregar leche entera, se dejaron enfriar a una temperatura de 45 °C; en condiciones de esterilidad se adicionó la leche y se agitó el medio para obtener una mezcla homogénea y los medios fueron distribuidos en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca estériles almacenándose en el refrigerador hasta su uso.

Los medios elaborados con Cerelac® se prepararon añadiendo éste a una concentración de 14g/1000mL en agua destilada, esta mezcla se calentó agitando constantemente, se llevó a ebullición por 5 min. Se filtró el medio con ayuda de un embudo de vidrio y una gasa. Se adicionó el Tween 80 en una concentración final de 1% y se recuperó el volumen de agua. El medio se vació en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca y se esterilizaron en autoclave (121 °C por 20 min.)³. Almacenándose en refrigeración hasta su uso.

5.3. Preparación del Inóculo

Para inocular los medios de cultivo líquidos se prepararon suspensiones de cada una de las cepas. Se utilizaron cultivos de 24 horas de incubación en medio Sabouraud. Se tomaron las colonias con un asa bacteriológica y se resuspendieron en un tubo de ensayo con 5mL de agua estéril. Se homogenizó la suspensión y se ajustó la turbidez a 0.5 en la escala de Mc Farland (1×10^6 UFC/mL)^{7,12}.

5.4. Inoculación e Incubación

En condiciones de esterilidad se tomó 0.1mL de cada suspensión y se inocularon todos los medios de prueba. Las condiciones de incubación fueron establecidas para cada una de las pruebas en particular^{9,11,17}.

5.5. Preparación de las muestras para el análisis microscópico de clamidoconidias

En un portaobjetos se colocó una gota de cada una de las muestras obtenidas, por cada medio y por cada temperatura probada, esto con la ayuda de una pipeta Pasteur, y se cubrió con un cubreobjetos, posteriormente se llevó a cabo el análisis microscópico de cada una de las muestras.

Capítulo 6.

RESULTADOS

Primera etapa

6.1. Selección de las cepas de trabajo

Las cepas con las cuales se obtuvieron los mejores resultados con respecto a la producción de clamidoconidias fueron *C. albicans* 1525, *C. dubliniensis* 4 y *C. dubliniensis* 30. Se utilizaron como controles las cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. albicans* ATCC 90028

6.2. Selección de los medios de cultivo

Selección de medios de cultivo		HMTw	HMLE	HMLEMi	HMLB	HMLBMi	HATw	HALE	HALEMi
<i>Candida glabrata</i>	Lev	+	+	++	+	+	+	+	+++
<i>Candida parapsilosis</i>	Lev	++	+	+++	++	+	+	+++	+++
	Pseu	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	++	++	+++	+	+	++	++	+++
	Pseu	-	+	++	-	-	++	+	++
	CUT	-	+	-	-	-	++	++	+++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	++	++	++	+	+	++	++	+++
	Pseu	-	-	+	-	-	+	++	++
	CUT	-	-	+	-	-	+	++	++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	++	++	++	+	+	++	+	+++
	Pseu	++	-	++	-	-	++	+	++
	CUT	++	-	++	-	-	+	++	+++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	++	+	++	+	+	++	++	++
	Pseu	-	-	-	-	-	+	-	-
	CUT	-	-	-	-	-	-	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.1. Tabla de resultados para la selección de medios de cultivo. (-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples. (HMTw) Harina de maíz + tween 80, (HMLE) Harina de maíz + leche entera, (HMLEMi) Harina de maíz + leche entera + miel, (HMLB) Harina de maíz + leche bronca, (HMLBMi) Harina de maíz + leche bronca + miel, (HATw) Harina de arroz + tween 80, (HALE) Harina de arroz + leche entera, (HALEMi) Harina de arroz + leche entera + miel.

Selección de medios de cultivo (cont.)									
		HALB	HALBmi	AvTw	AvLE	AvLEMi	AvLB	AvLBmi	CTw
<i>Candida glabrata</i>	Lev	-	+	-	++	++	+	+	++
<i>Candida parapsilosis</i>	Lev	+	++	+	++	+++	+	+	++
	Pseu	-	-	+++	+	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	++	++	+	++	+	+	++
	Pseu	-	-	+	+	+	-	-	++
	CUT	-	-	-	-	++	-	-	+++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	+	++	++	+	+	+	+	++
	Pseu	-	-	+	+	+	-	-	++
	CUT	-	-	-	+	++	-	-	+++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	++	+	+	++	+	++	+
	Pseu	-	-	-	+	++	-	-	++
	CUT	-	-	-	+	++	-	-	+++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	+	+	+	+	+	+	++
	Pseu	-	-	-	+	-	-	-	-
	CUT	-	-	-	-	+	-	-	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.1. (continuación) Tabla de resultados para la selección de medios de cultivo. (-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples. (HALB) Harina de arroz + leche bronca, (HALBmi) Harina de arroz + leche bronca + miel, (AvTw) Avena + tween 80, (AvLE) Avena + leche entera, (AvLEMi) Avena + leche entera + miel, (AvLB) Avena + leche bronca, (AvLBmi) Avena + leche bronca + miel, (CTw) Cerelac® + tween 80.

En la tabla 6.1. se reporta el desarrollo de las seis cepas seleccionadas en los 16 diferentes medios de cultivo líquidos diseñados, a 28° C, 150 rpm y 16 h de incubación. La producción de clamidoconidias se valoró semicuantitativamente, estableciéndose una escala que permitió clasificar el desarrollo de estas estructuras de la siguiente manera: (+) poco, (++) moderado y (+++) abundante.

Segunda etapa

6.3. Análisis microscópico de las cepas

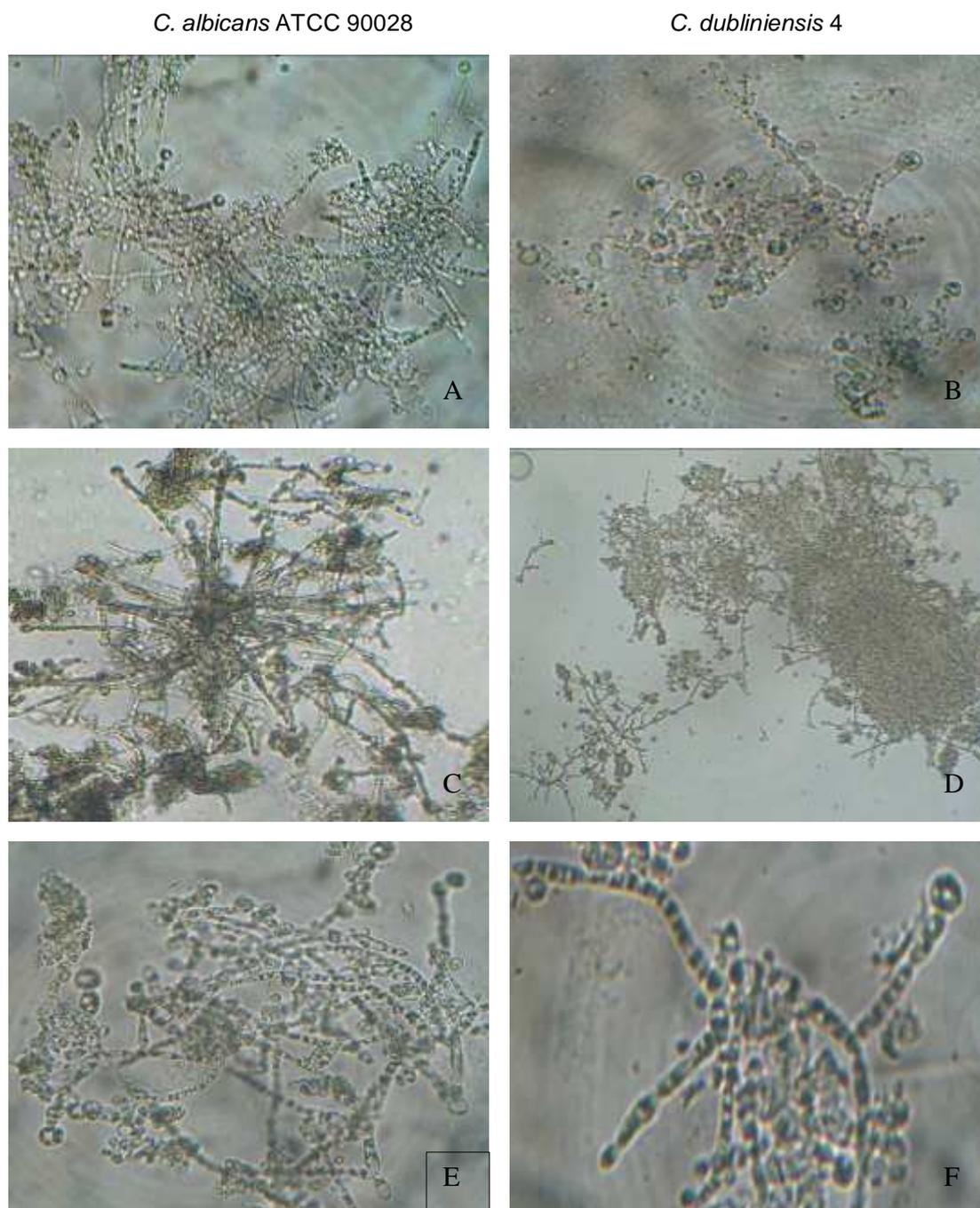


Figura 6.1. Producción de clamidoconidias en los medios de CTw (A,B), HALEMi (C,D) y AvLEMi (E,F) en *C. albicans* ATCC 90028 y *C. dubliniensis* 4 a 28° C.

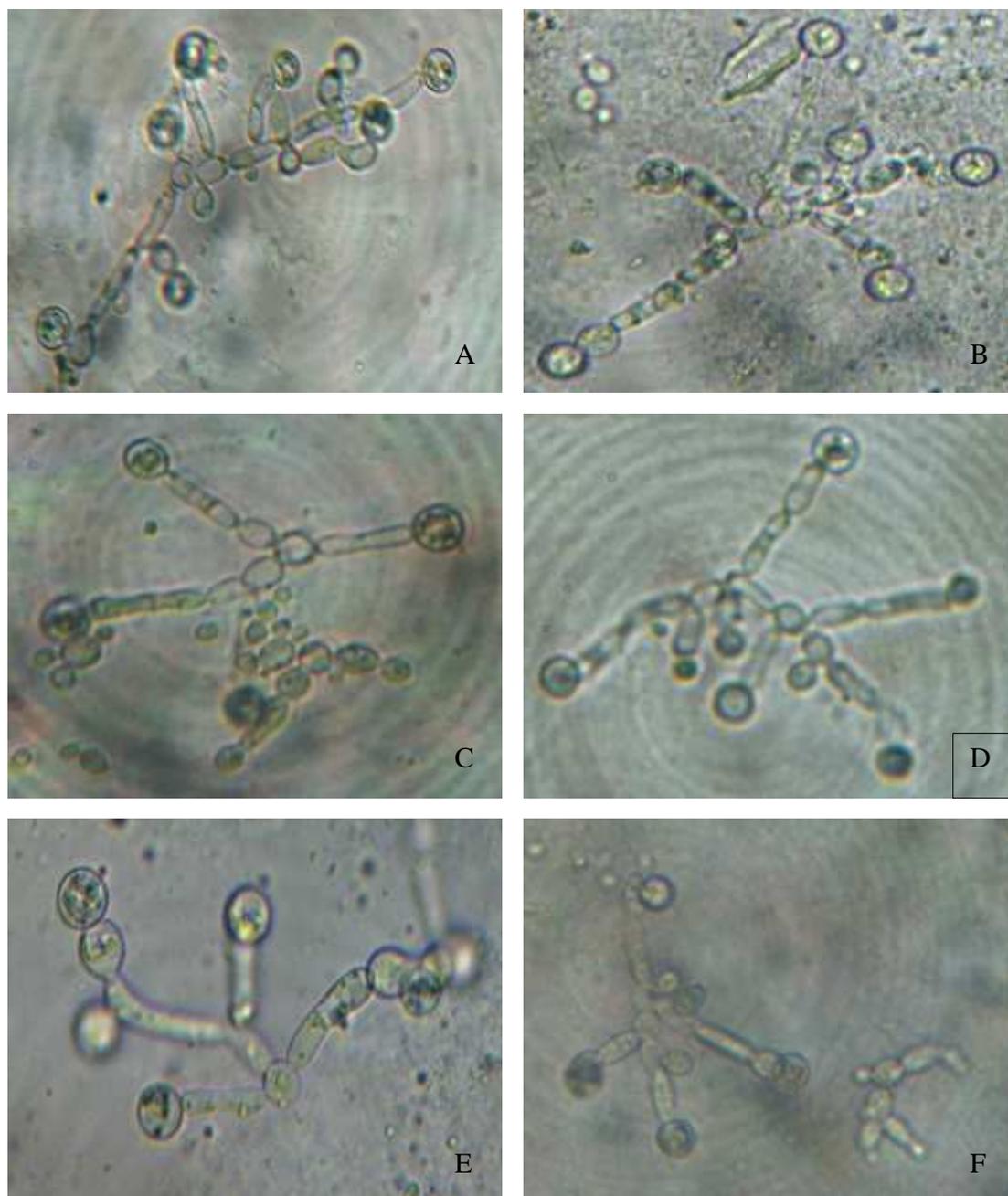


Figura 6.2. Producción de clamidoconidias. A) *C. albicans* ATCC 90028 (CTw, 28° C), B) *C. albicans* ATCC 90028 (HALEMi, 28° C), C) *C. albicans* 1525 (CTw, 28° C), D) *C. dubliniensis* 4 (CTw, 28° C), E) *C. dubliniensis* 4 (HALEMi, 28° C), F) *C. dubliniensis* 30 (HALE, 41° C).

6.4. Producción de clamidoconidias

A continuación se muestran las tablas de resultados obtenidos para cada una de las diferentes temperaturas y tiempos de incubación empleados, en ellas se observa la producción de todas las estructuras desarrolladas de cada una de las cepas utilizadas bajo las condiciones de incubación establecidas.

Prueba 1. T = 41° C y rpm = 150

Medio: CTw		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pseu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	+	+	+	++	++	++	++	++	++
	Pseu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	+	+	+	++	++	++	+	+++
	Pseu	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	+	+	+	++	++	++	+	+
	Pseu	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Medio: HALEMi		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	++	++	++	++	++	++	+++	++	+++
	Pseu	+	+	+	+	++	++	++	+	+
	CUT	-	-	-	-	+	+	++	+	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	Pseu	+++	+	+	+	+	+	++	+	-
	CUT	+	+	-	+	+	+	++	+	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pseu	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	CUT	-	+	+	-	+	+	+	++	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++
	Pseu	+++	++	+	++	++	++	++	++	+++
	CUT	-	+	++	++	++	+++	+++	++	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Medio: HALE		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	++	++	++	+	++	++	+
	Pseu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CUT	++	+	+	+	+	+	+	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	+	+	++	++	+	+	+	+	++
	Pseu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CUT	+	+	-	-	+	+	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	+	+	+	+	+	++	++	+
	Pseu	+	+	+	+	+	+	+	+	++
	CUT	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	++	+	++	+	+	+	++	++	+
	Pseu	++	+++	++	++	+	+	++	++	++
	CUT	++	+++	++	+	+	++	++	+	++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Medio: AvLEMi		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	++	+++	++	+++	++	++	+++	++
	Pseu	-	-	-	+	+	+	+	+	++
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pseu	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pseu	-	-	-	-	+	+	-	+	+
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Pseu	+	++	+	+	++	+	++	+	++
	CUT	+	+	-	-	+	+	++	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Prueba 2. T = 28° C y rpm = 150

Medio: CTw		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	Pseu	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	CUT	+	-	-	+	++	++	+	+	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	Pseu	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	CUT	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pseu	+	+	+	+	++	+	+	+	+
	CUT	+	+	+	+	++	+	+	+	++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pseu	+	+	-	-	-	+	+	+	-
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Medio: HALEMi		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	++	+	++	++	++	++	+++
	Pseu	+	+	+	+	++	+	++	++	+++
	CUT	+	+	+	+	+++	+	++	++	+++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	++	+	+	+	+	+	++	++	++
	Pseu	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	CUT	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	++	++	++	++	++	++	++	+++
	Pseu	+	++	+	+	++	++	++	+	++
	CUT	+	+	+	+	+++	++	+	+	++
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	++	++	+++	++	++	+++	++	++
	Pseu	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	CUT	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Medio: HALE		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	-	-	+	+	+	+	-
	Pseu	-	+	-	-	+	+	+	+	-
	CUT	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pseu	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	CUT	-	+	+	+	+	+	-	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pseu	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	CUT	-	+	-	+	-	-	+	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	Pseu	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	CUT	++	++	++	-	-	-	-	+	+
	CM	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

Medio: AvLEMi		Tiempo (h)								
		8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Lev	+	+	+	+	++	++	+	++	+
	Pseu	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	CUT	+	-	+	+	+	+	-	-	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 1525	Lev	+	+	++	+	+	+	++	++	+++
	Pseu	-	+	+	+	+	+	+	++	+
	CUT	-	-	+	-	+	+	+	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> 4	Lev	+	+	+	+	+	+	+++	+	++
	Pseu	+	+	+	+	++	++	+	+	+
	CUT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CM	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Candida dubliniensis</i> 30	Lev	++	+	+	+	++	++	+++	+++	+++
	Pseu	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	CUT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CM	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Nulo, (+) Escaso, (++) Moderado; (+++) Abundante. (Lev) Crecimiento levaduriforme, (Pseu) Pseudohifas, (CUT) Clamidoconidias Únicas Terminales, (CM) Clamidoconidias Múltiples.

6.5. Diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*



Figura 6.3. Clamidoconidias dobles de la cepa de *C. dubliniensis* 4 en medio AvLEMi a 28° C y 15 h de incubación.

En la Fig. 6.3. se observa la formación de clamidoconidias dobles en las cepa de *C. dubliniensis* 4 en el medio de AvLEMi a 28° C.

6.6. Comparación estadística de los medios de cultivo

Para conocer la eficacia, se determinaron sensibilidad, especificidad y valores predictivos; mientras que para saber la concordancia de los resultados obtenidos, se calculó el coeficiente κ .

Mediante el desarrollo de unos cálculos sencillos, se pudieron obtener valores para el coeficiente κ los cuales comparándolos con una tabla interpretativa (criterios de Fleiss), nos permitió conocer la concordancia entre los valores obtenidos, y de esta manera saber que tan buena o mala era ésta con respecto al azar¹³. Todos los cálculos de esta prueba, se pueden observar en el ANEXO I.a.

El análisis estadístico comparativo de los medios de cultivo se llevó a cabo mediante la aplicación de la prueba de χ^2 , la cual, utilizando tablas de contingencia de 2X9 basadas en la frecuencia observada con respecto a nuestro control y la frecuencia esperada, comparándose posteriormente con la distribución χ^2 nos permitió conocer el medio más eficiente. Todos los cálculos realizados para esta prueba se muestran en el ANEXO I.b.

Capítulo 7.

DISCUSIÓN

En la tabla 6.1. se puede apreciar que la producción de clamidoconidias se vio favorecida en los medios de harina de arroz + leche entera (HALE), harina de arroz + leche entera + miel (HALEMi), avena + leche entera + miel (AvLEMi) y Cerelac® + tween 80 (CTw), ya que sólo en estos cuatro medios se logró obtener la producción más eficiente de dichas estructuras para todas las cepas.

A diferencia de otros estudios elaborados por García-Hernández et. al.⁹ y S. Nakamoto¹⁷, en los cuales se ha reportado que con el empleo del medio de cultivo líquido CMB suplementado con 5% de leche se logró obtener una producción eficiente de clamidoconidias, en el presente trabajo no fue así. De igual manera, en ninguno de los medios que contenían leche completa (bronca) se obtuvieron buenos resultados, posiblemente la contaminación bacteriana pudo haber afectado, ya que la leche se añadió sin previa esterilización.

Como ya se mencionó anteriormente los medios de cultivo líquidos en los cuales se obtuvieron los mejores resultados fueron HALE, HALEMi, AvLEMi y CTw, es por esta razón que se seleccionaron a estos medios para trabajar en la segunda etapa del proyecto.

Las cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 1525 y *C. dubliniensis* 4 tuvieron un comportamiento similar en todos los medios de cultivo, viéndose favorecida la producción de clamidoconidias a 28° C, de esta manera se confirma lo expresado en otros estudios, en donde García-Hernández et. al.⁹ registraron los mejores resultados bajo las condiciones ideales de incubación que incluye una temperatura de 28° C, y Nakamoto S.¹⁷ reportó que la temperatura óptima de incubación se encuentra dentro del intervalo de 24-30° C, sin embargo, para la cepa de *C. dubliniensis* 30 los mejores resultados se obtuvieron a 41° C.

En cuanto al tiempo de incubación, se pudo observar que la formación de pseudohifas comenzó a partir de las 8 h⁹ y de clamidoconidias (en una cantidad significativa), a partir de las 12-14 h, mientras que en otros estudios^{9,17} la producción más eficiente se tuvo a las 16 y 20 h. Es probable que la variación tanto en las condiciones de incubación, como en las formulaciones de los medios de cultivo diseñados, permitan obtener una producción más eficiente de clamidoconidias para *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Es importante hacer notar que morfológicamente la producción de clamidoconidias obtenidas por medios sólidos es totalmente diferente a las de medios líquidos. En los primeros se observan todas las estructuras micóticas en un primer plano, con el desarrollo de pseudohifas que permiten ver definidas a las clamidoconidias, mientras que en los probados en este estudio, dan la formación de pseudohifas que se proyectan excéntricamente, es decir todas las pseudohifas e hifas salen de un punto hacia el exterior, por lo tanto la formación de las clamidoconidias, se dan en la periferia de esta proyección; esta disposición, no las permite ver con claridad y pueden incluso sobreponerse visualmente. La explicación que se puede dar a esta formación, es debido a que en el medio líquido, todas las pseudohifas quedan suspendidas, y el otro factor que contribuye, es la agitación, que genera una fuerza centrífuga. Este tipo de observaciones, son similares a lo reportado en los trabajos previos de García-Hernández⁹ y Zavalza-Sticker y cols.²⁷ Aunado la explicación morfológica anterior, esto apoya que no es posible por este método, la diferenciación entre las especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

A pesar de que en algunos medios de cultivo, la cantidad de clamidoconidias no fueron abundantes, microscópicamente estas estructuras se identificaron fácilmente; sin embargo, la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* no fue posible, debido a que las estructuras obtenidas eran prácticamente iguales. Lo anterior también se apoya en que estadísticamente los resultados obtenidos con

respecto al coeficiente κ , estuvieron por debajo del valor esperado, esto significa que no hay concordancia entre los valores obtenidos para las cepas en estudio con respecto al control, por lo que la interpretación se considera debida al azar.

En el ANEXO II.b. se pueden observar los cálculos realizados para el análisis estadístico comparativo de los medios de cultivo y las condiciones de incubación empleando la prueba de χ^2 , de los cuales se deduce que no hay diferencia significativa entre la distribución observada y la esperada al nivel de significación 0.01, por lo que estadísticamente los medios de cultivo y las condiciones de incubación más efectivas para la producción de clamidoconidias son: Cerelac® + tween 80 (CTw) a 28° C, harina de arroz + leche entera + miel (HALEMi) a 28 y 41° C, harina de arroz + leche entera (HALE) a 41° C y por último, avena + leche entera + miel (AvLEMi) a 28° C.

Capítulo 8.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

- El empleo de medios de cultivo líquidos tiene la ventaja de producir clamidoconidias en periodos de tiempo más cortos que los medios empleados convencionalmente, además de ser medios económicos y de fácil elaboración. Aunque el uso de incubadoras que incluyan un sistema de agitación puede limitar el empleo de esta técnica en laboratorios que no cuentan con este equipo.
- Para las cepas de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 1525 y *C. dubliniensis* 4 la temperatura a la cual se observaron mejores resultados de producción de clamidoconidias fue a 28 °C, mientras que para *C. dubliniensis* 30 se vio favorecida a 41 °C. El intervalo de tiempo mínimo en el cual se logró una producción considerable de clamidoconidias, fue de 12 h.
- La diferenciación entre las cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, no se logró, debido a que en la producción de clamidoconidias en ambas especies se observaron como únicas terminales y no las múltiples reportadas para *C. dubliniensis*.
- El medio de HALEMi fue el mejor estadísticamente, ya que la eficiencia en cuanto a la producción de clamidoconidias es mayor a 28 y 41 °C, seguido de los medios HALE a 41 °C y Cerelac® y AvLEMi a 28 °C.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Al Mosaid A, Sullivan D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. 2003;41:4787-89.
2. Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Stain agar and Caffeic Acid-Ferric citrate agar. 2001;39:323-27.
3. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 1ª Ed. Editorial Interamericana Mc Graw Hill, México D.F., 1993, pp 223-33.
4. Baker F, Breach M. Manual de técnicas de microbiología médica. Editorial Acribia, S.A.; España 1990, pp 77-88.
5. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 2ª Ed. Méndez-editores, México D. F., 2000, pp 301-29.
6. Diccionario de alimentos. 2ª Ed. Ediciones Celes, México-Barcelona 1984, pp 85-94, 389-92, 430-49, 627-30.
7. Finegold S, Baren E. Diagnostico microbiológico. 7ª Ed. Editorial medica panamericana. Argentina 1996, pp 163-165, 191-193.
8. Gales A, Phaller M, Houston A, Joly S, Sullivan D, Coleman D, Soll D. Identification of *Candida dubliniensis* based of temperature and utilization of xylose and α -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C and Vitek YBC Systems. *J Clin Microbiol* 1999;37:3804-08.
9. García-Hernández MH, Zavalza-Stiker A, Ortiz-Saldivar MB, Castillo-Casanova MM. Producción rápida de clamidoconidios de *Candida albicans* en medios líquidos y diferentes condiciones de incubación. Tesis. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
10. Jawetz E, Brooks G, Morse S, Botel J. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16ª Ed. Editorial El manual moderno, S.A. de C.V.; México D.F. 1999, pp 69-77.

11. Jitsuron S, Kiamsiri S, Pattararangrong N. New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1993; 123:95-98.
12. Martín-Mazuelos E, Canton-Lacasa E, Espinel-Ingrot A. Antifúngicos Otros métodos para el estudio de la sensibilidad de antifúngicos. En: Pemán, Martín-Mazuelos E, Rubio MC (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao. *Rev Iberoam Micol* 2001; 16.1-16.9.
13. Mendoza V, Sánchez M. Análisis y difusión de resultados científicos. 1ª Ed. Facultad de estudios superiores Zaragoza, UNAM, México, 2001, pp 5-21.
14. Mesa L, Arcaya N, Cañas O, Machado Y, Calvo B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol* 2004;21:135-38.
15. Moran G, Sullivan D, Henman M, McCreary C, Harrington B, Shanley D, Coleman D. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:617-23.
16. Mosca C, Moragues M, Llovo J, Al Mosaid A, Coleman D, Pontón J. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. 2003;41:1259-62.
17. Nakamoto S. Promotion of chlamydoconidium formation in *Candida albicans* by corn meal broth incubation. *Med Mycol* 1998; 36:123-125.
18. Pinjon E, Sullivan D, Salkin D, Shanley D, Coleman D. Simple inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2093-95.
19. Ramírez R, et.al. Manual de practicas de Microbiología general. Facultad de Química, UNAM. México D.F., 2001, pp 60-227.

-
20. Remington J et. al. Farmacia. 2ª Ed. Tomo 1. Editorial medica panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2003, pp 1206-7.
 21. Sant'Ana P, Pípolo E, Archimedes D, Lopes A. *Candida dubliniensis* identification in brazilian yeast stock collection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:533-38.
 22. Spiegel M. Estadística. 1ª Ed. Mc Graw Hill, U.S.A., 1970, pp 203-6, 345.
 23. Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 1999;42:521-24.
 24. Staib P, Morschhäuser J. Liquid growth conditions for abundant chlamydospore formation in *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 2005;48:50-4.
 25. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36:329-34.
 26. Sullivan D, Westerneng T, Haynes K, Bennett D, Coleman D. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis an HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995;141:1507-21.
 27. Zavalza-Stiker A, Ortiz-Saldivar B, García-Hernández M, Castillo Casanova M, Bonifaz A. Rapid production of *Candida albicans* chlamydospores in liquid media under various incubation conditions. *Japan J Med Mycol* 2006. In press.
 28. <http://www.zonadiet.com/bebidas/leche.htm>

Anexo I

ANEXO I.a. Comparación estadística de las cepas

Cálculo de concordancia, sensibilidad, especificidad, valores predictivos (positivo y negativo).

Prueba 1. Medio: HALEMi

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 4 positivos, 5 negativos

B) *Candida albicans* 1525: 7 positivos, 2 negativos

Concordancia: 4 positivos, 2 negativos

		A		
		+	-	
B	+	4	3	7
	-	0	2	2
		4	5	9

$$P_o = \frac{4+2}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{4+3}{9} \right) \left(\frac{4+0}{9} \right) + \left(\frac{3+2}{9} \right) \left(\frac{0+2}{9} \right) = \mathbf{0.469}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.469}{1 - 0.469} = \mathbf{0.372}$$

$$S = \frac{a}{a+c} = \frac{4}{4} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$E = \frac{d}{b+d} = \frac{2}{5} = \mathbf{0.4 = 40\%}$$

$$VPP = \frac{a}{a+b} = \frac{4}{7} = \mathbf{0.6 = 60\%}$$

$$VPN = \frac{d}{c+d} = \frac{2}{2} = \mathbf{1 = 100\%}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 4 positivos, 5 negativos

B) *Candida dubliniensis* 4: 7 positivos, 2 negativos

Concordancia: 4 positivos, 2 negativos

		A		
		+	-	
B	+	4	3	7
	-	0	2	2
		4	5	9

$$P_o = \frac{4+2}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{4+3}{9} \right) \left(\frac{4+0}{9} \right) + \left(\frac{3+2}{9} \right) \left(\frac{0+2}{9} \right) = \mathbf{0.469}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.469}{1 - 0.469} = \mathbf{0.372}$$

$$S = \frac{a_{.}}{a+c} = \frac{4}{4} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$E = \frac{d_{.}}{b+d} = \frac{2}{5} = \mathbf{0.4 = 40\%}$$

$$VPP = \frac{a_{.}}{a+b} = \frac{4}{7} = \mathbf{0.6 = 60\%}$$

$$VPN = \frac{d_{.}}{c+d} = \frac{2}{2} = \mathbf{1 = 100\%}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 4 positivos, 5 negativos

B) *Candida dubliniensis* 30: 8 positivos, 1 negativos

Concordancia: 4 positivos, 1 negativo

		A		
		+	-	
B	+	4	4	8
	-	0	1	1
		4	5	9

$$P_o = \frac{4+1}{9} = \frac{5}{9} = \mathbf{0.556}$$

$$P_e = \left(\frac{4+4}{9} \right) \left(\frac{4+0}{9} \right) + \left(\frac{0+1}{9} \right) \left(\frac{4+1}{9} \right) = \mathbf{0.457}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.556 - 0.457}{1 - 0.457} = \mathbf{0.182}$$

$$S = \frac{a_{.}}{a+c} = \frac{4}{4} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$E = \frac{d_{.}}{b+d} = \frac{1}{5} = \mathbf{0.2 = 20\%}$$

$$VPP = \frac{a_{.}}{a+b} = \frac{4}{7} = \mathbf{0.5 = 50\%}$$

$$VPN = \frac{d_{.}}{c+d} = \frac{1}{1} = \mathbf{1 = 100\%}$$

Prueba 1. Medio: HALE

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 9 positivos, 0 negativos

B) *Candida albicans* 1525: 4 positivos, 5 negativos

Concordancia: 4 positivos

		A		
		+	-	
B	+	4	0	4
	-	5	0	5
		9	0	9

$$P_o = \frac{4+0}{9} = \frac{4}{9} = \mathbf{0.444}$$

$$P_e = \left(\frac{4+0}{9} \right) \left(\frac{4+5}{9} \right) + \left(\frac{5+0}{9} \right) \left(\frac{0+0}{9} \right) = \mathbf{0.444}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.444 - 0.444}{1 - 0.444} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{4}{9} = \mathbf{1} = \mathbf{100\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{0} = \mathbf{---}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{4}{4} = \mathbf{1} = \mathbf{100\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{5} = \mathbf{0}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 9 positivos, 0 negativos

B) *Candida dubliniensis* 4: 6 positivos, 3 negativos

Concordancia: 6 positivos

		A		
		+	-	
B	+	6	0	6
	-	3	0	3
		9	0	9

$$P_o = \frac{6+0}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{6+0}{9} \right) \left(\frac{6+3}{9} \right) + \left(\frac{3+0}{9} \right) \left(\frac{0+0}{9} \right) = \mathbf{0.667}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.667}{1 - 0.667} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{6}{6} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{3} = \mathbf{0}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 9 positivos, 0 negativos

B) *Candida dubliniensis* 30: 9 positivos, 0 negativos

Concordancia: 9 positivos

		A		
		+	-	
B	+	9	0	9
	-	0	0	0
		9	0	9

$$P_o = \frac{9+0}{9} = \frac{9}{9} = 1$$

$$P_e = \left(\frac{9+0}{9} \right) \left(\frac{9+0}{9} \right) + \left(\frac{0+0}{9} \right) \left(\frac{0+0}{9} \right) = 1$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{1 - 1}{1 - 1} = 0$$

$$S = \frac{a_{.}}{a+c} = \frac{9}{9} = 1 = 100\%$$

$$E = \frac{d_{.}}{b+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

$$VPP = \frac{a_{.}}{a+b} = \frac{9}{9} = 1 = 100\%$$

$$VPN = \frac{d_{.}}{c+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

Prueba 2. Medio: CTw

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 6 positivos, 3 negativos

B) *Candida albicans* 1525: 9 positivos, 0 negativos

Concordancia: 6 positivos

		A		
		+	-	
B	+	6	3	9
	-	0	0	0
		6	3	9

$$P_o = \frac{6+0}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{6+3}{9} \right) \left(\frac{6+0}{9} \right) + \left(\frac{0+0}{9} \right) \left(\frac{3+0}{9} \right) = \mathbf{0.667}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.667}{1 - 0.667} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{6}{9} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{3} = \mathbf{0}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{0} = \mathbf{---}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 6 positivos, 3 negativos

B) *Candida dubliniensis* 4: 9 positivos, 0 negativos

Concordancia: 6 positivos

		A		
		+	-	
B	+	6	3	9
	-	0	0	0
		6	3	9

$$P_o = \frac{6+0}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{6+3}{9} \right) \left(\frac{6+0}{9} \right) + \left(\frac{0+0}{9} \right) \left(\frac{3+0}{9} \right) = \mathbf{0.667}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.667}{1 - 0.667} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{6}{6} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{3} = \mathbf{0}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{0} = \mathbf{---}$$

Prueba 2. Medio: HALEMi

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 9 positivos, 0 negativos

B) *Candida albicans* 1525: 6 positivos, 3 negativos

Concordancia: 6 positivos

		A		
		+	-	
B	+	6	0	6
	-	3	0	3
		9	0	9

$$P_o = \frac{4+0}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{6+0}{9} \right) \left(\frac{6+3}{9} \right) + \left(\frac{3+0}{9} \right) \left(\frac{0+0}{9} \right) = \mathbf{0.667}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.667}{1 - 0.667} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{6}{6} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{3} = \mathbf{0}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 9 positivos, 0 negativos

B) *Candida dubliniensis* 4: 9 positivos, 0 negativos

Concordancia: 9 positivos

		A		
		+	-	
B	+	9	0	9
	-	0	0	0
		9	0	9

$$P_o = \frac{9+0}{9} = \frac{9}{9} = 1$$

$$P_e = \left(\frac{9+0}{9} \right) \left(\frac{9+0}{9} \right) + \left(\frac{0+0}{9} \right) \left(\frac{0+0}{9} \right) = 1$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{1 - 1}{1 - 1} = 0$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{9}{9} = 1 = 100\%$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{9}{9} = 1 = 100\%$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 9 positivos, 0 negativos

B) *Candida dubliniensis* 30: 1 positivos, 8 negativos

Concordancia: 1 positivo

		A		
		+	-	
B	+	1	0	1
	-	8	0	8
		9	0	9

$$P_o = \frac{9+0}{9} = \frac{1}{9} = \mathbf{0.111}$$

$$P_e = \left(\frac{1+0}{9} \right) \left(\frac{1+8}{9} \right) + \left(\frac{8+0}{9} \right) \left(\frac{0+0}{9} \right) = \mathbf{0.111}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.000 - 0.111}{1 - 0.111} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a_{.}}{a+c} = \frac{1}{9} = \mathbf{0.1 = 10\%}$$

$$E = \frac{d_{.}}{b+d} = \frac{0}{0} = \text{---}$$

$$VPP = \frac{a_{.}}{a+b} = \frac{1}{1} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$VPN = \frac{d_{.}}{c+d} = \frac{0}{8} = \mathbf{0}$$

Prueba 2. Medio: HALE

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 4 positivos, 5 negativos

B) *Candida albicans* 1525: 7 positivos, 2 negativos

Concordancia: 3 positivos, 1 negativo

		A		
		+	-	
B	+	3	4	7
	-	1	1	2
		4	5	9

$$P_o = \frac{3+1}{9} = \frac{4}{9} = \mathbf{0.444}$$

$$P_e = \left(\frac{3+4}{9} \right) \left(\frac{3+1}{9} \right) + \left(\frac{1+1}{9} \right) \left(\frac{4+1}{9} \right) = \mathbf{0.469}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.444 - 0.469}{1 - 0.469} = -\mathbf{0.046}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{3}{4} = \mathbf{0.75 = 75\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{1}{5} = \mathbf{0.2 = 20\%}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{3}{7} = \mathbf{0.4 = 40\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{1}{2} = \mathbf{0.5 = 50\%}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 4 positivos, 5 negativos

B) *Candida dubliniensis* 4: 5 positivos, 4 negativos

Concordancia: 2 positivos, 2 negativos

		A		
		+	-	
B	+	2	3	5
	-	2	2	4
		4	5	9

$$P_o = \frac{2+2}{9} = \frac{4}{9} = \mathbf{0.444}$$

$$P_e = \left(\frac{2+3}{9} \right) \left(\frac{2+2}{9} \right) + \left(\frac{2+2}{9} \right) \left(\frac{3+2}{9} \right) = \mathbf{0.494}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.444 - 0.494}{1 - 0.494} = \mathbf{-0.098}$$

$$S = \frac{a_{.}}{a+c} = \frac{2}{4} = \mathbf{0.5 = 50\%}$$

$$E = \frac{d_{.}}{b+d} = \frac{2}{5} = \mathbf{0.4 = 40\%}$$

$$VPP = \frac{a_{.}}{a+b} = \frac{2}{5} = \mathbf{0.4 = 40\%}$$

$$VPN = \frac{d_{.}}{c+d} = \frac{2}{4} = \mathbf{0.5 = 50\%}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 4 positivos, 5 negativos

B) *Candida dubliniensis* 30: 5 positivos, 4 negativos

Concordancia: 1 positivo, 1 negativo

		A		
		+	-	
B	+	1	4	5
	-	3	1	4
		4	5	9

$$P_o = \frac{1+1}{9} = \frac{2}{9} = \mathbf{0.222}$$

$$P_e = \left(\frac{1+4}{9} \right) \left(\frac{1+3}{9} \right) + \left(\frac{3+1}{9} \right) \left(\frac{4+1}{9} \right) = \mathbf{0.494}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.222 - 0.494}{1 - 0.494} = \mathbf{-0.537}$$

$$S = \frac{a_{.}}{a+c} = \frac{1}{4} = \mathbf{0.25 = 25\%}$$

$$E = \frac{d_{.}}{b+d} = \frac{1}{5} = \mathbf{0.2 = 20\%}$$

$$VPP = \frac{a_{.}}{a+b} = \frac{1}{5} = \mathbf{0.2 = 20\%}$$

$$VPN = \frac{d_{.}}{c+d} = \frac{1}{4} = \mathbf{0.25 = 25\%}$$

Prueba 2. Medio: AvLEMi

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 6 positivos, 3 negativos

B) *Candida albicans* 1525: 6 positivos, 3 negativos

Concordancia: 4 positivos, 1 negativo

		A		
		+	-	
B	+	4	2	6
	-	2	1	3
		6	3	9

$$P_o = \frac{4+1}{9} = \frac{5}{9} = \mathbf{0.556}$$

$$P_e = \left(\frac{4+2}{9} \right) \left(\frac{4+2}{9} \right) + \left(\frac{2+1}{9} \right) \left(\frac{2+1}{9} \right) = \mathbf{0.556}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.556 - 0.556}{1 - 0.556} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{4}{6} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{1}{3} = \mathbf{0.3 = 30\%}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{4}{6} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{1}{3} = \mathbf{0.3 = 30\%}$$

A) *Candida albicans* ATCC 90028: 6 positivos, 3 negativos

B) *Candida dubliniensis* 4: 9 positivos, 0 negativos

Concordancia: 6 positivos

		A		
		+	-	
B	+	6	3	9
	-	0	0	0
		6	3	9

$$P_o = \frac{6+0}{9} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.667}$$

$$P_e = \left(\frac{6+3}{9} \right) \left(\frac{6+0}{9} \right) + \left(\frac{0+0}{9} \right) \left(\frac{3+0}{9} \right) = \mathbf{0.667}$$

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{0.667 - 0.667}{1 - 0.667} = \mathbf{0}$$

$$S = \frac{a.}{a+c} = \frac{6}{6} = \mathbf{1 = 100\%}$$

$$E = \frac{d.}{b+d} = \frac{0}{3} = \mathbf{0}$$

$$VPP = \frac{a.}{a+b} = \frac{6}{9} = \mathbf{0.7 = 70\%}$$

$$VPN = \frac{d.}{c+d} = \frac{0}{0} = \mathbf{---}$$

Criterios de Fleiss para la interpretación de κ

0.75 – 1.00	Muy buena concordancia, no debida al azar
0.50 – 0.74	Buena, adecuada concordancia más grande que la debida al azar
0.00 – 0.49	Inadecuada, puede ser debida al azar
< 0	Menos que la debida al azar

ANEXO I.b. Comparación estadística de los medios de cultivo. Cálculo de χ^2

	1	2	3	...	n
Frecuencia observada	o_1	o_2	o_3		o_n
Frecuencia esperada	e_1	e_2	e_3		e_n

$$\chi^2 = \frac{(o_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(o_2 - e_2)^2}{e_2} + \frac{(o_3 - e_3)^2}{e_3} + \dots + \frac{(o_n - e_n)^2}{e_n}$$

Prueba 1

Medio: CTw

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} = 27$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 < \chi^2_{\text{calc}} = 27$$

Medio: HALEMi

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	0	0	0	0	1	1	2	1	0
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(2-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} = 19.32$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 > \chi^2_{\text{calc}} = 19.32$$

Medio: HALE

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(2-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} = 10.99$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 > \chi^2_{\text{calc}} = 10.99$$

Medio: AvLEMi

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} = 27$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 < \chi^2_{\text{calc}} = 27$$

Prueba 2

Medio: CTw

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	1	0	0	1	2	2	1	0.5	0
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(2-3)^2}{3} + \frac{(2-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(0.5-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} = 15.73$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 > \chi^2_{\text{calc}} = 15.73$$

Medio: HALEMi

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	1	1	1	1	3	1	2	2	3
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(3-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(2-3)^2}{3} + \frac{(2-3)^2}{3} + \frac{(3-3)^2}{3} = 7.31$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 > \chi^2_{\text{calc}} = 7.31$$

Medio: HALE

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} = 21.82$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 < \chi^2_{\text{calc}} = 21.82$$

Medio: AvLEMi

	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Frecuencia observada	1	0	0	0	1	1	0	0	0.5
Frecuencia esperada	3	3	3	3	3	3	3	3	3

$$\chi^2 = \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(1-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0-3)^2}{3} + \frac{(0.5-3)^2}{3} = 19.23$$

Valor crítico para $\chi^2_{0.99}$ con $v = k-1 = 9-1 = 8$, es 20.1

$$\chi^2_{\text{tab}} = 20.1 > \chi^2_{\text{calc}} = 19.23$$