



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN II NORESTE DEL DISTRITO FEDERAL
U.M.A.E. GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"**

**EVALUACIÓN DEL MEDIO CHROMAGAR CAN 2 PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE LEVADURAS DE INTERÉS CLÍNICO, EN DIFERENTES ESPECÍMENES
BIOLÓGICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA**

P R E S E N T A

DRA. CAROLINA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

ASESORA DE TESIS:

**Q.F.B. MARÍA DEL SOCORRO MÉNDEZ TOVAR
M EN C. GUADALUPE CARRILLO MONTES**



MÉXICO, DISTRITO FEDERAL, 2010



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.

DEDICATORIA.

*Este trabajo de tesis es dedicado a mi Familia, a mi esposo **Alejandro García**, por estar siempre conmigo, apoyarme incondicionalmente y por estar unidos siempre, por el enorme sacrificio que ha hecho para permitirme estar en otro estado, y de esta manera continuar con mis estudios, a mi hija **Camila Alejandra** a la cuál amo inmensamente, por la cual se ha hecho este sacrificio tan grande. A mis Padres **María Ignacia y Pedro Hernández** quien han sido pilares de nuestras vidas, apoyándonos siempre, tomando a mi hija entre sus manos como si fuera suya, les agradezco todo su esfuerzo y sacrificio por sus hijos, A mis hermanos **Alejandro y Macaria** que también me han apoyado incondicionalmente. Familia los amo y gracias por todo.*

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco la colaboración de los químicos del laboratorio central del hospital general Dr. Gaudencio González Garza, específicamente a los químicos Rocío Castellanos, Carlós Vite, Verónica Toledo, Velia Matínez quienes me brindaron apoyo, tiempo y experiencia para lograr este trabajo, **Q.F.B. Ma. Del Socorro Méndez y al Q.F.B. Juan Pablo Blanco** les agradezco su entrega a la investigación, su apoyo incondicional y el enorme esfuerzo para lograr este proyecto, a la **Doctora Guadalupe Carrillo** titular de la especialidad que con su experiencia guío mis pasos, y dedicar horas de enseñanza para la elaboración de esta tesis. A mis compañeras Nohemí por estar siempre conmigo y compartir su experiencia, al Doctor Pedro Guerra por su apoyo en la estadística tarea sumamente difícil que no se hubiera logrado sin su presencia y por último pero no menos importante a la **Dra. Rita Gutiérrez** factor fundamental y elemento principal que introdujo en mí el gusto por el conocimiento de las levaduras.

TÉSIS APROBADA POR:

DRA. LUZ ARCELIA CAMPO NAVARRO
DIRECTORA DE EDUCACION E INVESTIGACIÓN EN SALUD.
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA

DRA. NOHEMÍ PATRICIA CASTILLO TORRES
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA
CLÍNICA.
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XX1

M. En C. MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES
JEFE DE LABORATORIO HOSPITAL DE GINECOLOGÍA# 3
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA
CLÍNICA. ASESOR DE TESIS.

Q.F.B. MARÍA DEL SOCORRO MENDEZ TOVAR
JEFE DE SECCIÓN LABORATORIO CENTRAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD DR. GAUDENCIO GÓNZALEZ
GARZA. ASESOR DE TESIS.

ALUMNO:
CAROLINA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

INDICE

Dedicatoria	1
Agradecimientos	2
Hoja de Firmas	3
Resumen	6
II. Antecedente	7
III. Planteamiento del problema	11
IV. Justificación	12
V. Hipótesis	14
VI. Objetivos	15
6.1. Objetivo General	15
6.2. Objetivos Específico	15
VII. MATERIAL Y METODO.	16
7.1. Lugar de estudio	16
7.2. Tipo y Diseño de Estudio	16
7.3. Criterios de selección	16
7.4. Tamaño de la Muestra	16
7.5. Variable dependiente e independiente	17
7.6. Diseño general del estudio	19
7.7. Análisis estadístico	19
7.8. Aspectos Éticos	19

7.9. Recursos financieros	21
7.10. Factibilidad	21
VIII. Cronograma	22
XI.-resultados	23
XII anexos	24
XI.- Discusión	28
XII.- Conclusiones	29
XIII. Bibliografía	30

RESUMEN.

ANTECEDENTES. La incidencia de las infecciones fúngicas es importante debido que se presentan en un medio hospitalario y ambulatorio, que en su mayoría son provocados por hongos del género *Candida*, siendo la especie *albicans* una de las más frecuentes, sin embargo debido al uso de terapias invasivas (de material protésico), generación de nuevos tratamientos antifúngicos, así como otros factores modifican las características de las especies de *Candida*, lo que ha permitido una variación en la distribución global y geográfica de las especies de *Candida sp*, modificando el curso clínico de la enfermedad en forma importante, su identificación oportuna apoya y orienta al clínico para conocer la especie de *Candida* involucrada, y de esta manera elegir oportunamente el antifúngico adecuado.

Objetivo. Identificar la sensibilidad y especificidad del medio cromogénico *CHROMagar Candida CAN2*, con respecto a la metodología convencional y por Vitek, evaluando la concordancia entre ambas técnicas para identificación diagnóstica de levaduras del género *Candida* en diferentes especímenes biológicos.

Material y Métodos: El estudio de Prueba diagnóstica transversal prospectivo que se llevó a cabo en la Unidad Médica de alta especialidad (UMAE) Centro Médico la “Raza”, con la identificación de *Candida* y sus diferentes especies, con el *CHROMagar Candida (Can2)* comparando *Vitek 2 API II* como estándar de oro. El *CHROMagar Candida* utiliza una hidrólisis específica de sustrato cromógeno para la identificación y una segunda hidrólisis que producirá las diferentes tonalidades.

Resultados. Se estudiarán 160 muestras, de pacientes externos y hospitalizados de todos los servicios del hospital general, El resultado del *chromagar* es que se obtuvo una sensibilidad del 100% para todas las especies candida, sin embargo la especificidad que varía desde 96.66 al 100% , VPP que varía de 100%- 97.72, VPN100%, exactitud de 100%-98.12%.

Conclusiones. La prueba de *Chromagar candida* tiene buena especificidad y sensibilidad, permitiendo reducir el tiempo de identificación resultando un buen método diagnóstico.

Palabras clave: Candida, Chromagar, vitek, especies de Candida?

II.-ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.

Durante las últimas décadas, el incremento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, y se ha relacionado con pacientes inmunocomprometidos, el uso de antimicrobianos de amplio espectro, medicamentos inmunosupresores, maniobras diagnósticas invasivas, alimentación parenteral, cirugía abdominal, trasplante de órganos y uso de dispositivos médicos (1, 2,3).

El género *Candida* es altamente responsable de la mayoría de las enfermedades,(4,5) ocupan el cuarto lugar entre los agentes de infecciones sistémicas y cerca del 80% de las infecciones fúngicas(2,6) la especie *albicans* es la más frecuente,(4,5) quien ha sido reemplazada en un 35% por otras especies de *Candida sp*, (6) para infecciones nosocomiales (2,6).

Diferentes especies de *Candida sp*, producen una amplia variedad de enfermedades, desde infecciones mucocutáneas leves hasta formas diseminadas graves (7). Las infecciones fúngicas sistémicas representan un desafío cada vez mayor debido al aumento en el número, y en las tasas de mortalidad. (5)Esta variabilidad de las especies de *Candida*, en las diferentes regiones geográficas e incluso en los diferentes sitios anatómicos, provoca un desafío para el manejo infeccioso (8)

El género *Candida* pertenece a la familia *Criptococcaceae* dentro del orden *Deuteromycota* (hongos imperfectos), compuesto por más de 200 especies, con hábitat natural ubicuo, muchas de estas forman parte de nuestra flora normal de la piel, tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio,(2,9) sin embargo, se ha descrito su asociación con enfermedad. *Candida albicans* se involucra con el 60-80 % de las enfermedades causadas por levaduras,

cada vez se describen con mayor frecuencia otras especies de *Candida* (10)) causantes del 10% de las enfermedades en humanos, que incluyen *Candida parapsilosis*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, *guilliermondi* y *lusitaniae* (2,6). Es necesario diferenciarlas porque algunas especies son intrínsecamente resistentes a los azoles, y otras pueden hacerse resistentes durante el tratamiento, lo que justifica la existencia de un diagnóstico rápido y preciso. (11)

Los principales factores de virulencia asociada a *Candida*, se relacionan con su dimorfismo, secreción de enzimas, cambios de fenotipo, expresión diferencial de genes con respecto al ambiente, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biopelículas. (12)

El diagnóstico etiológico de estas infecciones desde el punto de vista clínico, es muy difícil, debido fundamentalmente a la ausencia de síntomas característicos, (2) por lo cual hay que recurrir al diagnóstico microbiológico. La gravedad, mortalidad y resistencia fúngica hace necesario implementar una técnica que permita una discriminación eficaz en un periodo de tiempo corto y que sea accesible para el laboratorio como método de elección. Habitualmente las levaduras se identifican por métodos más costosos, complicados y con mayor tiempo de proceso.

Con el uso de material protésico y quirúrgico se ha visto incrementada la incidencia de algunas otras especies del género *Candida*, su identificación rápida nos orienta en la evolución y a proporcionar un tratamiento efectivo y oportuno (2), por ejemplo la *Candida parapsilosis* se encuentra relacionada con la presencia de dispositivos médicos (catéteres). (13)

El diagnóstico de candidiasis se basa en diversas técnicas de laboratorio entre las que se encuentran: el examen directo con KOH, la tinción de Gram, el aislamiento en medio de Sabouraud o micobiótico, la filamentación en plasma (tubos germinales), la producción de

clamidoconidias, pruebas bioquímicas y fisiológicas como el auxonograma, zimograma y la producción de ureasa ^(6,14).

Con estas técnicas no se diferencian muchas de las especies patógenas que actualmente se reportan en todo el mundo. Nuevos medios de cultivos adicionados de sustratos cromogénicos que a partir de actividad enzimática permiten la identificación, presuntiva de distintas especies, en función de la coloración, textura y morfología de las colonias en 24 a 48 horas, por lo cual la identificación con esta metodología ayuda a disminuir el tiempo de aislamiento e identificación. Estos métodos también se conocen como medios diferenciales (12). El *CHROMagar (CAN2)* es un medio de cultivo cromógeno usado como un medio de aislamiento e identificación primaria de levaduras en general, en diferentes especímenes biológicos. Pedro García y-Martos compara el comportamiento de este método diagnóstico frente a otro tipo de levaduras, encontrándose diferencias importantes en la coloración, *Cryptococcus* y sus especie (lila-a rosa intenso, *Geotrichum* (blanco-rosa azulado), *Pichia* (cremosa), *Rhodotorula* (rojo- salmón naranja) *Trichosporum* (turquesa). Con una precisión que varía entre el 96-98%, cerca del 100% de los métodos convencionales (15).

En 1994 Odds y Bernaerts describieron el *CHROMagar Candida* como un nuevo medio de cultivo para el aislamiento y la posible identificación de levaduras con importancia clínica en micología médica en un periodo de 24h a 48 hrs, con base en un amplio contraste de colores en las colonias. El método permite, además la identificación de múltiples especies en una muestra, más fácilmente que un medio micológico normal ⁽¹⁶⁾.

Muchas de las especies son difíciles de diferenciar por métodos convencionales (17), El *CHROMagar Candida*, nos ayuda en la identificación, usando cloruro de agar Sabouraud (rojo color pálido y distintos tonos de rosa), además de la combinación con sales de bismuto

del Biggy (lo que les da luz , color beige, marrón al color negro). Existen otros medios que utilizan azul de anilina o ácido fosfomolibdico para identificación específica de *Candida albicans* (18), la mezcla de estos productos nos ayudan a la fácil identificación de las diferentes especies que por su metabolismo reaccionan a los diferentes productos, poniendo de manifiesto la actividad enzimática la cual se hace evidente por medio de colores; incluso permitiendo una discriminación entre las distintas especies presentes en cultivos mixtos (18). Esto justifica el uso del *CHROMagar Candida* ya que además de ser un diagnóstico rápido, es un método económico, accesible y de fácil manejo.

Ballesté y su grupo (19) y Yücesoy y Marol (20) reportaron para el *CHROMagar Candida* sensibilidad de 88 a 99% y especificidad de 96% a 100% para las cepas de *Candida albicans*. Para las cepas no *albicans* el método tuvo sensibilidad de 90% a 96% y especificidad de 88% a 100%, García Martos y su grupo describieron que la sensibilidad y la especificidad fueron superiores a 97% para el conjunto de las cepas aisladas de *Candida sp*, y de 100% *Candida albicans* y *Candida tropicales* en ambos parámetros de 97.3 y 99% *Candida glabrata*, de 92.3 y 99.6% para *Candida krusei* y de 90.3 y 99.6% *Candida parapsilosis* (21).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad la primer causa de muerte en México es por padecimientos infecciosos, de los cuáles el cuarto lugar es producida por hongos, siendo el más común la Especie *Candida albicans*. En el Hospital General Dr. “Gaudencio González Garza”, se atiende a población en las diversas especialidades, como son: Hematología , Oncología, Nefrología, Neonatología y Unidad de Trasplante, por lo que los pacientes tienden a permanecer con terapias, antimicrobianas de amplio espectro por periodos prolongados, y maniobras invasivas lo que los hace susceptibles de adquirir infecciones oportunistas, como son, las provocadas por *Candidas albicans* así como se ha visto un incremento de *Candida sp*. Esto ocasiona una alta morbi-mortalidad debido a la no respuesta del uso de antifúngicos azólicos, por lo cual es importante diagnosticar oportunamente la especie de *Candida*, ya que se ha documentado resistencia de algunas especies a los azoles, y mayor agresividad. El poder discriminar de una especie de *Candida albicans*, de una *Candida sp*, nos orienta sobre la evolución de la enfermedad y sobre el tratamiento que se debe otorgar de forma oportuna.

Sin embargo los métodos diagnósticos utilizados en el Centro Médico de alta Especialidad “La Raza”, cuenta con metodología diagnóstica que tarda 48 horas o más, tiempo vital que se puede reducir con la implementación de una metodología que sea rápida, económica, accesible y que cuente con alta sensibilidad y especificidad para identificar las diversas especies que comprenden el género *Candida*.

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad del CHROMAGAR candida CAN 2?

IV.- JUSTIFICACIÓN.

El incremento de las infecciones fúngicas depende de forma importante del estado inmunológico de los pacientes, y aunque se han descrito más de 200 especies sólo 10 de ellas se han asociado a enfermedad, se ha visto que en más del 80% de los padecimientos es por *Candida albicans*, sin embargo ha incrementado la incidencia de *Candida sp*, esto contribuye a un cuadro clínico con mayores complicaciones, por lo cual es necesario conocer el tipo de especie ya que algunas son intrínsecamente resistente a los azóles, incrementado la morbi-mortalidad de los pacientes. El otorgar un diagnóstico rápido y preciso, ayuda al tratamiento favoreciendo a la evolución del paciente. La gravedad, mortalidad y resistencia fúngica hace necesario implementar una técnica que permita una discriminación eficaz en un periodo de tiempo corto y que sea accesible para el laboratorio como método de elección. Habitualmente las levaduras se identifican por métodos más costosos, complicados y con mayor tiempo de espera. La reducción del tiempo del diagnóstico es importante debido a que las infecciones producidas por *Candida albicans* y *Candida sp*, en un periodo de neutropenia, pueden evolucionar a un cuadro agudo de candidiasis diseminada, con shock séptico. La identificación de este género en el Hospital General se realiza con metodología de alta tecnología, sin embargo aun el tiempo de espera es de 48 horas o más tiempo. En la mayoría de los laboratorios el diagnóstico se hace de manera convencional, con un periodo de tiempo prolongado, sin discriminar entre las diferentes especies de *Candida*, lo que perjudica importantemente en la evolución del paciente. Por lo que se ha visto la necesidad de que se busque un método accesible con alta especificidad y sensibilidad, que acorte el tiempo de identificación del género *Candida* y las diversas especies que están involucradas en el, que

pueda ser utilizado en los servicios de microbiología de los hospitales para apoyo en el diagnóstico de las infecciones que se sospeche por hongos, disminuyendo el uso de antimicrobianos, tiempo de estancia hospitalaria y la morbi mortalidad.

V.- HIPÓTESIS.

Si el medio cromogénico *CRHOMagar Candida (CAN2)* tiene una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de levaduras, entonces obtendremos un 95% de identificación de las diferentes especies de *Candida*. con relación a la metodología convencional y por Vitek

VI.- OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general

6.1. Identificar la sensibilidad y especificidad del medio cromogénico *CHROMagar Candida CAN2*, con respecto a la metodología convencional y por Vitek, evaluando la concordancia entre ambas técnicas para identificación diagnóstica de levaduras del género *Candida* en diferentes especímenes biológicos.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Evaluar el comportamiento del medio *CHROMagar Candida CAN2* cuando se incluyen levaduras de otros géneros.

6.2.2 Identificar las levaduras en diferentes especímenes biológicos realizando técnica de examen directo con KOH, tinción de Gram, y filamentación en suero.

6.2.3 Realizar identificación de levaduras del género *Candida* especies *albicans* y *no albicans* mediante el procesamiento en Vitek.

6.2.4 Establecer la concordancia diagnóstica entre el medio *CHROMagar Candida CAN2* con respecto a la metodología convencional.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital General Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional “La Raza”. Con 160 especímenes biológicos, que ingresaron al laboratorio central, que salgan positivas para levaduras por diagnóstico microscópico y tinción de Gram.

7.2 Tipo y diseño del estudio

Transversal, descriptivo, prospectivo.

7.3 Criterios de selección

7.3.1 Criterios de inclusión

1).- Todos los especímenes biológicos que resultaron positivos a identificación de levaduras.

7.3.2 Criterios de exclusión

1).- Todos los especímenes biológicos que no se encuentren adecuadamente tomados.

2).- Los especímenes biológicos en los que no se logre identificar levaduras por ningún método diagnóstico convencional.

7.4 Tamaño de la muestra. 150 especímenes (el tamaño de la muestra fue calculado de acuerdo al número de especímenes que corresponden a 249 que llegan al laboratorio clínico para búsqueda de levaduras e identificación de las mismas) y forma de cálculos de muestras, utilizando algoritmos como (nivel de confianza, variabilidad positiva, variabilidad negativa, tamaño de la población y precisión de error)

$$n = Z^2 pqN / NE^2 + Z^2 pq$$

n= tamaño de la muestra

Z= nivel de confianza

P= variabilidad positiva

q= Variabilidad negativa

N= tamaño de la población

E= precisión de error

7.5. DEFINICION CONCEPTUALY OPERACIONAL DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES:

7.5.1.1. *Candida. Definición conceptual.* Organismo micológico del género *Candida* en forma de levadura de reproducción asexual, la cual produce una gama de enfermedades, desde enfermedades mucocúteas leves a formas diseminadas graves con posible participación de cualquier órgano o sistema.

7.5.1.2. *Definición operacional.* Especímenes biológicos que se desarrollen en medios de cultivos como Biggy, Saburoud, y en otros medios de cultivos a los cuales se les realicen tinción de Gram y se observen levaduras al microscopio.

7.5.1.3. *Indicador.* Cualitativa discreta, nominal dicotómica

7.5.1.4. *Escala de medición.* Presente/ausente

VARIABLES DEPENDIENTES.

7.5.2.1. *Definición conceptual. Medio de cultivo Chromagar CAN2.* Solución, medio sólido o incluso semisólido, la cual cuenta con los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar, aislar e identificar microorganismos (bajo condiciones de temperatura y pH), el cual contiene sustancias químicas como cromógeno (sales de bismuto, trifenil tetrazolio, fosfomolibdato),

peptona, glucosa, agar y cloranfenicol que interactúan con las levaduras y su metabolismo otorgando diferentes tonalidades haciéndolo específico y diferencial.

7.5.2.2. *Definición operacional.* Medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial, para levaduras, formado por peptona, cloranfenicol, sustancia pesada o cromógeno, glucosa, agar, elaborado por CAN2,

7.5.2.3. *Indicador.* Cualitativa discreta, nominal, policotómica.

7.5.2.4. *Escala de medición.* Azul pálido a azul oscuro *Candida albicans*, rosa medio *Candida tropicalis*, rosa muy pálido *Candida Lusitaniae* y *Candida kefyri*, blanco-crema sin identificación.

7.5.3. *Sensibilidad. Definición Conceptual.* (Tasa de verdaderos positivos), es la capacidad de una prueba para detectar a los pacientes que realmente se encuentran enfermos.

7.5.3.1. *Definición operacional.* Tasa de verdaderos positivos, capacidad de una prueba para detectar a los pacientes que realmente se encuentren enfermos.

7.5.3.2. *Indicador.* Cuantitativa continúa.

7.5.3.3. *Escala de medición.* Porcentaje

7.5.4. *Especificidad. Definición conceptual.* (Tasa de verdaderos negativos), es la capacidad de una prueba para identificar a los pacientes que no tiene la enfermedad.

7.5.4.1. *Definición operacional.* (Tasa de verdaderos negativos), es la capacidad de una prueba para identificar a los pacientes que no tiene la enfermedad.

7.5.4.2. *Indicador.* Cuantitativa continúa

7.5.4.3. *Escala de Medición.* Porcentaje.

7.6. Descripción general del estudio.

Se analizaron 160 especímenes ingresados en el laboratorio de microbiología, a los que primeramente se sembraron en medios de cultivos como son el agar sangre, chocolate, Mac

Conkey, sabouroud, biggy y manitol, con técnicas de asepsia, utilizando guantes, campo de 30cm con mechero de Bunsen, el estriado se realizó con estría continua, rotando el medio de cultivo, y en cada inoculación quemando el asa, de tal manera de que este también se aisle con mayor facilidad a la levadura, y pueda reaislarse con mayor facilidad, se incuba en un periodo de 24 a 48 horas en incubadora de marca c II a 37GC, una vez desarrollado el microorganismo se verá morfología y crecimiento en los diferentes medios de cultivos, así como se realizó tinción de Gram, se agregó aproximadamente 0.5 a 1 μ g de muestra en un portaobjetos limpio, se fijó aproximadamente 15 segundos con mechero de Bunsen ó se fijó de dos a tres veces a la flama en su porción de color azul, de tal manera que el portaobjetos se perciba caliente a través de los dedos sin que el calor generado llegué a quemar, una vez fijada la muestra se tiñe por 1 min con cristal violeta, se lava la muestra, se agrega solución de iodo por 1 min, se agrega alcohol acetona (formado por alcohol de 90° en un 50% y acetona en un 50%), de esta manera quitar el exceso de colorante además de que permite también junto con la solución de iodo la entrada del siguiente colorante que en el caso de las levadura únicamente fija el cristal violéta, se añade safranina por 1 min, se espera el secado a temperatura ambiente y se observa al microscópio. El microscópio previamente limpio y con la realización de la iluminación de Köeller, se pone el portaobjetos sobre la platina del microscópio, se visualizó primero en objetivo de 10x o seco débil, y posteriormente en objetivo de 100x. Previa colocación de aceite mineral de tal forma que los rayos de luz, permitan la delimitar bien la levadura y su buena visualización.

Una vez que identificamos las muestras como levaduras estas se inoculo en tarjetas de Vitek 2, la tarjeta de identificación de levaduras YST Vitek 2, que realiza identificación automatizada de levaduras y microorganismos similares. La tarjeta de YST es un producto desechable de un solo uso. Existen 46 diferentes test bioquímicos que miden la utilización de fuentes de carbono, utilización de fuentes de nitrógeno y actividades enzimáticas, el diagnóstico definitivo estará al cabo de unas 18 horas. Se debe preparar el inculo a partir de un cultivo puro, en caso de cultivos mixtos es necesario otro paso de aislamiento. Una vez identificada la colonia se transfiere asépticamente 3,0 ml de solución salina estéril (NaCl acuoso al 0.45, -0.5 % y un pH de 4.5 a 7.0) en un tubo de ensaye de plástico transparente poliestireno de 12 a 75 mm. Utilizando un bastoncillo estéril para transferir un número

suficiente de colonias morfológicamente similares al tubo de solución salina, se debe preparar la suspensión homogénea del microorganismo con una densidad equivalente a un patrón Mac Farland de 1,80 a 2,20 utilizando el Vitek densichek calibrado. El tiempo de suspensión no debe superar los 30 min antes de inocular la tarjeta. Colocamos el tubo con la suspensión y la tarjeta YST del cassette. La identificación utiliza metodología basada en las características de los datos y el conocimiento acerca del microorganismo y las reacciones que se analizan, ya que se han estudiado cepas suficientes conocidas como para estimar las reacciones químicas, los microorganismo identificado con esta tarjeta incluye las siguientes especies de *Candida*: *C. albicans*, *boidonni*, *catenulata*, *colliculosa*, *dublinskiensis*, *famata*, *freyschussi*, *glabrata*, *guilliermondi*, *haemoloni*, *incospicua*, *intermedia*, *kefyr*, *krusei*, *lambica*, *lipolytica*, *lusitaniae*, *mongolie*, *membranifaciens*, *norvegensis*, *parapsilosis*, *pelliculosa*, *pulcherrima*, *rugosa*, *sake*, *sphaerica* y *tropicalis*.

Al mismo tiempo se realiza la inoculación de las levaduras identificadas en medios de cultivo cromogénico (*CAN2*), con asa estéril y campo estéril de aproximadamente 30 centímetros de diámetro, el cual se deja en incubación al medio ambiente entre temperaturas que oscilan entre los 18 y 37°C, en un periodo de tiempo de 24 a 48 hrs, posteriormente se realiza la identificación de las diferentes especies de levaduras, por medio de las características morfológicas, textura, y coloración, es importante recalcar que este medio de cultivo permite diferenciar entre medio de cultivos mixtos.

7.7. *Análisis estadístico* Se realizará para cálculo de sensibilidad y especificidad con tablas de 2 x2 calculando VPPN (%), VPPP (%), sensibilidad y especificidad en porcentajes.

7.8. *Aspectos Éticos.*

El siguiente estudio por trabajar con especímenes biológicos no pone en peligro la vida, ni modifica el curso natural de la enfermedad, tendrá por objetivo aportar conocimiento sobre los métodos diagnósticos, así como de las modificaciones en la distribución por rango de edad, sexo, distribución geográfica y anatómica. La participación asegura la confidencialidad de la persona, además de que los procedimientos están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la

declaración de Helsinki ya que se trata de especímenes biológicos. Respeta confidencialidad de los pacientes.

7.9. Recursos Financieros y Factibilidad. Es factible ya que se utilizará insumos y esto no para la identificación de rutina en el servicio de microbiología no representa gasto extra para la Institución. Material utilizado: 1 residente (investigador) , muestras de pacientes levaduras-positivas, placa de Chromagar (CAN2), 1 mechero, asa bacteriológica, marcador de aceite, tubo de ensayo, sol fisiológica al 0.9%, tarjeta YST para levaduras, equipo de Vitek ID2, lápiz, libreta de registro.

7.10 Bioseguridad. Este trabajo es seguro ya que se trabajan con muestras por lo tanto no afecta el curso clínico de una enfermedad, y se cuenta con el material necesario para la protección personal de acuerdo a la NOM 056-SSA1-1998 para protección de los trabajadores de salud.

VIII. CRONOGRAMA.

ACTIVIDADES	MAR	ABRIL	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV
Elaboración del Protocolo.									
Revisión y Autorización por el Comité Local y los Comités Externos.									
Captación y Procesamiento de Muestras.									
Revisión resultados. Análisis Estadístico. Reporte final.									

XI.- RESULTADOS.

Se estudiaron 160 muestras de pacientes ambulatorios y hospitalizados que acudieron a la Unidad Médica de alta especialidad Hospital General Dr. Gaudencio González Garza, las cuales corresponden a muestras de hemocultivos, urocultivo, líquido pleural, bronquial, herida quirúrgica, secreciones y punta de catéter de los diferentes servicios del hospital.

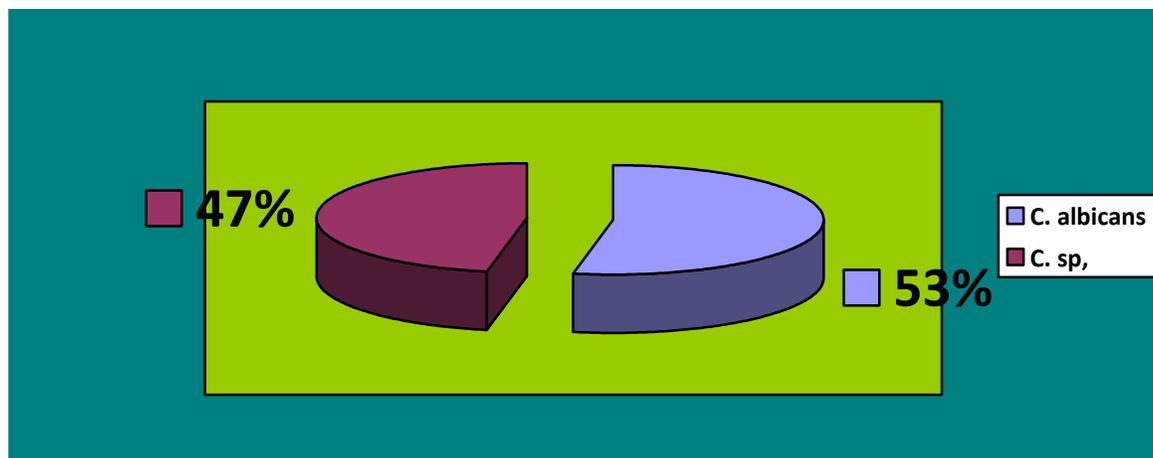
La frecuencia de levaduras del Género *Candida* y sus especies corresponden a: *C. albicans* 53%, *Candida sp* 47%, (ver tabla 1), *C.parapsilosis* 11%, *C. famata* 8%, *C. tropicalis* 7% (ver tabla 2)

Se analizaron por dos métodos; Vitek (estándar de oro) y *Chromagar CAN 2* obteniendo los siguientes resultados: para Vitek encontramos 160 muestras positivas para levaduras del género *Candida* en General, de las cuales 80 corresponden a *C. albicans*, 70 *C. sp*, de estas 17 *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, y 10 negativas para *Candida*; en el *Chromagar*, 81 muestras positivas para *C. albicans*, 17 para *C. parapsilosis*, 12 para *C. famata*, y 11 para *C. tropicalis*. (Ver tabla 3).

Los resultados de las tablas 2x2 para el diferenciación del género *Candida* en el medio *Chromagar* muestran una sensibilidad del 100%, especificidad del 70%, VPP 98.03%, VPN 100%, exactitud 98.12%. (ver tabla 4). Para *Candida albicans*, se encontró una sensibilidad 100%, especificidad 98.76%, VPP 98.76%, VPN 100%, exactitud 98.75, prevalencia 50%. (ver tabla 5). Para *Candida. sp*, la sensibilidad es 100%, especificidad 98%, VPP 97.72%, VPN 100%, exactitud del 99%, prevalencia 43:75%. (Ver tabla 6). Para *Candida parapsilosis* la sensibilidad es del 100%, especificidad 98.60%, VPP 85%, VPN 100%, exactitud 98.75%, prevalencia 10.6%.(ver tabla 7).y *Candida tropicalis* con sensibilidad del 100%, especificidad 100%, VPP 100%, VPN 100%, exactitud 100%, prevalencia 6.87%.

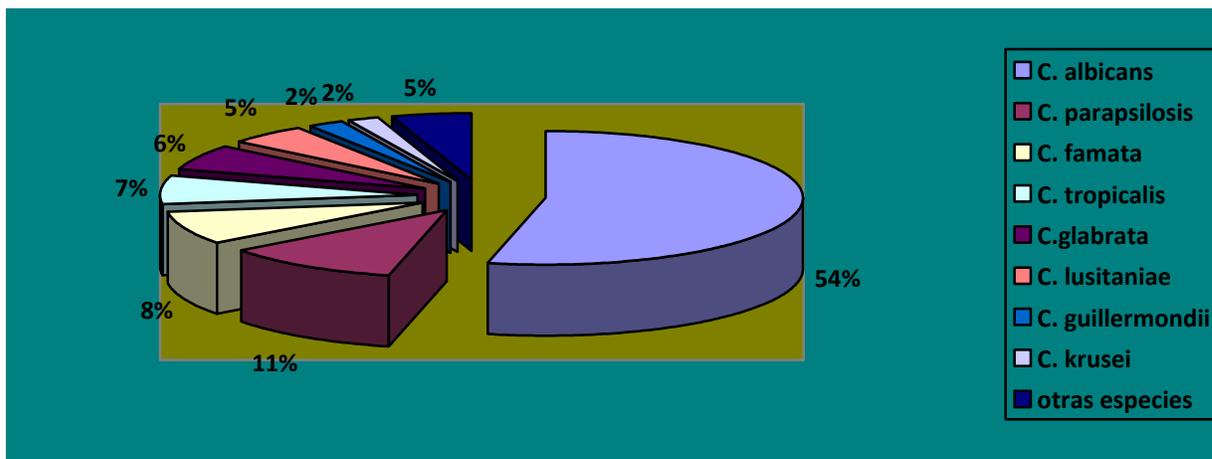
XII. ANEXOS.

1. tabla. Frecuencia de *Candida albicans* y *Candida* sp



Valores dados en porcentaje.

2. tabla Frecuencias de las diferentes especies del género *CANDIDA*.

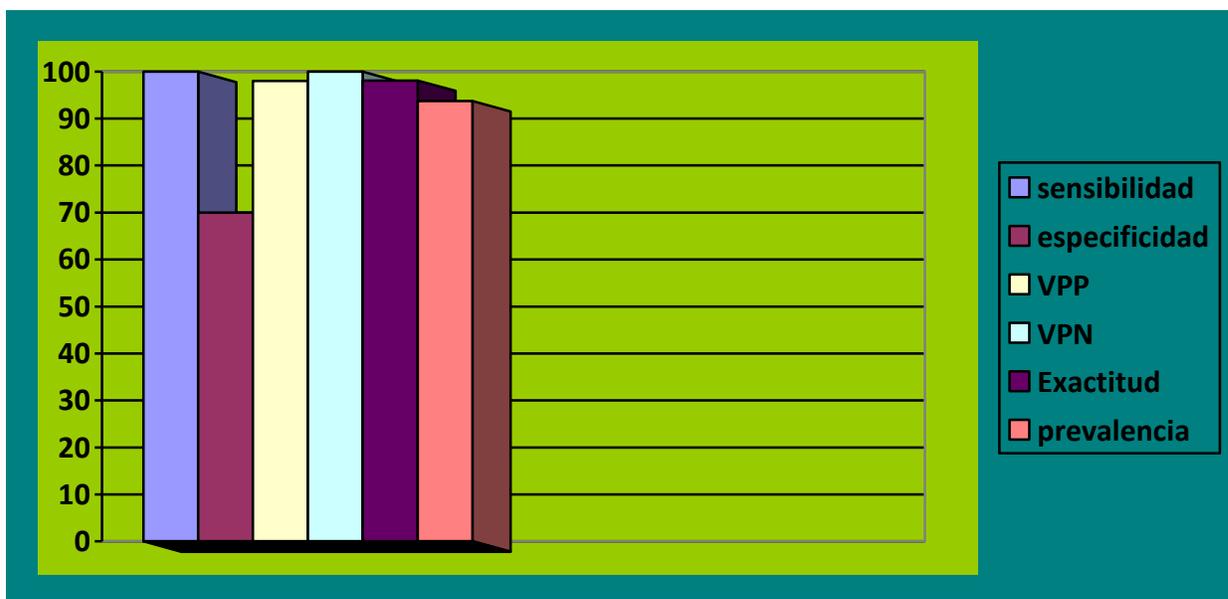


Valores dados en porcentaje

3. Tabla. Resultado identificación Vitek y Chromagar.

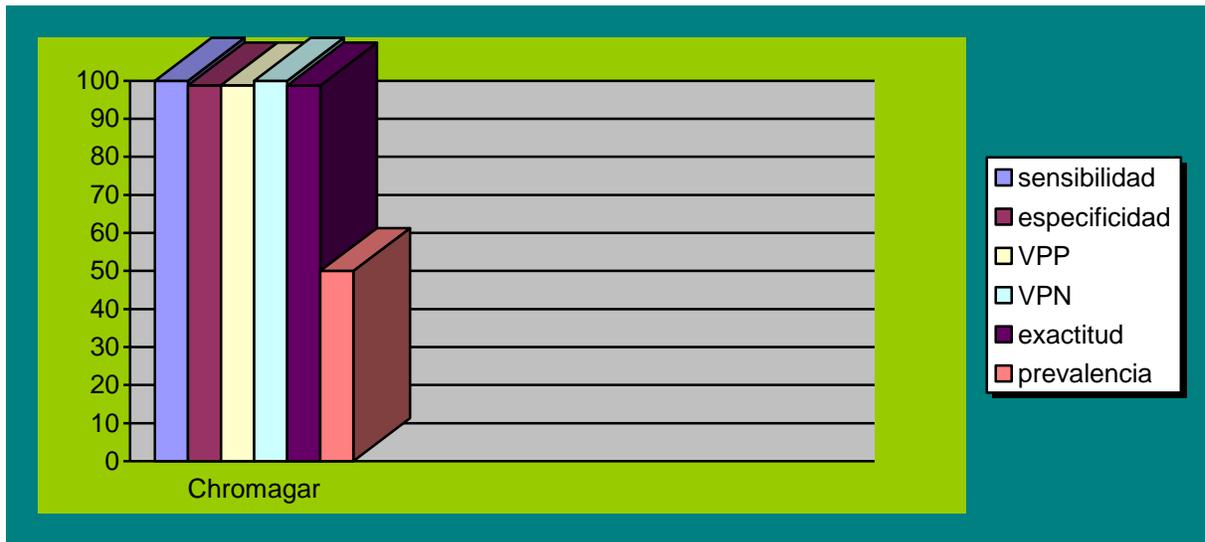
IDENTIFICACIÓN DE LEVEADURAS	VITEK	CHROMAGAR
Género <i>Candida</i>	150	153
<i>C. albicans</i>	80	81
<i>C. sp</i>	70	72
Sin crecimiento	10	3
<i>C. parapsilosis</i>	17	19
<i>C. tropicalis</i>	11	11
<i>C. famata</i>	12	14

4.- Tabla Resultados del CHROMAGAR para diagnóstico de levaduras del género *Candida*.



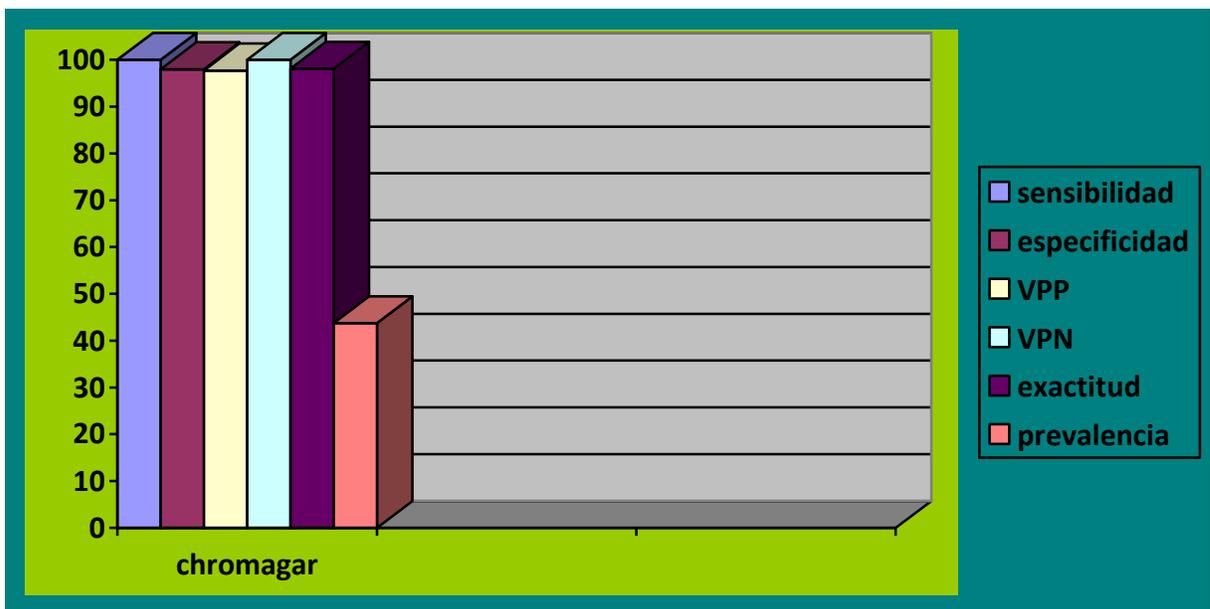
Valores dados en porcentajes.

5. Tabla. Resultados CHROMAGAR para diagnóstico de *Candida albicans*.



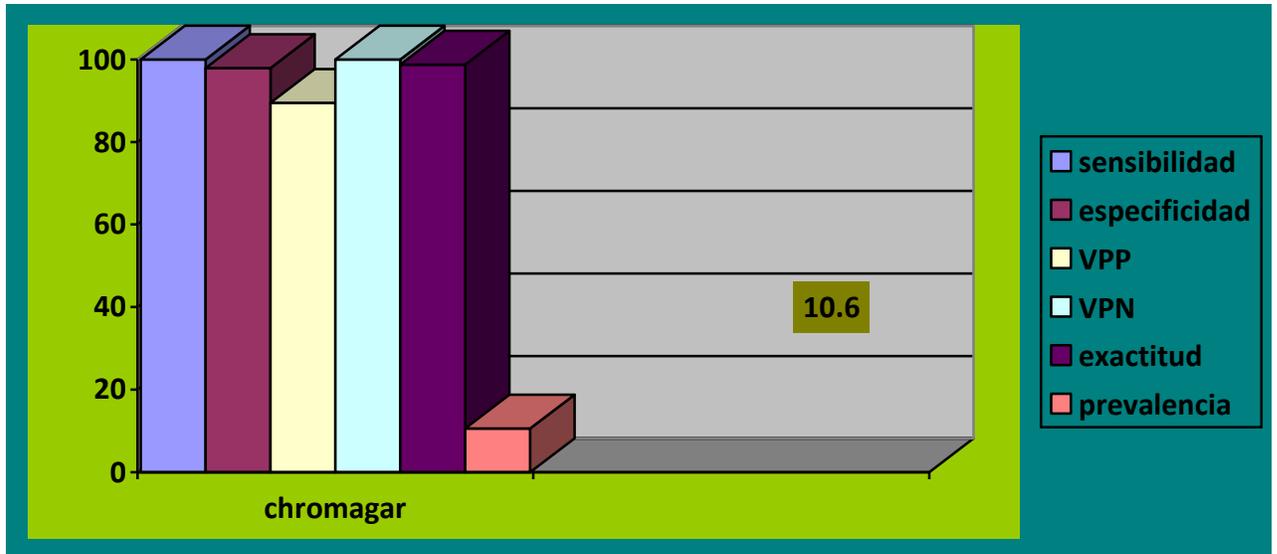
Valores dados en porcentaje.

6. Tabla. Resultados del CHROMAGAR para el diagnóstico de *Candida sp.*



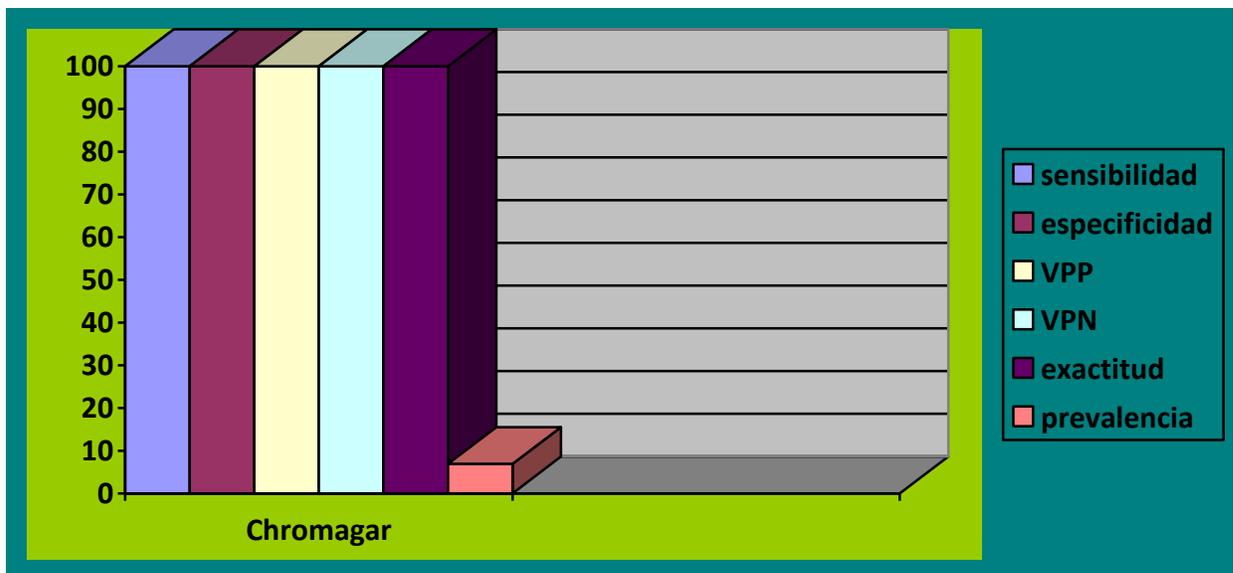
Valores dados en porcentajes.

7.- Tabla Resultados del CHROMAGAR para diagnóstico de *Candida parapsilosis*



Valores dados en porcentaje

8. Tabla Resultados del CHROMAGAR para el diagnóstico de *Candida tropicalis*



Valores dados en porcentaje

XI.-DISCUSIÓN.

El uso de medios cromogénicos representa un avance en la metodología para la identificación y diferenciación de levaduras del género *Candida*, en especial *Candida albicans* del resto de las otras especies; así como evidenciar los cultivos mixtos (5, 6, 19,20). En este estudio se comparó la capacidad de un diagnóstico presuntivo, determinando la sensibilidad y especificidad con respecto al estándar de Oro (Vitek). En el medio CHROMagar CAN2 *Candida albicans* desarrolla un color verde, sin embargo, otros investigadores como Tintenloc (22) reportan la identificación de algunas cepas de *C. dublinensis* con esta coloración, pero no se utilizó como criterio de inclusión, P faller (23), refiere que podemos observar esta coloración en cultivos de más de 48 horas, en este estudio se utilizaron muestras que superan ese periodo de tiempo sin obtener la coloración azul-verduzca, observándose colonias de color blanco. Pedro García y Martos (21) reporta en sus estudios la visualización de hasta 4 tonalidades (blanco, crema, rosa pálido y azul) lo que permitió diferenciar *C. albicans*, *C.parapsilosis*, *C.dublinensis* *C.tropicalis*. En los resultados obtenidos se observó la coloración blanca en *Candida* sp, rosa *C. tropicalis*, azul-verde *C. albicans* y café *C. lypolitica*.

Ballesté y su grupo (19) y Yücesoy y Marol (20) reportaron para el *CHROMagar Candida* la sensibilidad de 88 a 99% y especificidad de 96% a 100% para las cepas de *Candida albicans*, para las cepas no *albicans* el método tuvo sensibilidad de 90% a 96% y especificidad de 88% a 100%, García Martos y su grupo (21), describieron que la sensibilidad y la especificidad fueron superiores a 97% para el conjunto de las cepas aisladas de *Candida sp* de 100% *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en ambos parámetros de 97.3 y 99%, *Candida glabrata* de 92.3 y 99.6% y para *Candida krusei* de 90.3 y 99.6%. Este estudio reporta resultados similares a los encontrados por García y Martos, pues la sensibilidad y especificidad para *Candida albicans* de 100% y 98.76%, para *Candida sp* 100% y 96.66%, *Candida parapsilosis* 100% y 98.60% y *Candida tropicalis*, 100% y 100%.

Bernaerts (24) hace hincapié que estos medios de cultivo no se ofrecen como sustitutos de otros medios de identificación, pero se pueden utilizar solos o complementarios con otros métodos de identificación.

XII. CONCLUSIONES.

Es de forma concluyente que el *Chromagar* Can2 muestra una alta sensibilidad y especificidad, para el diagnóstico de levaduras del Género *Candida* y sus especies. Facilita la diferenciación de 4 especies de *Candida* de cultivos mixtos y reduce el tiempo de diferenciación, por lo que permite otorgar un tratamiento antifúngico precoz, disminuyendo la resistencia al tratamiento, la morbimortalidad, así como la estancia hospitalaria y el costo de la atención médica.

Es necesario contar con métodos de diagnóstico cromogénicos en un hospital con alta incidencia de enfermedades tanto locales como sistémicas provocadas por levaduras del género *Candida*.

XIII BIBLIOGRAFÍA.

1. Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. J Clin Microbiol 2003; 41:4787-4789.
2. Peter G. American Academy of Pediatrics. Candidiasis. ed. Red Book. 25 edición. Elk Grove Village 2000, 198-201.
3. Sanabria R, Samudio, Fariña N, Laspina F, Ortellado de Canese J, Arbizu, et al. Identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ambulatorios hospitalizados, e inmunocomprometidos en Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 4(2) Diciembre 2006. P(45-49).
4. Roilies e, Farmaki e, Evdoridou j, Francesconi a, Miki k, Filioti j, et al. *Candida tropicalis* in a Neonatal Intensive Care Unit: Epidemiologic and Molecular Analysis of an Outbreak of Infection with an Uncommon Neonatal Pathogen. Journal of clinical microbiology, Feb. 2003, p. 735–741 Vol. 41, No. 2
5. Alfonso J, Carrillo M, Guillermo Q, Cardenas CD, Alonso Vargas Rocio, Arévalo Pilar, et al. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 105-108
6. Dres. Ballesté Raquel, Arteta Zaida, Fernández Nora, Mier Cristina, Mousqués Nélica, Xavier Beatriz, et al. Evaluación del medio cromógeno *CHROMagar Candida* TM para la identificación de levaduras de interés médico. Rev Med Uruguay 2005; 21: 186-193
7. Arenas R, Bonifaz A, Chávez G, Estrada R y col. Primer consenso de micosis superficiales. Dermatología Rev Mex 1999; 43(2):80-88.
8. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Pia Molinari M, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. Licensee BioMed Central Ltd. BMC Infect Dis. 2006; 6:21. Published online 2006 February 10. doi: 10.1186/1471-2334-6-21.
9. Rinaldi MG. Biology and pathogenicity of *Candida* species. Engeneral P. Bodey: Candidiasis. Pathogenesis, Diagnosis, and treatment. 2a. edición. Nueva York: Reven Press; 1993 (1-17).
10. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. American Society for Microbiology. J Clin Microbiol. 2007 June; 45(6): 1843–1850.
11. Cornelius J, Clancy, L. Yu V, J. Morris A, R. Snyderman D, and M. Nguyen H. Fluconazole MIC and the Fluconazole Dose/MIC Ratio Correlate with Therapeutic Response among Patients with Candidemia. University of Florida College of Medicine and the VA Medical Center, Gainesville, Florida, Pittsburgh University Medical Center and the VA Medical Center, Pittsburgh, Pennsylvania, Diagnostic Medlab, Ellerslie, Auckland 1003, New Zealand, New England Medical Center, Boston, Massachusetts 2005, American Society for Microbiology
12. Moragues M, Villar-Vidal M, H. Sahand I, González-Gómez N, Pontón J, Quindos G. et al. Evaluation of the New Chromogenic Medium *Candida* ID 2 for

- Isolation and Identification of *Candida albicans* and Other Medically Important *Candida* Species. Journal of clinical microbiology, Sept. 2006, p. 3340–3345.
13. Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, and Falagas M, *Candida Albicans* Versus Non-*Albicans* Intensive Care Unit-Acquired Bloodstream Infections: Differences in Risk Factors and Outcome. Critical care and trauma. Anesth Analg 2008; 106:523-529
 14. Frank C. and Bernaerts Ria. *CHROMagar Candida*, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. Journal of clinical microbiology, Aug. 1994, p. 1923-1929 Vol. 32, No. 8.
 15. López González V, Mayorga Rodríguez J. Frecuencia de onicomicosis podal y tiña de los pies en 100 pacientes diabéticos tipo 2. Dermatología Rev Mex 2002; 46(6):254-9.
 16. Pfaller MA, Houston A, and Coffmann S. Application of *CHROMagar Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol. 1996 January; 34(1): 58–61
 17. Bishop JA, Chase N, Lee R, P. Kurtzman K, and Merz G. Production of White Colonies on *CHROMagar Candida* Medium by Members of the *Candida glabrata* Clade and Other Species with Overlapping Phenotypic Traits. Journal of Clinical Microbiology, October 2008, p. 3498-3500, Vol. 46, No. 10
 18. Sahand I, D. Moragues M, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindos G, and Pontón J. Supplementation of *CHROMagar Candida* Medium with Pal's Medium for Rapid Identification of *Candida dubliniensis*. Journal of Clinical Microbiology, November 2005, p. 5768-5770, Vol. 43, No. 11
 19. Ballesté R, Arteta Z, Fernández N, Mier C y col. Evaluación del medio cromógeno *CHROMagar Candida* para la identificación de levaduras de interés médico. Rev Med Uruguay 2005; 21:186-93
 20. Yücesoy M, Marol S, Performance of *CHROMagar candida* and BIGGY agar for identification of yeast species, Ann Clin Microb Antimicrob 2003; 2:8
 21. García Martos P, García Agudo R, Hernández Molina JM, Marín P y col. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo *CHROMagar Candida* Rev Iberoam Micol 1998; 15:131-5
 22. Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D: Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2000, 38:1599-1608.
 23. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S: Application of *CHROMagar Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol 1996, 34:58-61.
 24. Odds FC, Bernaerts R: *CHROMagar Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994, 32:1923-1929.