



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN
PARA HONGOS LEVADURIFORMES EN EL HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

SONIA TEAHULOS LUNA

ASESOR:

M. EN C. JESÚS RESÉNDIZ SÁNCHEZ

CO-ASESOR:

Q.F.B BETSABÉ RODRÍGUEZ PÉREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Que presenta la pasante: Sonia Teahulos Luna

Con número de cuenta: 305168971 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez</u>	
VOCAL	<u>Dr. Enrique Salas Téllez</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Betsabé Rodríguez Pérez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco</u>	
2do. SUPLENTE	<u>QFB. Leticia Cubillo Carrillo</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

AGRADECIMIENTOS

Quisiera vivir para estudiar, no estudiar para vivir

Sir Francis Bacon (1561-1626)

El presente trabajo es el fruto de muchos años de esfuerzo y dedicación, sacrificios, disciplina, trabajo. Solo hasta este preciso momento puedo asimilar la magnitud que tiene la voluntad de un ser humano, sobre todo cuando se trata de aprender, de cumplir metas. Todos estos años me he empeñado en concluir una carrera que comenzó, no el primer día en la Universidad, comenzó de hecho a mis 5 años, en el jardín de niños, mirar hacia atrás y hacer una retrospectiva de lo que ha sido este largo camino me llena aún mas de satisfacción, y este hecho tan importante en mi vida no es solo el camino recorrido en la escuela, se trata también de un camino en el que siempre busqué rodearme de gente que aportara algo a mi vida y estudios: maestros, amigos, amigas, familia, libros.

Y sin duda no hubiera logrado este sueño sin cada uno de esos granitos de arena con los que construí tal camino.

Hoy sobra dar las gracias por el apoyo que he recibo, y digo sobra porque más de una persona estuvo ahí y no sería justo omitir una mención, sin embargo, hay personas que tienen todo el derecho de ser mencionados, personas que, sin ellas, ni siquiera estas sencillas palabras tendrían existencia. Y es justo decir entonces, que mis padres fueron mi principal apoyo en este proyecto de vida llamado escuela, en el que ahora veo cumplido no solo mi sueño, sino también el de ellos, el de formarme como una persona de bien y preparada para la vida.

Gracias por todo el esfuerzo, incluso aquel del que tal vez nunca estuve consciente, gracias a ustedes papá y mamá por el sacrificio y el esfuerzo que con todo su amor hicieron para poder hacer posible mi sueño, se los debo, se los dedico, es suyo.

Gracias por siempre....

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
I. GENERALIDADES.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Características de los hongos.....	4
1.3 Micosis por hongos oportunistas.....	5
1.4 Infecciones causadas por <i>Candida</i>	6
1.5 Infecciones por otras levaduras.....	8
1.6 Métodos de diagnóstico.....	9
II. JUSTIFICACIÓN.....	14
III. OBJETIVOS.....	16
IV. HIPÓTESIS.....	17
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
5.1 Diseño.....	18
5.2 Diagrama de flujo.....	20
5.3 Metodología.....	21
VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	29
VII. DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	50
ANEXOS.....	51
Anexo A. Composición del Agar Dextrosa Sabouraud.....	51
Anexo B. Composición del CHROMagar Candida® y Brilliance Candida®.....	52
Anexo C. Composición de la galería ID 32C®.....	53
Anexo D. componentes del medio API del ID 32C®.....	54

Anexo E. Componentes del Panel RapID™ Yeast Plus®	55
Anexo F. Interpretación de la prueba RapID™ Yeast Plus®.....	56
Anexo G. Cepas clínicas utilizadas en el estudio.....	58
Anexo H. Principios y componentes del Panel RapID™ Yeast Plus®.....	60
Anexo I. Resultados de la utilización de sustratos en el Sistema RapID Yeast Plus®.....	61
Anexo J. Diagrama diferencial del Panel RapID™ Yeast Plus®.....	62
Anexo K. Análisis estadístico.....	63
Anexo L. Comparación en costos de las pruebas en estudio.....	66
VIII. REFERENCIAS.....	67

ABREVIATURAS

2KG	2-cetogluconato potásico
ACT	Cicloheximida (Actidiona)
αGAL	p-nitrofenil- α ,D-galactósido
αGLU	p-nitrofenil- α ,D-glucósido
API	Application Programming Interface
ARA	L-Arabinosa
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Agar Brilliance Candida®
βFUC	p-nitrofenil- β ,D-fucósido
βGLU	p-nitrofenil- β ,D-glucósido
CEL	D-Celobiosa
CGB	Canavanine Glycine Bromothymol blue
CHC	CHROMagar Candida®
DMAC	Dimetilacetamina
DNA	Acido desoxirribonucleico
ERY	Eritritol
ESC	Esculina Citrato férrico
GAL	D-Galactosa
GLN	Glucosamina
GLU	Glucosa
GLU	D-Glucosa
GLY	Glicerol
GNT	Gluconato de potasio
GRT	Glucuronato sódico
H_A	Hipótesis alternativa
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
HIST	Histidina β -naftilamida
H_o	Hipótesis nula
INO	Inositol
LAC	D-Lactosa (origen bovina)
LAT	Ácido Láctico
LGY	Leucil-glicina β -naftilamida
LIP	Ester de ácido graso

ABREVIATURAS

LVT	Ácido Levulínico
MAL	Maltosa
MAL	D-Maltosa
MAN	D-Manitol
MDG	Metil- α -D-Glucopiranosida
MEL	D-Melibiosa
MLZ	D-Melecitosa
NAG	N-Acetil-Glucosamina
NAGA	p-nitrofenil-N-acetil- β ,D-galactosaminidina
NaOH	Hidróxido de sodio
OBIS	Sistema de Identificación Bioquímica Oxioid®
ONPG	p-nitrofenil- β ,D-galactósido
PAS	Peryodic Acid Shiff
PCHO	p-nitrofenil fosforilcolina
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHS	p-nitrofenil fosfato
PLE	Palatinosa
PRO	Prolina β -naftilamida
RAF	Rafinosa
RAF	D-Rafinosa
RHA	L-Rhamnosa
RIB	D-Ribosa
SAC	D-Sacarosa
SBE	L-Sorbosa
SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
SOR	D-Sorbitol
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SUC	Sacarosa
TRE	Trehalosa
TRE	D-Trealosa
URE	Urea
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
X²	Chi cuadrada
XYL	D-Xilosa

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Línea del tiempo del descubrimiento de algunos agentes etiológicos, y la importancia de estos a través de la historia.....	2
2. Sistema Auxocolor® de Bio-Rad.....	11
3. API 20C AUX® (bioMerieux).....	11
4. Galería ID32C® (bioMerieux).....	12
5. Aspecto de las colonias de <i>Candida</i> sp en el medio CHROMagar Candida®.....	21
6. Aspecto de las colonias de <i>Candida</i> sp en el medio Agar Brilliance Candida®.....	22
7. Hoja de registro de resultados del panel ID 32®.....	23
8. Reactivos a utilizar en el sistema OXOID para identificación de <i>Candida albicans</i>	25
9. Resultados del sistema de Identificación Bioquímica Oxoid (OBIS).....	25
10. Tarjeta de prueba del Sistema de Identificación Bioquímica OXOID para <i>Candida albicans</i>	26
11. Panel del sistema de identificación bioquímica RaPID Yeast Plus®.....	27
12. Gamma de colores en CHROMagar Candida® de cepas ATCC.....	30
13. Gamma de colores en Agar Brilliance Candida® de cepas ATCC.....	31
14. <i>C. krusei</i> en el medio BCA y en el medio CHC.....	31
15. Coloración de las colonias de algunas cepas de aislamiento clínico en el HIMFG en el medio Agar Brilliance Candida®.....	32
16. Pigmentación colonial de <i>C. tropicalis</i> en el medio Agar Brilliance Candida® y CHROMagar Candida®.....	33
17. Morfología y coloración de cepas diferentes a <i>Candida</i> en el medio Agar Brilliance Candida®.....	34
18. Comparación de la identificación de las cepas utilizadas entre el CHC y el BCA.....	36
19. Comparación de <i>S. pombe</i> con un control positivo y un control negativo.....	38
20. Comparación de la identificación de las cepas utilizadas entre el CHROMagar Candida® y el OBIS.....	40
21. Panel del sistema de identificación bioquímica RapID Yeast Plus®.....	41
22. Comparación en la identificación de las cepas entre el ID 32C® y el Yeast Plus®.....	44
23. Guía de colores RapID®.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

1. Morfología colonial de especies de <i>Candida</i> en CHROMagar Candida® y Brillance Candida®.....	29
2. Morfología colonial de géneros diferentes a <i>Candida</i> en CHROMagar Candida® y Brillance Candida®.....	30
3. Resumen de los resultados obtenidos en los medios CHROMagar Candida® y Agar Brillance Candida®.....	35
4. Presencia de la producción de las enzimas L- Prolin aminopeptidasa y β -galactosaminidasa por <i>Candida</i> y otros hongos.....	37
5. Resumen de los resultados obtenidos en los medios CHROMagar Candida® y la tarjeta de prueba OBIS®.....	39
6. Código y porcentaje de identificación de las cepas utilizadas para el ensayo....	42
7. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba ID 32 C® y Yeast Plus®	43
8. Composición del medio SDA	51
9. Composición del CHROMagar Candida®.....	52
10. Composición del Agar Brillance Candida®.....	52
11. Composición de la galería del ID 32 C®.....	53
12. Componentes del medio API C del ID32 C®.....	54
13. Componentes del panel del Sistema RapID™ Yeast Plus®.....	55
14. Interpretación de la prueba RapID Yeast Plus®.....	56
15. Cepas utilizadas en el estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes en el HIMFG.....	58
16. Cepas ATCC de <i>Candida</i> utilizadas en el estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes en el HIMFG.....	59
17. Cepas clínicas utilizadas en el estudio comparativo.....	59
18. Principios y Componentes de la galería del Sistema RapID Yeast Plus®.....	60
19. Utilización de los componentes de la galería por hongos levaduriformes.....	61
20. Diagrama diferencial del Sistema RapID Yeast Plus®.....	62
21. Tabla de contingencia de 2x2 de los medios cromogénicos.....	63
22. Análisis estadístico de los medios cromogénicos CHROMagar Candida® y Brillance Candida®.....	63
23. Tabla de contingencia de 2x2 del sistema OBIS y CHROMagar Candida®.....	64
24. Análisis estadístico del Sistema de Identificación bioquímica oxid y CHROMagar Candida®.....	64
25. Tabla de contingencia de 2x2 del Sistema Yeast Plus® e ID 32C®.....	65
26. Pruebas de chi-cuadrado del Yeast Plus e ID 32C®.....	65

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes, el medio Brillance Candida®, sistema OXOID de identificación bioquímica (OBIS)® para *Candida albicans* y el sistema RapID Yeast Plus® frente a dos sistemas de eficacia probada el CHROMagar Candida® e ID32 C®.

Se utilizaron 41 cepas de diferentes especies de *Candida* aisladas en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" de pacientes pediátricos con candidemia. Las cepas utilizadas corresponden a los años 2004 al 2008, así como de otras levaduras *Trichosporon mucoides*, *Geotrichum capitatum*, *Rhodotorula rubra* y *Schizosaccharomyces pombe*. Todos estos microorganismos fueron previamente identificados mediante el sistema ID 32C®.

Estos microorganismos fueron sembrados en medio Agar Dextrosa Sabouraud y posteriormente cultivados en el medio cromogénico Brillance Candida® para evaluar la morfología colonial y su coloración. En el nuevo medio Brillance Candida® las colonias no presentaron diferencia significativa en cuanto a morfología colonial, sin embargo en comparación con el CHROMagar Candida® la coloración es más intensa, dado que el medio al ser opaco permite una mejor observación de la pigmentación colonial.

De acuerdo al análisis estadístico X^2 para el medio cromogénico, muestra una buena eficiencia lo que significa que no hay diferencias significativas con el CHROMagar Candida®, el único inconveniente es que dificulta la diferenciación de *Candida tropicalis*, ya que algunas cepas no presentan la coloración azul oscuro, y además de que solo identifica tres especies *C. tropicalis*, *C. albicans* y *C. krusei* y el CHROMagar Candida® además de éstas identifica a *C. glabrata*.

El sistema de Identificación Bioquímica Oxoid® para *Candida albicans* (OBIS), se comparó también con CHROMagar Candida®, y se aplicó el mismo análisis estadístico, mostrando que no hay diferencias significativas. Esta prueba es un método de diagnóstico rápido que da resultado en una hora después del aislamiento del microorganismo en estudio, este

permite la diferenciación de *C. albicans* de las no *albicans*, lo que resulta en un diagnóstico rápido y se basa en la detección de dos enzimas que solo *C. albicans* sintetiza.

El sistema RapID Yeast Plus® es una galería que contiene 18 sustratos diferentes y evalúa la capacidad del hongo de utilizar cada sustrato y mediante la obtención de un código en la base de datos electrónica ERIC®, se identifica al patógeno. A pesar de que éste sistema brinda resultados en 4 horas no presentó buen rendimiento ya que no hay correlación con el ID32®.

I. GENERALIDADES

1.1 Antecedentes

Desde el inicio de los tiempos, los hongos y el hombre han ido evolucionando conjuntamente a lo largo de la vida, sin embargo, el comienzo del estudio sistemático de los hongos comenzó hace 250 años, pero estos organismos han sido conocidos durante miles de años atrás. Los pueblos antiguos eran conocedores de las fermentaciones biológicas, los egipcios pensaban que era un legado del gran Dios Osiris, los griegos de Dionisio y los romanos de Baco. Sin embargo, los hongos también producen infecciones en el hombre, los animales y las plantas.¹

En el siglo XVII, Antonio Van Leeuwenhoek inventó un lente de vidrio en el que a través de él podía observar muy pequeños organismos a los que llamó “bichejos”. Este hecho propició la búsqueda de microorganismos aunado a la aparición de los primeros microscopios, marcando la pauta de una nueva era, **la microbiología**. En 1665, Robert Hooke un microscopista inglés publicó la descripción de un organismo al que llamó *hongo microscópico*, su descripción fue tan precisa que su espécimen pudo identificarse como el moho común del pan.²

A lo largo de la historia, los hongos han jugado un papel importante que ha ocasionado que diversos investigadores se hayan interesado por este mundo tan complejo. El descubrimiento de los agentes causales de enfermedades producidas por estos microorganismos ha permitido un estudio más profundo de cada uno de ellos y al conocer sus características se contribuye a la búsqueda de fármacos que inhiban o destruyan por completo al patógeno. En la figura 1 se presenta una breve historia del descubrimiento e importancia de los hongos microscópicos.³

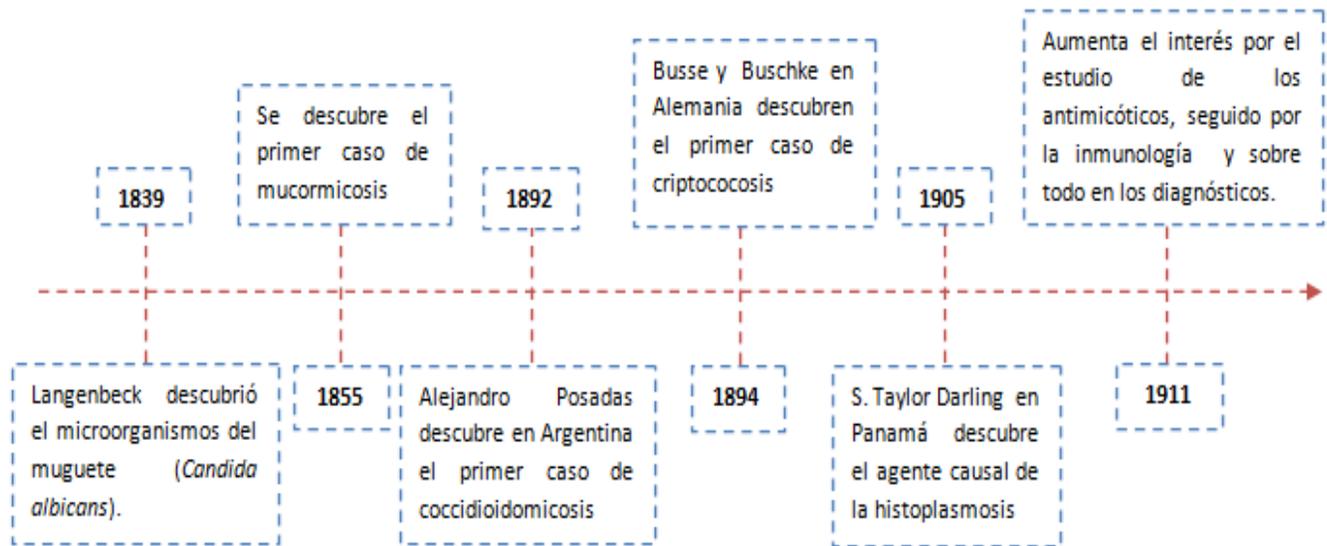


Figura 1. Línea del tiempo del descubrimiento de algunos agentes etiológicos, y la importancia de estos a través de la historia.

A las infecciones fúngicas se les ha reconocido un papel cada vez más importante en la práctica clínica. En la actualidad las claves para su diagnóstico radican, no solo en un correcto examen clínico, sino también en los métodos diagnósticos complementarios, por lo que la implementación de nuevos métodos de diagnóstico confiables permitirá en gran medida la rápida y oportuna identificación del agente causal, beneficiando así a la población afectada, principalmente a la pediátrica y esto es porque en estos pacientes se tiene una respuesta inmunológica inmadura, de tal forma que el paciente pediátrico es uno de los más susceptibles de infección por hongos.⁴

Las enfermedades ocasionadas por hongos levaduriformes hacen referencia a las micosis oportunistas que bajo ciertas condiciones causan daño, ya que la mayoría de estos son hongos saprófitos que habitan la piel y mucosas, sin embargo, se ha visto aumentada su incidencia.⁵

Los hongos levaduriformes constituyen las infecciones más importantes causadas por hongos en el ser humano. Los agentes etiológicos son numerosos, destacando: *Candida* sp, *Cryptococcus neoformans*, y *Trichosporon* sp principalmente.⁶

En estudios realizados en Argentina se menciona que en pacientes pediátricos hospitalizados, la fungemia es un problema cada vez más frecuente en neonatos de las unidades de cuidados intensivos y está asociada a catéteres venosos, enfermedades hematológicas, inducción de neutropenia por quimioterapia, inmunodeficiencias, tratamiento con antibióticos de amplio espectro y terapia con inmunosupresores.⁷

La identificación de las levaduras se puede realizar utilizando criterios bioquímicos, inmunológicos y/o moleculares.⁸

En los criterios bioquímicos, se destacan los medios cromogénicos que son usados para el aislamiento e identificación presuntiva de algunas especies de *Candida*. Estos se basan en la detección de la actividad enzimática, mediante la hidrólisis de un sustrato cromogénico es decir, debido a la detección de enzimas específicas producidas por los microorganismos en estudio.⁹

Estos microorganismos se caracterizan por tener sistemas enzimáticos específicos que son responsables de la escisión del sustrato en el interior del cromógeno, con la finalidad de separar el sustrato por lo que la unión entre las dos partes del cromógeno se rompen por la enzima. De este modo los cromóforos son liberados y pueden ser detectados visualmente mediante la observación de un cambio de color en el medio.⁹

El agar Brilliance Candida® (2010) en un estudio realizado comprobaron que este medio y el CHROMagar Candida®, no presentan diferencias significativas al comparar la coloración y las colonias crecidas en cada medio.¹⁰

Se evaluó el sistema Rapid Yeast Plus® (2007) comparándolo con el VITEK 2 y observaron un 95.5% de correlación deduciendo que, tiene una alta confiabilidad en la determinación del diagnóstico.¹¹

Para el sistema OXOID de identificación bioquímica, no se han realizado estudios para verificar su funcionalidad, por lo que una de las finalidades de este trabajo es asegurar que este método de identificación para *Candida albicans* sea eficaz.

Es sumamente importante optimizar los métodos de diagnóstico para obtener resultados en el menor tiempo posible, sin olvidar que el tratamiento requerido depende de la confiabilidad de los resultados de la prueba y de la premura con que éstos puedan obtenerse, ya que un diagnóstico rápido y confiable del agente etiológico causante de la infección es fundamental para que el médico suministre el tratamiento adecuado para salvaguardar la salud del paciente.¹²

1.2 Características generales de los hongos

Se han identificado alrededor de dos millones de especies de hongos, de los cuales más de 400 son patógenos para los humanos, causando infecciones conocidas como micosis. Los hongos son organismos eucariontes, es decir, poseen un núcleo estructural con membrana nuclear, heterótrofos, ampliamente distribuidos en la naturaleza como saprobios o parásitos.¹³

Algunas células fúngicas unicelulares poseen **cápsula**, situada por fuera de la pared celular y solo se observa en algunas especies, está compuesta por polisacáridos especiales, habitualmente glucoroxilomananos, que le brindan a la célula una mayor protección frente a la respuesta inmune del hospedero; la **pared celular** es una estructura rígida constituida en su mayoría por quitina, glucanos, mananos y proteínas, que le da al hongo su forma característica, brinda protección, por su permeabilidad permite el paso de elementos nutritivos y la eliminación de residuos metabólicos, sus componentes al ser proteínas y polisacáridos de alto peso molecular se comportan como antígenos que originan una respuesta inmune específica en el hospedero.¹⁴

Por dentro de la pared se encuentra la **membrana plasmática**, integrada por fosfolípidos, proteínas, sistemas enzimáticos, como el citocromo P450 importante en el metabolismo y

síntesis de ergosterol (principal esteroide de estas células) y con frecuencia representa un blanco utilizado por los antifúngicos para ejercer su función.¹⁴

La división celular se produce por mitosis con la peculiaridad de que la membrana nuclear no desaparece durante el proceso. En el caso de los hongos con fase sexual hay núcleos diploides y se produce la meiosis.¹⁵

El aspecto macroscópico de los hongos unicelulares es la producción de colonias redondas u ovals de un diámetro de entre 3 y 30 μ .

Se reproducen asexualmente mediante gemación en la que a partir de una célula madre se produce protuberancias protoplásmicas también llamados blastoconidios que van creciendo hasta separarse y formar una nueva célula. En ocasiones, las células hijas no se separan y forman cadenas de células que se denominan pseudohifas.¹⁶

1.3 Micosis por hongos oportunistas

Las micosis por hongos oportunistas son infecciones causadas por hongos de bajo poder patógeno capaces de diseminarse por vía hematológica a diversos órganos, con los que causan trastornos severos e incluso la muerte. Estas infecciones principalmente se presentan en hospederos con alteraciones en el sistema inmunológico. En los últimos años estas infecciones se han incrementado, los principales factores predisponentes para las infecciones fúngicas son los trasplantes de órganos sólidos, padecimientos oncológicos, tratamientos inmunodepresores, tratamiento con antibióticos de amplio espectro, por enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus o por infecciones por VIH.¹⁷

Existen 623 especies conocidas de hongos levaduriformes distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de los cuales aproximadamente 30 pueden producir enfermedades en humanos, por lo que se consideran de importancia clínica. Dentro de los agentes causales de infección que han sido aislados destacan: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigeli*, *Malassezia* sp, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*.¹⁸

1.4 Infección causada por *Candida*

Las micosis producidas por *Candida* se originan por alteraciones del sistema inmune o ruptura de las barreras mucosas. La mayoría de los factores de riesgo para la adquisición de candidemia en los pacientes hospitalizados son: inmunosupresión originada por neutropenia, malnutrición, quimioterapia, radioterapia, agentes que facilitan la ruta de infección como el uso de catéteres, quemaduras, colonización previa, entre otros. Cuando existe una combinación de varios factores de riesgo, como es la administración de antibacterianos de amplio espectro que pueden inducir la proliferación de hongos en el tracto gastrointestinal provocando la colonización de la piel y llegar al torrente sanguíneo.¹⁹

Las infecciones en el torrente sanguíneo causados por *Candida* han aumentado en las últimas dos décadas, su mortalidad es de 29% a 50%. Estas infecciones representan un importante problema clínico-epidemiológico en las unidades de cuidados intensivos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos. En la población pediátrica ocupan el segundo lugar en fallecimientos entre todas las causas de sepsis.²⁰

Los factores de riesgo relacionados con las candidemias en pacientes pediátricos más comunes son: bajo peso, prematurez (menos a 27 semanas), hospitalización mayor a tres semanas, aplicación de catéteres venosos centrales, ventilación mecánica, administración de antibiótico de amplio espectro, corticosteroides, nutrición parenteral y procedimientos quirúrgicos.²¹

El principal patógeno de los hongos levaduriformes varía en forma considerable, siendo el más virulento *Candida albicans* capaz de generar con mayor frecuencia enfermedad mortal en seres humanos, *Candida tropicalis* es la segunda levadura de importancia en cuanto a patogenicidad, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* también tienen cierto grado de virulencia, asociado a micosis oportunistas causando infecciones, pero la debilidad del

hospedero debe ser muy marcada para permitir que este microorganismo menos virulento lo invadan.²²

Existen más de 150 especies de *Candida* pero solo nueve son las más frecuentes para el ser humano: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, de las cuales en México se ha encontrado con mayor prevalencia a *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*.²³

C. albicans es componente habitual de la microbiota cutánea, tracto gastrointestinal y genital. Del 2 al 15% de los enfermos colonizados por esta especie desarrollan candidosis diseminada casi siempre de origen endógeno. La mortalidad por esta especie es del 79%, muchas veces por los factores de virulencia que puede desarrollar el hongo (fosfolipasas, Aspartil proteasas, lipasas, adhesinas, formación de biopelícula).²⁴

C. parapsilosis, comensal habitual de la piel, se aísla con mayor frecuencia en pacientes pediátricos, también desarrolla factores de virulencia y se le ha relacionado tanto en la nutrición parenteral como con el uso prolongado de catéteres (mecanismo de transmisión exógena). Es la menos patógena de las especies con una mortalidad del 30%.²⁵

La capacidad invasora de *C. tropicalis* es mayor que la de *C. albicans*, se considera que entre el 50 al 60% de los colonizados por esta especie desarrollan candidosis invasiva. Afecta con más frecuencia a pacientes con enfermedad hematológica o receptores de médula ósea y suele adquirirse, mediante un mecanismo de transmisión endógeno, en los primeros días de hospitalización en ausencia de tratamiento antifúngico.²⁶

C. glabrata y *C. krusei* afectan predominantemente a pacientes con antecedentes de tratamiento con fluconazol no portadores de catéteres y sin antibioterapia previa a la fungemia; *C. glabrata* es la menos virulenta de todas; sin embargo, es la que presenta la segunda mayor tasa de mortalidad detrás de *C. krusei*, esta especie es la que se aísla con mayor frecuencia en pacientes con neoplasia hematológica.²⁷

C. lusitaniae forma parte de la biota del tracto gastrointestinal y respiratorio. Se han descrito pocos casos de infección nosocomial por esta especie, algunas por mecanismos de transmisión exógena y en otros por infecciones cruzadas.²⁸

1.5 Infección por otras levaduras

Desde un punto de vista epidemiológico, las nuevas levaduras emergentes se les pueden encontrar en el medio ambiente y, especialmente en tracto gastrointestinal y genital.

Trichosporon cutaneum causa habitualmente una infección superficial en la base del pelo conocido como “piedra blanca”. En los enfermos hospitalizados se han dado casos esporádicos en pacientes con inmunodepresión profunda. Clínicamente se manifiesta como infección grave de la piel, endocarditis, infección sistémica o peritonitis asociada con el catéter de la diálisis.²⁹

Se han descrito varios casos de fungemia por *Rhodotorula* sp y se ha relacionado siempre con el uso de catéter intravenoso, aislándose casi siempre de la sangre tomada del catéter. *Rhodotorula mucilaginosa* también conocida como *Rhodotorula rubra* es una levadura pigmentada de color rojo anaranjado debido a la presencia de pigmentos carotenoides, es la especie más frecuentemente identificada en infecciones en humanos seguida por *R. glutinis* y *R. minuta*, esta levadura es un hongo oportunista capaz de producir infecciones localizadas y generalizadas del tipo fungemia. Una elevada proporción de infecciones invasoras ha sido descrita en pacientes inmunodeprimidos (oncológicos, trasplantados o con VIH).³⁰

La criptococosis es una micosis oportunista aguda, subaguda o crónica, inicialmente pulmonar causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* (variedad *neoformans* y *grubii*) y *Cryptococcus gattii*. Es un hongo que ocasionalmente causa infección en humanos con inmunosupresión. Se encuentra con frecuencia en deposiciones de palomas, en la tierra y en algunas frutas. La puerta de entrada de este patógeno es a través de las

vías respiratorias, en forma de aerosoles en los que el hongo no está encapsulado, la formación de la cápsula se produce luego de que la levadura infecta los tejidos.³¹

La geotricosis es producida por la levadura del género *Geotrichum* sp, hongo de distribución cosmopolita, presente en el medio ambiente, la piel y mucosas del hospedero humano. Como en todos los casos del oportunismo, el hospedero con respuesta inmune deprimida desarrolla la enfermedad. La infección puede ser de fuente endógena o exógena. Las formas clínicas son varias y las más frecuente es la pulmonar con manifestaciones muy similares a la tuberculosis, con evolución crónica y fulminante y de mal pronóstico. Se puede presentar también la lesión en las paredes bronquiales, en el aparato digestivo se presentan lesiones orales y de localización intestinal de características similares a la candidosis.³²

1.6 Métodos de diagnóstico

Para el diagnóstico de las micosis por hongos levaduriformes, no basta únicamente con la macroscopía y microscopía como lo es para los hongos filamentosos, sino que se requiere además de pruebas bioquímicas para llegar al diagnóstico de género y especie del agente causal.³³

Para el aislamiento primario de los hongos, se utilizan diversos medios de cultivo. Estos medios hay que seleccionarlos en función del hongo que se sospeche y del tipo de muestra. La temperatura de incubación depende del hongo de que se trate, ya que los hongos filamentosos se incuban a 25°C mientras que las levaduras se incuban a 37°C.

Existen medios de cultivo útiles para el aislamiento de los hongos unicelulares como lo es el SDA, así como de medios selectivos y diferenciales que permiten la identificación presuntiva de estos como agares cromogénicos utilizados para la identificación de especies de *Candida*; Agar Níger, Canavanina Glicina Azul de bromotimol para la identificación y diferenciación de *Cryptococcus*, por mencionar algunos.

Los medios cromogénicos están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida*. El fundamento de los mismos se basa en la detección de

determinadas actividades enzimáticas por parte de levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos.³⁴

El medio CHROMagar Candida® fue descrito por Odds y Bernaest en 1994, para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida* en base a la coloración que produce. Este medio permite diferenciar a *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul), *C. glabrata* (rosa) y *C. krusei* (rosa pálido).³⁵

El medio Candida ID® permite el aislamiento e identificación presuntiva de *C. albicans* y cierta orientación para la identificación de otras especies no *albicans*, las colonias de *C. albicans* adquieren un color azul, otras especies como *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae* desarrollan un color rosa.³⁶

La identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes, se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio base sintético para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo.³⁷

La galería Auxacolor® de Bio-Rad mostrada en la figura 2, es un sistema de identificación basado en la asimilación de 12 azúcares que permiten la identificación de 26 especies. El crecimiento de la levadura se visualiza por el cambio de un indicador de pH. La galería incorpora además, una prueba de resistencia al actidione y otra para la detección de la actividad fenol oxidasa de *C. neoformans*.³⁸

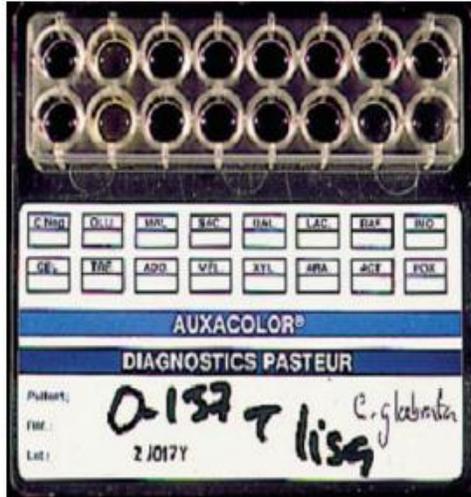


Figura 2. Sistema Auxocolor® de Bio-Rad.

El sistema API 20C AUX® (bioMerieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación, mostrado en la figura 3. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras solo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 levaduras.³⁹



Figura 3. API 20C AUX® (bioMerieux)

En la actualidad se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene a partir de un

código numérico. Entre éstos se encuentra la galería ID 32C® (BioMerieux), como se observa en la figura 4, compuesta por diferentes pruebas de asimilación y permite identificar especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Rhodotrula*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Malassezia*, *Hansenula* en 24 a 48 horas.⁴⁰

La galería se compone de 32 cúpulas; 29 contienen un sustrato de carbono deshidratado, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina.⁴⁰

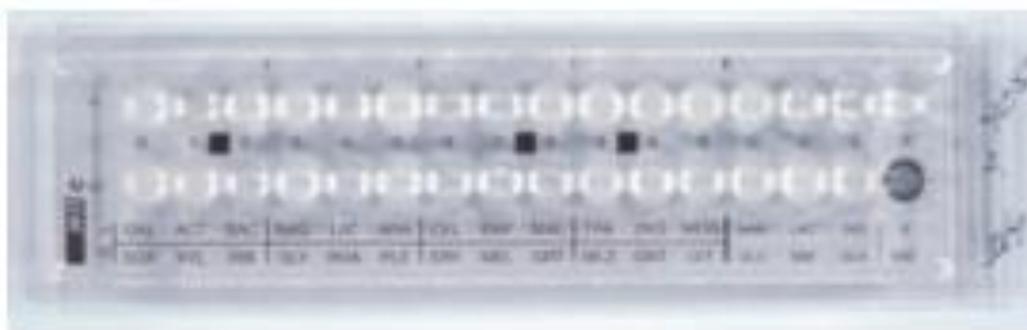


Figura 4. Galería ID32C® (bioMerieux)

El sistema Vitek® consta de un módulo con cámara de vacío para inoculación de la tarjeta, un lector/inoculador, un sistema automático de manipulación de tarjetas, un fotómetro para medir la densidad óptica, un ordenador central y una impresora. Permite identificar 36 especies diferentes de levaduras en 24 horas, 16 especies del género *Candida*, 6 de *Cryptococcus*, 3 de *Rhodotorula*, 2 de *Trichosporon*, 3 *Geotrichum*, 2 *Protheca*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.⁴¹

Entre los sistemas automáticos están: el sistema Vitek® 2 que es utilizado para la detección del metabolismo fúngico, pudiendo identificar levaduras en tan solo 15 horas. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de la tarjeta de análisis con 63 pozos. Este sistema permite la identificación de 51 especies diferentes incluida *Candida dubliniensis* y al igual que los sistemas semiautomáticos requieren pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación.⁴²

El Rapid Yeast Identification panel MicroScan® es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras en 4 horas, identifica especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Protecha*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*. Se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicos en una placa de micro dilución de 96 pozos que utilizan 27 sustratos deshidratados.⁴³

También se utilizan pruebas fisiológicas como tubo germinativo, producción de clamidoconidios ambos utilizados para la identificación de *C. albicans*. Sin embargo, tubo germinativo resulta hoy en día obsoleto, ya que no es específico para *C. albicans* debido a que *C. dubliniensis* tiene comportamiento similar a éste, además de que no todas las *C. albicans* dan positivo para esta prueba, un falso positivo podría presentarse con *C. tropicalis* porque produce una estructura similar al tubo germinativo de *C. albicans*.⁴⁴

Es importante reiterar que algunos medios de cultivos selectivos y diferenciales son de gran utilidad para dar un diagnóstico presuntivo, sin embargo se tiene que hacer una identificación confirmativa utilizando algunas de las pruebas bioquímicas existentes o que usen en su laboratorio.

II. JUSTIFICACIÓN

Existen numerosas pruebas para la identificación de hongos levaduriformes, por lo tanto es indispensable conocer su utilidad para el diagnóstico, ya que de su funcionalidad depende la correcta identificación de microorganismos causantes de enfermedad.

Hoy en día, se han creado nuevos medios de cultivo que permiten una fácil y sencilla identificación de hongos levaduriformes, y en especial de los referidos a algunas especies de *Candida*. El agar Brillance Candida®, un nuevo medio cromogénico que permite la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, para conocer su utilidad en el diagnóstico es necesario realizar una comparación de éste, con un medio de cultivo convencional del cual su funcionalidad es garantizada, el CHROMagar Candida®.

Así mismo otras pruebas rápidas para la oportuna identificación de hongos unicelulares han salido al mercado y para ello es necesario asegurar su funcionalidad para la identificación de estos microorganismos, por tal razón el Sistema de Identificación Bioquímica OXOID® y el Sistema RapID Yeast Plus® serán comparados con el medio CHROMagar Candida® y con el Sistema ID 32 C® respectivamente.

Por lo tanto, se hará una correlación estadística de los datos obtenidos en cada prueba y así conocer si no hay diferencias significativas entre ellos, es decir, entre las pruebas de identificación en estudio y las pruebas convencionales con la finalidad de establecer si son confiables para ser utilizados en la práctica como métodos alternativos para el diagnóstico.

El diagnóstico puede considerarse como el más importante resultado de la práctica médica, ya que es la clave que conduce al tratamiento. Se llama prueba diagnóstica a cualquier proceso, que pretenda determinar en un paciente la presencia de cierta condición patológica, por lo tanto, al considerarse el más importante de los resultados este debe ser eficaz y confiable, para corroborarlo se utilizan diversos criterios estadísticos para conocer si hay diferencias significativas.⁴⁵

Para la comparación de métodos y comprobación de hipótesis se utilizarán cálculos estadísticos, para conocer si hay diferencias significativas.⁶⁰ Entre los métodos que permitirán el análisis de los datos cualitativos está la Chi cuadrada (χ^2), es un método muy flexible utilizando el programa SPSS.⁴⁶

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes (Agar Brilliance Candida®, RapID Yeast Plus System® y Sistema de Identificación Bioquímica Oxoid®) contra métodos convencionales (CHROMagar Candida® e ID 32C®) utilizando cepas clínicas de padecimiento sistémico obtenidas de pacientes pediátricos en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

Objetivos particulares

- Verificar que las cepas proporcionadas por el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” no estén contaminadas.
- Corroborar la identificación previa de las cepas utilizadas con el sistema de asimilación de compuestos de carbono ID 32 C® (bioMerieux).
- Correlacionar los datos obtenidos en cada prueba con el análisis estadístico utilizando el programa SPSS para determinar si hay relación entre ellos.

IV. HIPÓTESIS

H₀= Si las pruebas de identificación para la diferenciación de hongos levaduriformes no presentan diferencias significativas con las pruebas estándar, *entonces tendremos* un método analítico confiable y oportuno para el diagnóstico.

H_A= Si los métodos de identificación para la diferenciación de hongos levaduriformes presentan diferencias significativas con las pruebas estándar, *entonces no tendremos* un método analítico confiable y oportuno para el diagnóstico.

VARIABLES

Dependiente: pruebas de identificación de hongos levaduriformes

Independiente: cepas de hongos levaduriforme

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño

Observacional, transversal, retrospectivo, comparativo, cerrado.

Criterios

a) Inclusión

-Cepas de hongos levaduriformes aislados de padecimientos sistémicos en pacientes pediátricos.

-Pacientes con expedientes completos.

b) Exclusión: Cepas no viables.

c) Eliminación: Cepas contaminadas y cepas con identificación dudosa.

Tamaño de muestra

Se trabajó con 41 cepas de *Candida* sp aisladas de padecimientos sistémicos en el periodo 2004-2008, previamente identificadas con ID32 C® y CHROMagar Candida® y con 6 cepas diferentes a *Candida* sp (*Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Schizisaccharomyces pombe*, *Geotrichum capitatum*, *Trichosporon mucoides*). Se utilizaron como referencia cepas ATCC: *C. albicans* 14053, *C. krusei* 14423, *C. glabrata* CB5138, *C. parapsilosis* 22019, *Candida lusitaniae* 34449, *C. neoformans* 14116, *C.tropicalis* 123 y *C.guillermondii*

Material y equipo de laboratorio

- * Micropipetas de 10, 100 y 1000 μL
- * Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 μL
- * Asas microbiológicas
- * Cajas Petri estériles
- * Matraz Erlenmeyer de 1L
- * Probeta graduada de 1L
- * Mechero de Bunsen
- * Panel de prueba RapID™®
- * TEST O.B.I.S®
- * ID 32C®
- * Incubadora
- * Autoclave
- * Balanza granataria

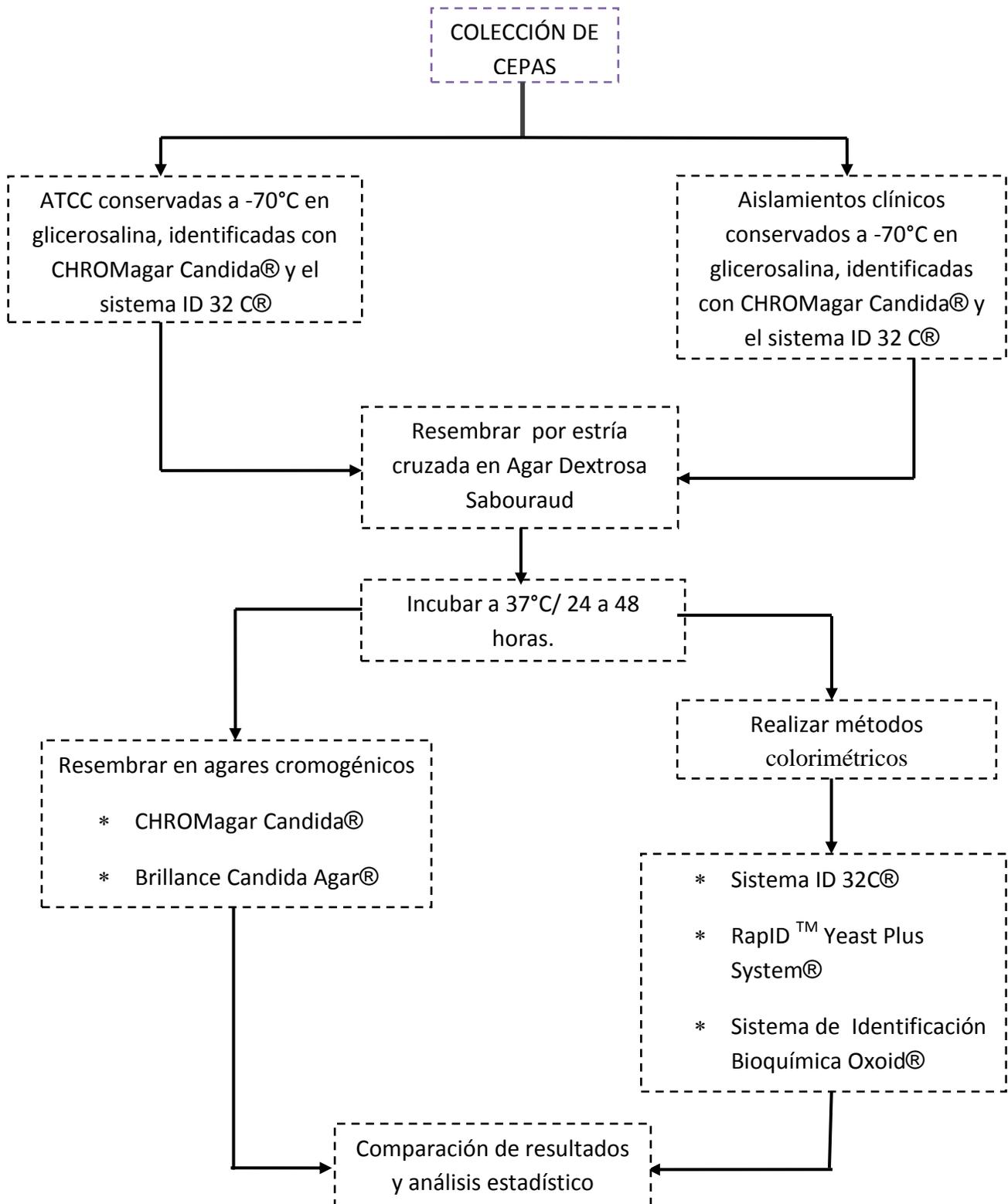
Medios de cultivo

- * Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)
- * Agar Brilliance Candida® (BCA)
- * CHROMagar Candida® (CHC)

Reactivos

- * Suplemento selectivo Brilliance Candida (cloranfenicol)
- * Solución OBIS Rehidratante
- * Revelador OBIS NaOH
- * Revelados OBIS DMAC
- * Reactivo RapID Yeast Plus A
- * Reactivo RapID Yeast Plus B
- * Agua destilada estéril

5.2 Diagrama de flujo



5.3 Metodología

Posterior a la preparación del medio SDA mostrado en el anexo A, las cepas ATCC y de aislamientos clínicos se resembraron por estría cruzada y se incubaron de 30 a 37°C por 24 a 48 horas máximo. También se resembraron en este medio las cepas diferentes a *Candida*.

➤ Medios cromogénicos

- a) Una vez obtenido crecimiento en el SDA, se resembraron en los medios cromogénicos CHROMagar *Candida*® y Brilliance *Candida*® (la preparación de los medios se muestran en el anexo B), y se esperó el crecimiento según las indicaciones del inserto, mostrado en la figura 5 y 6.



Figura 5. Aspecto de las colonias de *Candida* sp en el medio CHROMagar *Candida*®.
(En azul se muestra *C. tropicalis*, en verde *C. albicans*, en rosa *C. glabrata* y en rosa pálido *C. krusei*.)

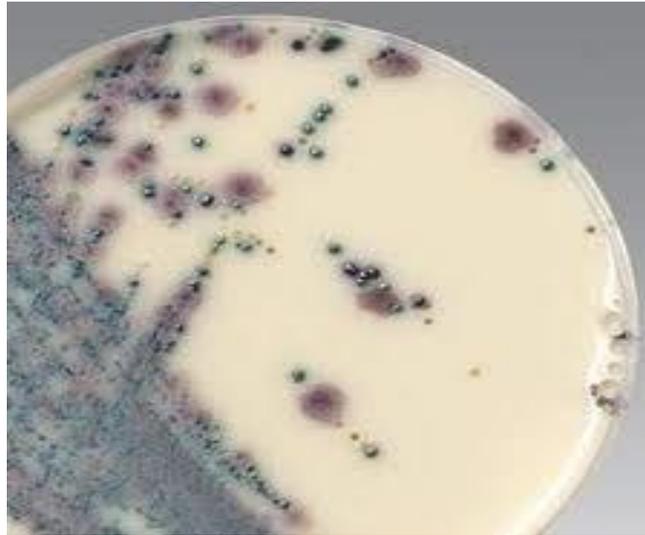


Figura 6. Aspecto de las colonias de *Candida* sp en el medio Agar Brilliance Candida®.

(En azul se muestra *C. tropicalis*, en verde *C. albicans* y en morado *C. krusei*.)

- b) Las lecturas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas.
- c) Se compararon las características de las colonias de los hongos (coloración, tamaño, aspecto) en ambos medios.

➤ **Sistema de Identificación de Levaduras ID 32 C®**

a) Preparación del inóculo

1. Abrir una ampolla de API® Suspensión Medium (2mL). En el anexo C se muestra la composición de la ampolla.
2. Tomar una o varias colonias del medio de cultivo SDA.
3. Preparar una suspensión de turbidez igual al patrón 2 de Mc Farland (6.0×10^8 UFC/mL).
4. Abrir la ampolla de API C Medium y transferir 250 μ L de la suspensión precedente.

b) Inoculación de la galería.

1. Inocular cada cúpula de la galería con 135 µL de la suspensión preparada al 2 de Mc Farland.
 2. Cerrar la galería con la tapa. En el anexo C, se muestra la composición de la galería.
 3. Incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- c) Lectura de la galería
1. Las reacciones obtenidas se codifican en un perfil numérico.
 2. Comparar con el control (0) y anotar todas la cúpulas que aparecen con turbidez como positivos.
 3. En la ficha se registran los resultados obtenidos de cada cúpula, colocando (+) si es positivo o (-) si es negativo.
 4. Los ensayos se separan en grupos de 3 y se asignan para cada uno valores de 1, 2 y 4 como se observa en la figura 7.

32 C

5796 0 - XL - 200805

FICHE DE RESULTATS / RESULT SHEET / ERGEBNISBLATT / HOJA DE RESULTADOS / SCHEDA PER LA REGISTRAZIONE DEI RESULTATI / FICHA DE RESULTADOS / ΦΥΛΛΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / RAPPORTBLAD / RESULTATARK / KARTA WYNIKÓW

ID 32 C REF 32 200

Origin / Source / Herkunft / Origen / Origem / Πηγή/Ανταν / Ursprung / Orijin / Posledzenie

CEPA:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	C	D	E	C	D	E	F
GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	ZIG	MCG	GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	ZIG	MCG	MAN	LAC	IND	MAN	LAC	IND	D
SOR	XYL	RB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LYT	SOR	XYL	RB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LYT	GLU	SBE	GLN	GLU	SBE	GLN	ESC
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	

Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andra tests / Inne testy

Ident. / Ταυτοποίηση :

% ID= T=

incub. / Inkub. / Θερμοκρασία επίστασης : 24:00 48:00

Figura 7. Ficha de registro de resultados del panel ID 32®.

5. Se suman en el interior de cada grupo los valores que corresponden a las reacciones positivas.

6. Obtener el código correspondiente

7. Identificar mediante el programa informático **apiweb**™® para obtener género y especie del hongo levaduriforme.

➤ **Sistema de Identificación Bioquímica Oxoid (OBIS)®**

1. Utilizar la paleta de plástico sin usar y transferir aproximadamente de 3 a 5 colonias en la zona de ensayo circular, asegurarse de que se tenga una capa fina y uniforme.

2. Humedecer el inóculo con una gota de solución rehidratante (ID0701M- tapa blanca)

3. Colocar la tarjeta en la funda de reacción de plástico y asegurarse que la zona de ensayo se cubra.

4. Incubar a 37°C por 60 minutos.

5. Después de la incubación, eliminar la funda de plástico de reacción y dispensar una gota de revelador de NaOH (ID0702M- tapa amarilla) sobre el área de inoculación. Los reactivos se muestran en la figura 8.

6. El desarrollo de un color amarillo sobre el frotis de inoculación indica presencia de β -galactosaminidasa, de lo contrario, el organismo no es *C. albicans* y no se requiere de más pasos.



Figura 8. Reactivos del sistema OXOID para identificación de *Candida albicans*

7. Dispensar una gota de revelador DMAC (ID0702M-tapa morada) sobre el área de inoculación.

8. El desarrollo de un color magenta sobre el área de inoculación después de 10 segundos indica la presencia de L-prolina aminopeptidasa (figura 9). Si no hay cambio de color indica la ausencia de esta enzima y el organismo no es *C. albicans*.

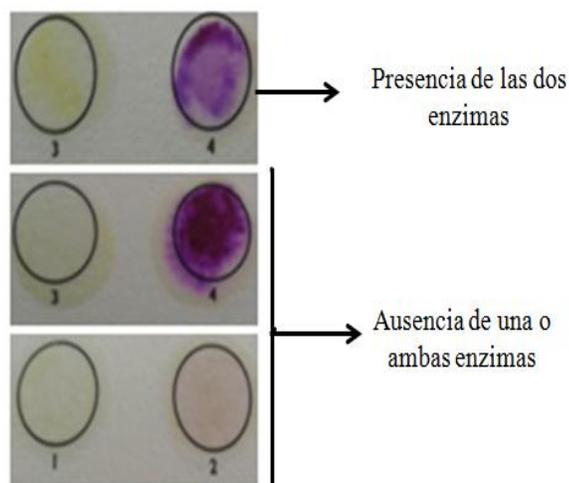


Figura 9. Resultados del sistema de Identificación Bioquímica Oxoid (OBIS)®.

9. Registrar el resultado en la tarjeta de prueba mostrada en la figura 10.

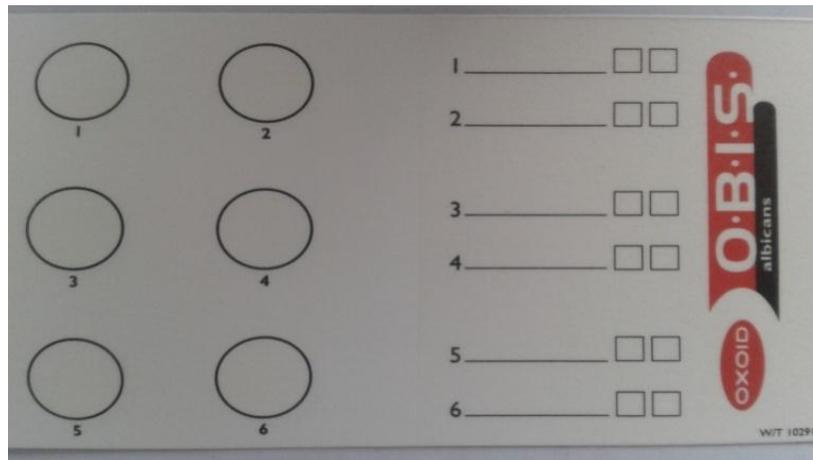


Figura 10. Tarjeta de prueba del Sistema de OXOID para *Candida albicans*.

➤ **RapID™ Yeast Plus System®**

a) Preparación del inóculo

1. Las placas usadas de SDA para la preparación del inóculo deben incubarse por 48 horas a 30°C.

2. Con un asa bacteriológica, suspender suficiente crecimiento del cultivo en el líquido de inoculación RapID™ (2mL), seleccionar colonias aisladas.

3. Continuar añadiendo el microorganismo hasta que la turbidez de la suspensión oculte completamente las líneas negras de la tarjeta de inoculación.

b) Inoculación de los paneles.

1. Con una pipeta transferir el contenido de todo el tubo de líquido de inoculación a la esquina superior derecha del panel.

2. Sellar el acceso de inoculación del panel. Los componentes del panel se muestran en el anexo D.
 3. Inclinar el panel en sentido contrario de los pozos de reacción, aproximadamente en un ángulo de 45°.
 4. Mover suavemente el panel para distribuir homogéneamente el inóculo.
 5. Mantener en posición horizontal nivelada e inclinar lentamente hacia los pozos de reacción hasta que el inóculo fluya completamente.
 6. Incubar a 30°C o a temperatura ambiente por 4 horas.
 7. Añadir los reactivos correspondientes a los pozos que se indican en la figura 11.
- * Añadir una gota del reactivo RapID™ Yeast Plus A a los pozos del 7 al 14.
 - * Añadir una gota de reactivo RapID™ Yeast Plus B a los pozos del 16 al 18.

Situación en el panel de prueba RapID™ Yeast Plus

Nº de pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Código de la prueba	GLU	MAL	SUC	TRE	RAF	LIP	NAGA	αGLU	βGLU	ONPG	αGAL	βFUC	PHS	PCHO	URE	PRO	HIST	LGY
							Reactivo RapID™ Yeast Plus A								Reactivo RapID™ Yeast Plus B			

Figura 11. Panel del sistema de identificación bioquímica RapID Yeast Plus®.

8. Después de añadir el reactivo RapID™ Yeast Plus B, esperar al menos 30 segundos pero no más de 1 minuto para que desarrolle color.
9. Leer y puntuar los pozos de prueba de izquierda a derecha (En el anexo E se presenta una tabla de interpretación de los resultados del sistema así como una guía de colores)

10. Anotar las puntuaciones en los recuadros correspondientes del formulario de resultados del Compendio de Códigos RapID™ Yeast Plus.
11. Consultar el código obtenido en el formulario de resultados del Compendio de Códigos RapID™ Yeast Plus (compendio electrónico) para la identificación.
12. Realizar por duplicado.
13. Una vez realizado cada procedimiento, comparar resultados.

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se realizó un estudio comparativo de un nuevo medio cromogénico el Agar Brillance Candida®, y para ello se utilizaron 41 cepas de diferentes especies de *Candida* obtenidas en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” de padecimientos sistémico (candidemia) en pacientes pediátricos, dichas cepas fueron identificadas como: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*; y otros géneros como *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* y *Schizosaccharomyces*, identificados previamente mediante el sistema de asimilación de compuestos de carbono ID 32 C®.

En las tablas 1 y 2 se muestran el espectro de colores y morfología colonial de las 41 cepas de aislamiento clínico tanto en CHROMagar Candida® y Brillance Candida®, así como de las cepas ATCC que fueron utilizadas como control y otros hongos levaduriformes. En el anexo F se muestran las cepas utilizadas en cada una de las pruebas de identificación en estudio.

Tabla 1. Morfología colonial de especies de *Candida* en CHROMagar Candida® y Brillance Candida®.

Género/ Especie	No. de cepas	Morfología en CHROMagar Candida®	Morfología en Brillance Candida®
<i>Candida</i> de aislamiento clínico de padecimiento sistémico			
<i>C. albicans</i>	20	Verdes, lisas, cremosas	Verdes, lisas, cremosas
<i>C. tropicalis</i>	12	Azul claro, lisas, cremosas	Azul oscuro, lisas, cremosas
<i>C. parapsilosis</i>	8	Beige, lisas, cremosas	Amarillas, lisas, cremosas
<i>C. krusei</i>	1	Rosa pálido, planas, opacas	Café, planas, opacas
Cepas ATCC de diferentes especies de <i>Candida</i>			
<i>C. albicans</i> 14052	1	Verdes, lisas, cremosas	Verdes, lisas, cremosas
<i>C. tropicalis</i> 123	1	Azul claro, lisas, cremosas	Azul oscuro, lisas, cremosas
<i>C. guillermindii</i> 38	1	Beige, lisas, cremosas	Beige, lisas, cremosas
<i>C. glabrata</i> CB5138	1	Rosas lisas, cremosas	Beige, lisas, cremosas
<i>C. krusei</i> 390 M	1	Rosa pálido, planas, opacas	Cafés, planas, opacas

Tabla 2. Morfología colonial de géneros diferentes a *Candida* en CHROMagar *Candida*® y Brilliance *Candida*®.

Género/ Especie	No. de cepas	Morfología en CHROMagar <i>Candida</i> ®	Morfología en Brilliance <i>Candida</i> ®
Otros géneros de levaduras			
<i>Geotrichum capitatum</i>	1	Rosas de aspecto lanoso	Moradas de aspecto lanoso
<i>S. pombe</i>	1	Amarillas, lisas,	Verde, lisas, cerosas
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	Azul claro, rugosas, cerosas	Azul claro, rugosas cerosas
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	Sin crecimiento	Sin crecimiento
<i>C. neoformans</i>	1	Beige, mucoides, brillosas	Beige, mucoides, brillosas
<i>C. gattii</i>	1	Beige, mucoides, brillosas	Moradas, mucoides, brillosas

El espectro de colores del CHROMagar *Candida*® se muestra en la figura 12 observando un color verde para *C. albicans*, azul para *C. tropicalis*, rosa para *C. glabrata*, rosa pálido para *C. krusei* y beige para otras especies como *C. parapsilosis*.

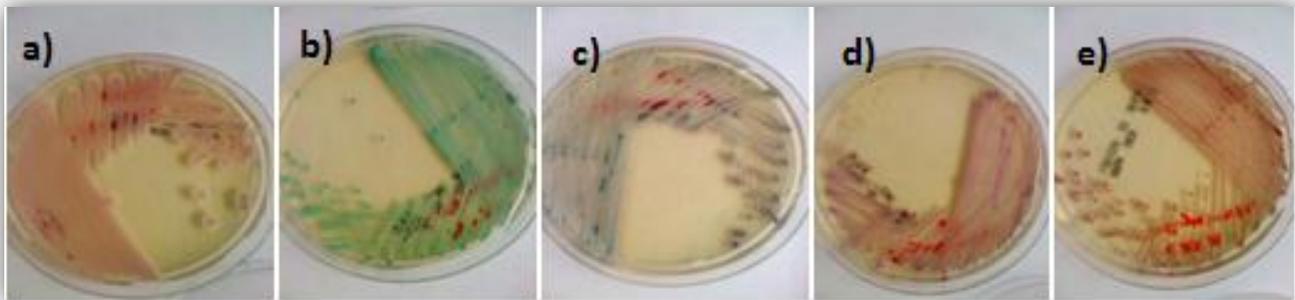


Figura 12. Gamma de colores en CHROMagar *Candida*® de cepas ATCC.

a) *C. krusei*, b) *C. albicans*, c) *C. tropicalis*, d) *C. glabrata* y e) *C. guilliermondii*

La gamma de colores para Brilliance Candida® se muestran en la figura 13. Se observa en verde *C. albicans*, azul *C. tropicalis*, café oscuro o marrón *C. krusei* y beige dependiendo de la actividad enzimática de las especies de *Candida*.

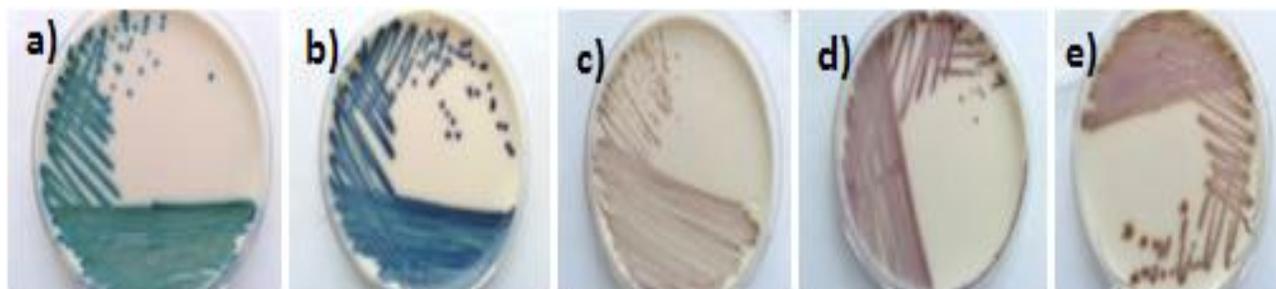


Figura 13. Gamma de colores en Agar Brilliance Candida® de cepas ATCC.

a) *C. albicans*, b) *C. tropicalis*, c) *C. guillermindii*, d) *C. glabrata* y e) *C. krusei*

De acuerdo a los resultados, no hubo variación significativa en cuanto a la morfología colonial de las cepas, y se obtienen la misma gamma de colores en la mayoría de estas a excepción del color café oscuro de *C. krusei* en el Brilliance Candida® ya que en CHROMagar Candida® las colonias de este hongo son color rosa pálido (figura 14). Sin embargo en el medio de interés, la tonalidad en los colores es más intensa, además de que al ser un medio opaco la visibilidad del tono de color es fácilmente observable. En la figura 15 se presenta la coloración obtenida en el medio Agar Brilliance Candida®.

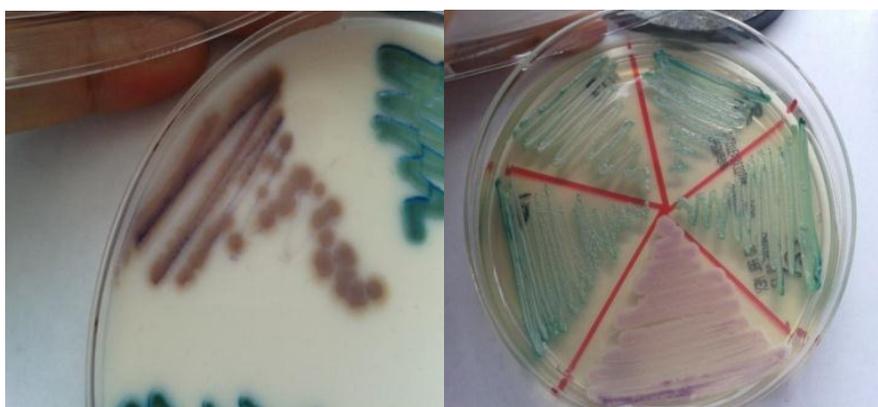


Figura 14. *C. krusei* en el medio BCA y en el medio CHC.

Izquierda: *C. krusei* (color café) en el medio BCA y en la foto de la izquierda *C. krusei* (color rosa) en el medio CHC



Figura 15. Coloración de las colonias de algunas cepas de aislamiento clínico en el HIMFG en el medio Agar Brillante Candida® de lado izquierdo y CHROMagar Candida® lado derecho.

Derecha: En azul se presentan las cepas de *C. tropicalis*, en verde *C. albicans* y en amarillo *C. parapsilosis*. Izquierda: En azul *C. tropicalis*, en verde *C. albicans* y en amarillo *C. parapsilosis*

Cabe mencionar que, algunas de las cepas de *C. tropicalis* no mostraron el azul oscuro como se observa en la figura 16, ya que en 3 cepas la pigmentación mostró un tono morado, esto pudo deberse a que las cepas no son de recién aislamiento, sino que, son cepas aisladas en los años 2004 a 2008, por lo tanto la actividad enzimática se ve afectada por el tiempo de congelación y el uso que se les ha dado hasta la fecha, sin embargo, se realizó para estas nuevamente el ID32C® las cuales fueron identificadas satisfactoriamente como *C. tropicalis* en un 99.9%.

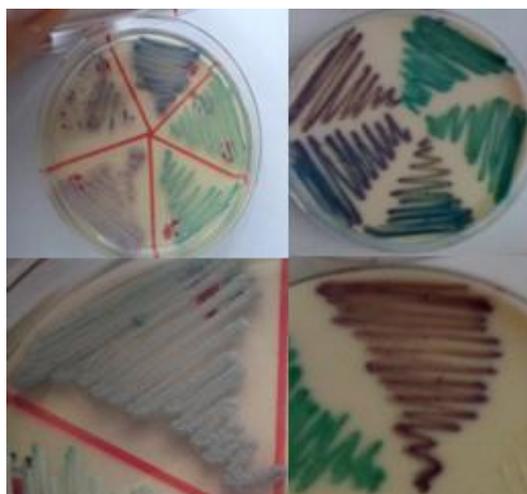


Figura 16. Pigmentación colonial de *C. tropicalis* en el medio Agar Brillante Candida® y CHROMagar Candida®.

(Puede notarse que la coloración no es la esperada en el BCA en comparación con las cepa control ATCC).

En cuanto a los otros géneros, aunque también hacen cambio de color en el medio, es diferenciable de *Candida* ya que las colonias son de aspecto cerosas. La finalidad de sembrar géneros diferentes a *Candida* fue para corroborar que no se presenten falsos positivos en el medio y que solo es capaz de identificar las especies de *Candida* referidas por el fabricante. (Figura 17)

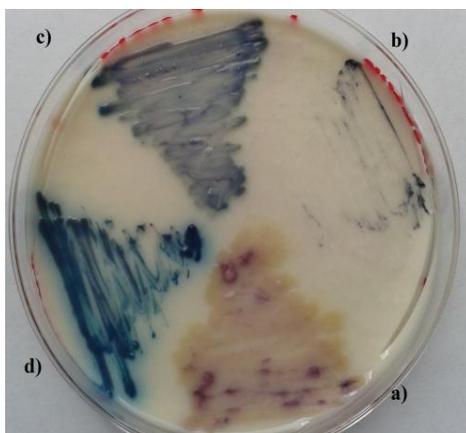


Figura 17. Morfología y coloración de cepas diferentes a *Candida* en el medio Agar Brilliance Candida®.

a) *Geotrichum capitatum*, b) *Rhodotorula rubra*, c) *Trichosporon mucoides*, d) *Schizosaccharomyces pombe*.

El BCA tiene la capacidad de identificar especies de *Candida* por la presencia de dos enzimas: fosfatasa alcalina que es producida por *C. krusei* y hexosaminidasa producida por *C. tropicalis* y *C. albicans*. Éstas enzimas tienen la capacidad de degradar los sustratos cromogénicos presentes en el medio de cultivo el BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolfosfato) y X-NAG (N-acetil- β -D-Glucosamina) respectivamente.

En la tabla 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidos con los diferentes métodos utilizados en la identificación morfológica de los aislamientos. Recordando que se toman como positivas las cepas que es capaz de identificar cada medio según las indicaciones del fabricante.

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos en los medios CHROMagar Candida® y Agar Brillance Candida®

No. de Cepa	Género/Especie	CHC	BCA	No. de Cepa	Género/Especie	CHC	BCA
2	<i>C. albicans</i>	+	+	79	<i>C.tropicalis</i>	+	+
4	<i>C. tropicalis</i>	+	+	80	<i>C.tropicalis</i>	+	+
10	<i>C.parapsilosis</i>	-	-	82	<i>C.tropicalis</i>	+	+
13	<i>C.albicans</i>	+	+	84	<i>C.tropicalis</i>	+	+
14	<i>C.parapsilosis</i>	-	-	88	<i>C.parapsilosis</i>	-	-
19	<i>C.albicans</i>	+	+	90	<i>C.tropicalis</i>	+	+
28	<i>C. albicans</i>	+	+	91	<i>C.albicans</i>	+	+
30	<i>C.parapsilosis</i>	-	-	95	<i>C.albicans</i>	+	+
31	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	109	<i>C.albicans</i>	+	+
32	<i>C. tropicalis</i>	+	+	115	<i>C.albicans</i>	+	+
33	<i>C. tropicalis</i>	+	+	120	<i>C. krusei</i>	+	+
35	<i>C. albicans</i>	+	+	122	<i>C. albicans</i>	+	+
45	<i>C. albicans</i>	+	+	124	<i>C. parapsilosis</i>	-	-
47	<i>C. albicans</i>	+	+	126	<i>C. albicans</i>	+	+
51	<i>C. tropicalis</i>	+	-	153	<i>C. tropicalis</i>	+	+
53	<i>C. albicans</i>	+	+	168	<i>C. parapsilosis</i>	-	-
58	<i>C. albicans</i>	+	+	176	<i>C. albicans</i>	+	+
64	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	181	<i>C. albicans</i>	+	+
69	<i>C. albicans</i>	+	+	21	<i>G. capitatum</i>	-	-
70	<i>C. tropicalis</i>	+	-	---	<i>S. pombe</i>	-	-
72	<i>C. tropicalis</i>	+	-	---	<i>T. mucoides</i>	-	-
73	<i>C.albicans</i>	+	+	387	<i>C. neoformans</i>	-	-
74	<i>C.albicans</i>	+	+	---	<i>C. gattii</i>	-	-

En la figura 18 se muestra que no hay diferencias entre los medios cromogénicos en la identificación de las especies. La barra azul representa las especies de interés identificadas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*; mientras que la barra roja representa las especies no identificadas, *C. parapsilosis* y los géneros diferentes a *Candida*, reiterando que se tomaron como positivas las especies identificadas por el medio de cultivo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

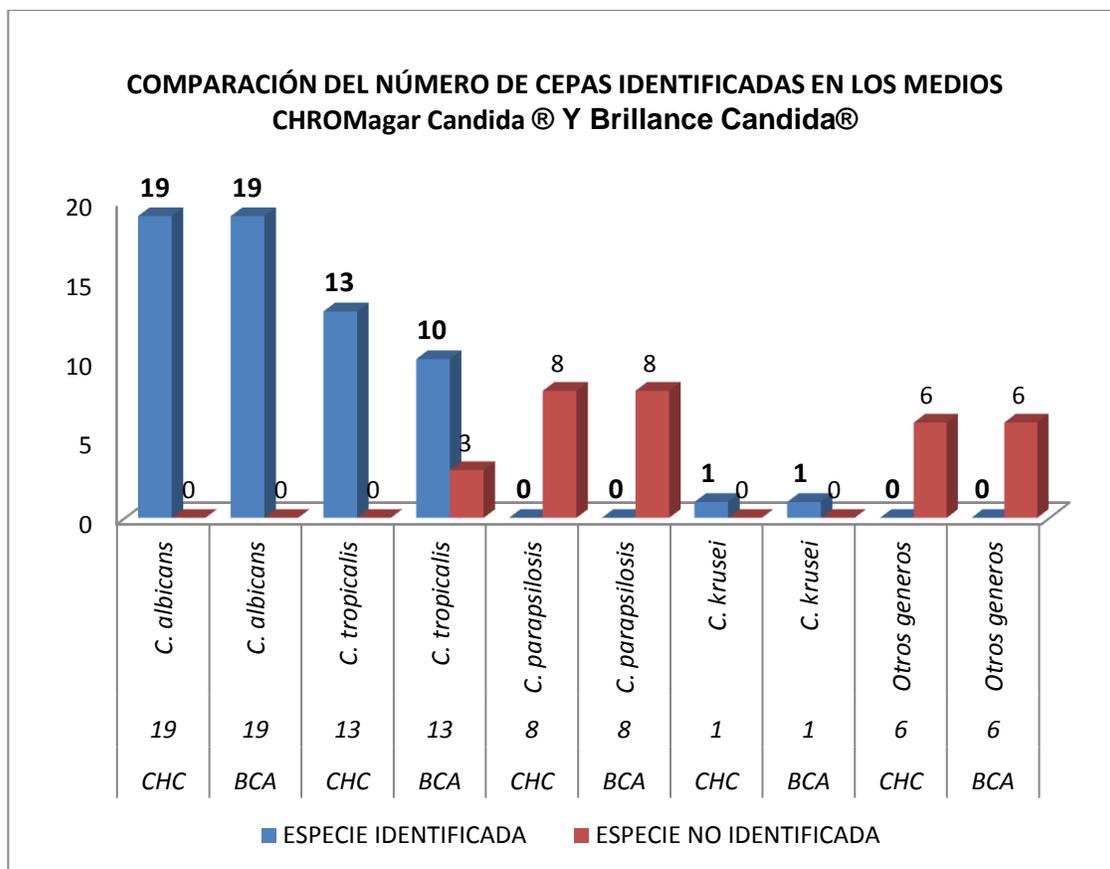


Figura 18. Comparación de la identificación de las cepas utilizadas entre el CHC y el BCA.

Otra prueba comparada con el CHROMagar Candida® fue el Sistema de Identificación Bioquímica OXOID, en donde se utilizaron 19 cepas de *C. albicans*, 1 de *C. krusei* y 4 cepas de otros géneros (*Geotrichum*, *Trichosporon*, *Rodhotorula* y *Schizosaccharomyces*). La tabla 4 muestra las cepas utilizadas así como el resultado obtenido en cada ensayo.

Tabla 4. Presencia de la producción de las enzimas L- Prolin aminopeptidasa y β -galactosaminidasa por *Candida* y otras levaduras

No. de cepa	Género/Especie	Presencia de L- Prolin aminopeptidasa	Presencia de β -Galactosaminidasa
ATCC 14053 Control positivo	<i>C. albicans</i>	+	+
ATCC 22019 Control negativo	<i>C. parapsilosis</i>	-	+
2	<i>C. albicans</i>	.+	+
13	<i>C. albicans</i>	+	+
19	<i>C. albicans</i>	+	+
28	<i>C. albicans</i>	+	+
45	<i>C. albicans</i>	+	+
47	<i>C. albicans</i>	+	+
51	<i>C. albicans</i>	+	+
70	<i>C. albicans</i>	+	+
74	<i>C. albicans</i>	+	+
79	<i>C. albicans</i>	+	+
95	<i>C. albicans</i>	+	+
109	<i>C. albicans</i>	+	+
115	<i>C. albicans</i>	+	+
122	<i>C. albicans</i>	+	+
126	<i>C. albicans</i>	+	+
176	<i>C. albicans</i>	+	+
181	<i>C. albicans</i>	+	+
21	<i>G.capitatum</i>	-	-
---	<i>T. mucoides</i>	-	-
---	<i>R. rubra</i>	-	+
---	<i>S. pombe</i>	-	+

Esta prueba consiste en la detección de las enzimas β - galactosaminidasa y L-prolin-aminopeptidasa. Se observa que todas las cepas de *C. albicans* tienen la capacidad de sintetizar dichas enzimas para la degradación de los sustratos p-nitrofenol-N-acetil- β -D-glucosamina y L-prolinil-7-amido-4-metilcumarina presentes en la tarjeta de prueba. Lo cual se pone en evidencia al adicionar el revelador correspondiente para cada sustrato, NaOH y DMAC (Dimetilacetamina) respectivamente, dando como resultado una coloración amarilla y magenta.

En las tablas 3 y 4 se observa que todas las especies de *C. albicans* producen las enzimas antes mencionadas, mientras que otras especies y otros géneros no las producen a excepción de *Schizosaccharomyces pombe*. Reiterando que se considera como positivo si hay presencia de ambas enzimas y como negativo si hay presencia de una o ninguna de ellas, puede notarse que para *Schizosaccharomyces pombe*, da positivo para ambas enzimas, ya que se ha encontrado que este hongo produce galactosaminidasa y ciertos tipos de aminopetidasa. (Figura 19).

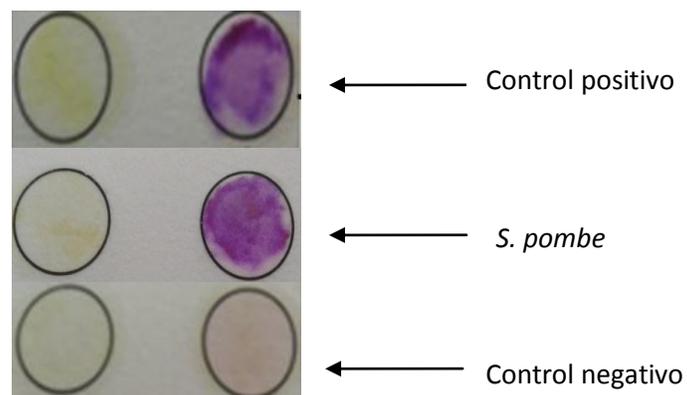


Figura 19. Comparación de *S. pombe* con un control positivo y un control negativo.

En la tabla 5 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en cada prueba para la identificación de especies de *Candida*, puede notarse que la especie de interés identificada por esta prueba coincide con el medio CHC por lo que se considera que no se observan diferencias entre éstos.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos en el CHROMagar Candida® y la tarjeta de prueba OBIS

No. de Cepa	Género/Especie	CHC	OBIS
2	<i>C. albicans</i>	+	+
4	<i>C. albicans</i>	+	+
10	<i>C. albicans</i>	+	+
13	<i>C. albicans</i>	+	+
14	<i>C. albicans</i>	+	+
19	<i>C. albicans</i>	+	+
28	<i>C. albicans</i>	+	+
30	<i>C. albicans</i>	+	+
31	<i>C. albicans</i>	+	+
32	<i>C. albicans</i>	+	+
33	<i>C. albicans</i>	+	+
35	<i>C. albicans</i>	+	+
45	<i>C. albicans</i>	+	+
47	<i>C. albicans</i>	+	+
51	<i>C. albicans</i>	+	+
53	<i>C. albicans</i>	+	+
58	<i>C. albicans</i>	+	+
64	<i>C. albicans</i>	+	+
69	<i>G. capitatum</i>	-	-
70	<i>T. mucoides</i>	-	-
71	<i>R. rubra</i>	-	-
73	<i>S. pombe</i>	-	-
74	<i>C. krusei</i>	+	-
79	<i>C. albicans</i>	+	+

En la figura 20 se puede observar que no hay diferencias en la identificación de las especies con el CHROMagar Candida® y el OBIS. La barra naranja representa las especies identificadas como *C. albicans*, mientras que la barra café representa las especies no identificadas como *C. albicans*. Notándose que la tarjeta presenta buenos resultados para la identificación de este hongo.

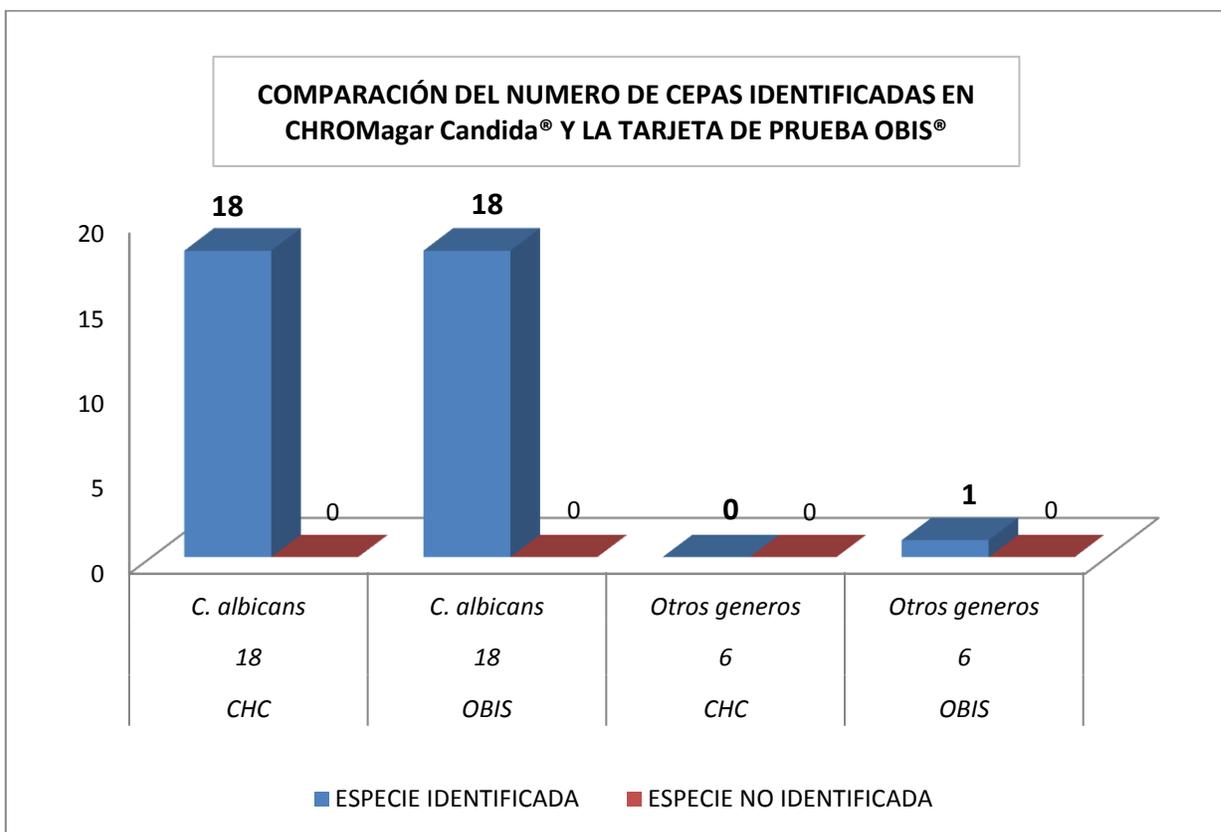


Figura 20. Comparación de la identificación de las cepas utilizadas entre el CHROMagar Candida® y el OBIS

Para garantizar que no hay diferencias significativas entre el Agar Brillante Candida® y el OBIS con el CHROMagar Candida®, con ayuda del programa SPSS, se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada método (el análisis estadístico de cada prueba se presenta en el anexo J).

El análisis descriptivo de los resultados en el SPSS, se realizaron tablas de contingencia de 2x2 (anexo J) que muestran la proporción de cepas identificadas por cada método a prueba, en las que se puede observar que las proporciones no son idénticas por lo que se evaluó con el mismo programa si hay significancia entre los métodos mediante la prueba χ^2 , obteniéndose un valor de $\chi^2 = 0.448$ y un valor de P de 0.503 en la evaluación del BCA, mientras que para el OBIS se tiene una χ^2 de 0.762 y un valor de P de 0.383.

Tomando en cuenta que se utilizó un intervalo de confianza del 95%, un valor de significancia (α) del 0.05 ($P < 0.05$) y comparando con el resultado obtenido se tiene que, al ser el valor de P mayor que α en ambos casos, **la hipótesis nula no se rechaza.**

Por lo tanto hay relación entre las variables debido a que no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Recordando que la hipótesis nula planteada hace referencia a que hay relación entre las pruebas de identificación para especies de *Candida*, y obteniéndose una correlación del CHC y el BCA del 90.90% y del 94.73.

El panel del sistema remel RapID Yeast Plus® está constituido por una galería en la que cada pozo tiene un sustratos como carbohidratos y cromógenos (figura 21) que van a ser degradados por ciertas enzimas, es decir, este sistema se basa en la utilización de ciertas sustancias por algunos hongos levaduriformes, este es a lo que se le conoce como zimograma. (En el Anexo G se muestran los principios y componentes de la galería)

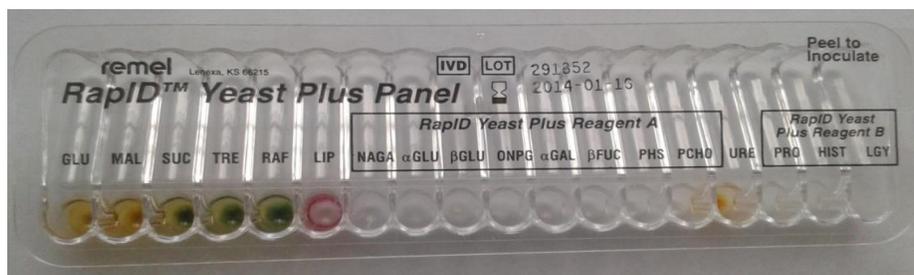


Figura 21. Panel del sistema de identificación bioquímica RapID Yeast Plus®

Para el estudio de este sistema se utilizaron 12 especies de los géneros *Candida*, una de *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* y *Schizosaccharomyces*. Una vez obtenido el resultado de cada panel (Anexo H), este es introducido en la base de datos ERIC® para obtener un código que da el porcentaje de probabilidad de que sea el hongo en estudio, los códigos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Código y porcentaje de identificación de las cepas utilizadas para el ensayo.

No. cepa	Género/Especie	Código	% de identificación
2	<i>C. albicans</i>	307011	99.9% <i>C. albicans</i>
4	<i>C. tropicalis</i>	712014	99.9 % <i>C. tropicalis</i>
10	<i>C. parapsilosis</i>	106031	95.6% <i>C. lusitaniae</i>
14	<i>C. parapsilosis</i>	550002	99.9% <i>C. glabrata</i>
21	<i>G. capitatum</i>	006032	79.5 % <i>Hassenula winger</i>
32	<i>C. tropicalis</i>	717006	99.9% <i>C. tropicalis</i>
45	<i>C. albicans</i>	303011	99.9% <i>C. albicans</i>
47	<i>C. albicans</i>	303013	99.9% <i>C. albicans</i>
53	<i>C. albicans</i>	303011	99.9% <i>C. albicans</i>
120	<i>C. krusei</i>	100002	99.9% <i>C. krusei</i>
387	<i>C. neoformans</i>	707040	99.9% <i>C. neoformans</i>
ATCC 10231	<i>C. albicans</i>	303013	99.9% <i>C. albicans</i>
ATCC 14053	<i>C. albicans</i>	303013	99.9% <i>C. albicans</i>
ATCC 14116	<i>C. neoformans</i>	707040	99.9% <i>C. neoformans</i>
ATCC 34449	<i>C. lusitaniae</i>	106411	94.8% <i>C. parapsilosis</i>
----	<i>C. gattii</i>	000040	98.2% <i>C. neoformans</i>
----	<i>S. pombe</i>	-----	No identificado

Se observa en la tabla 6 que el sistema RapID Yeast Plus® no identificó correctamente algunas de las especies utilizadas, notando también que el sistema no diferencia correctamente a dos especies, *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae*. En el anexo I se presenta una tabla de los géneros y especies de hongos levaduriformes que identifica el panel así como el porcentaje de pruebas positivas en cada pozo para cada uno de ellos.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba ID 32 C® y Yeast Plus

No. de Cepa	Género/Especie	YPS	ID 32C®
2	<i>C. albicans</i>	+	+
4	<i>C. tropicalis</i>	+	+
10	<i>C. parapsilosis</i>	-	+
14	<i>C. parapsilosis</i>	-	+
21	<i>G. capitatum</i>	-	+
32	<i>C. tropicalis</i>	+	+
45	<i>C. albicans</i>	+	+
47	<i>C. albicans</i>	+	+
53	<i>C. albicans</i>	+	+
120	<i>C. krusei</i>	+	+
387	<i>C. neoformans</i>	+	+
ATCC 10231	<i>C. albicans</i>	+	+
ATCC 14053	<i>C. albicans</i>	+	+
ATCC 14116	<i>C. neoformans</i>	+	+
ATCC 34449	<i>C. lusitaniae</i>	-	+
---	<i>C. gattii</i>	+	+
---	<i>S. pombe</i>	ND	+

ND: No Determinado

Puede observarse que no es tan eficaz en comparación con este último, y como se observa en la figura 22, las diferencias son muy significativas ya que el número de especies identificadas por el Yeast Plus® es muy baja. Es importante reiterar que el Yeast Plus® no es muy eficiente, ya que solo mostró buenos resultados en la identificación de especies de *Candida* a excepción de *C. parapsilosis*. También se tiene buenos resultados en la identificación de *Cryptococcus*.

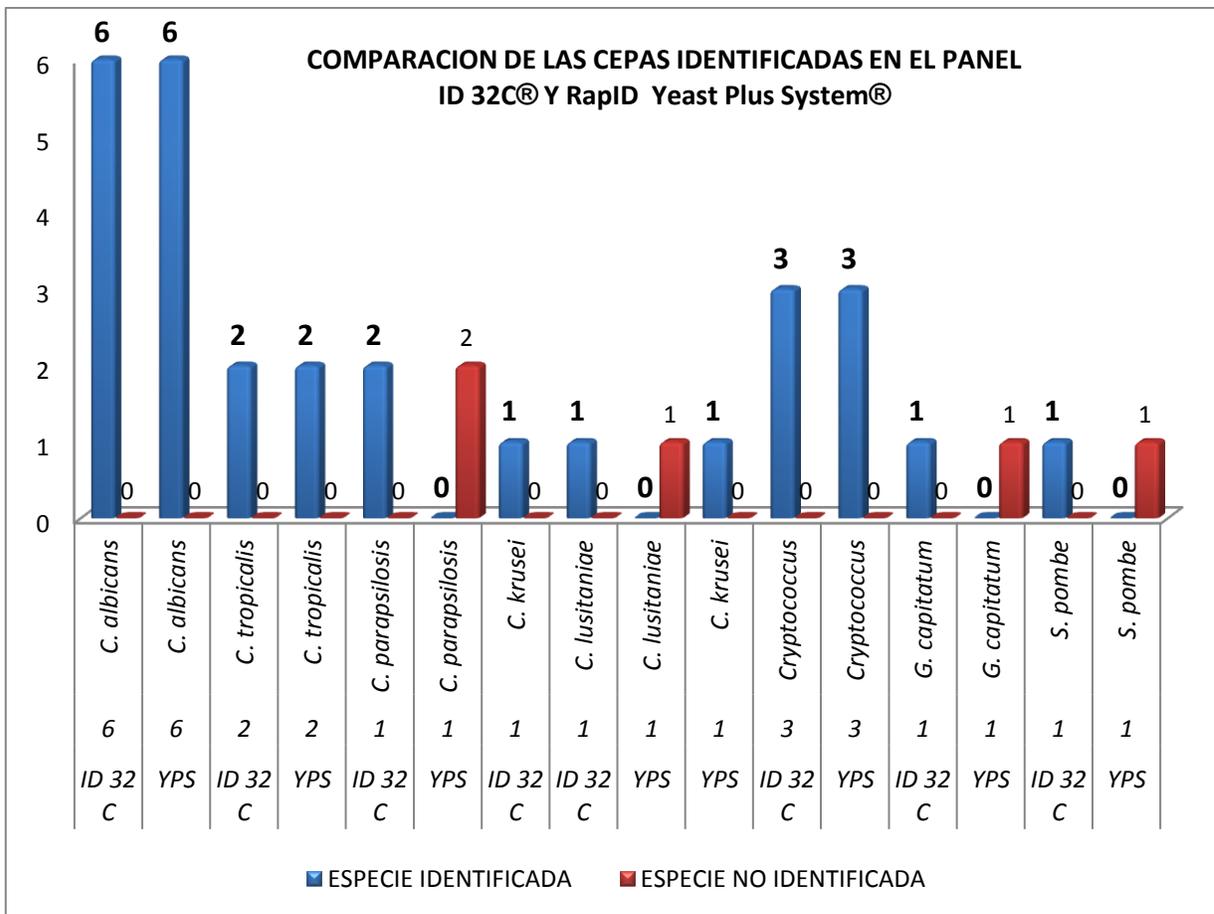


Figura 22. Comparación en la identificación de las cepas entre el ID 32C® y el Yeast Plus®

En el anexo J se muestra la integración de los resultados en una tabla de contingencia mostrando las proporciones de las cepas identificadas. La frecuencia esperada es el porcentaje esperado por el sistema SPSS a partir del número de cepas usadas en el ensayo. Se puede notar claramente que el Yeast Plus® no presentó buen rendimiento en la identificación de los hongos en estudio, por lo tanto, puede decirse que no hay relación entre las pruebas.

Las variables que se consideran que intervinieron para que este método de identificación no presentara buenos resultados fueron el tiempo de incubación, recordando que esta prueba da resultados en cuatro horas, y la temperatura de incubación, en este caso los paneles se incubaron a temperatura ambiente como lo marca el inserto.

Esto comparado con el ID 32 C® el cual se incubaba a 37°C de 24 a 48 horas da más tiempo a los hongos a degradar los sustratos contenidos en cada cúpula del panel, favoreciendo así con la temperatura de incubación, el mantenimiento metabólico del microorganismo así como la reproducción del mismo.

Para corroborar los datos proporcionados por el gráfico y la tabla de contingencia de 2 x 2, de acuerdo al análisis estadístico se tiene una $\chi^2 = 5.8$ y $P = 0.015$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula al encontrar diferencias significativas del Yeast Plus® con respecto al ID 33C®, obteniéndose una correlación del 70.5%.

VII. DISCUSIÓN

Las micosis por hongos oportunistas han ido en aumento, por lo que es de gran importancia que los métodos de diagnóstico sean eficientes y sobre todo que den un resultado rápido, lo que facilita al médico que administre el tratamiento adecuado al paciente y en tiempo oportuno.⁴⁷

El uso de medios de cultivo con sustratos cromogénicos ha sido un gran avance en el reconocimiento temprano de distintas especies de levaduras, en especial para distinguir a especies de *Candida*, tal como observar la presencia de más de una especie en una misma muestra clínica. De esta forma se puede orientar la terapéutica anti fúngica más adecuada hasta tener la tipificación definitiva.⁴⁸

En este estudio se comparó la capacidad de identificación presuntiva de un nuevo medio cromogénico (Brillance Candida®) con CHROMagar Candida® utilizado en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Se pudo notar que ambos medios son útiles para la identificación presuntiva de varias especies de *Candida* tal como lo especifica el fabricante.

Se comprobó que los medios de cultivo CHROMagar Candida® y Agar Brillance Candida® no tienen diferencia significativa de acuerdo al análisis estadístico X^2 obteniéndose un valor de 0.448 y un valor de $P = 0.503$ ($P > 0.05$).

Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio realizado por Alfonso et al⁴⁹, en el que demuestra que ambos medios son similares de acuerdo al grado de concordancia obtenido. Este autor menciona que el medio BCA tiene la capacidad de hacer la identificación presuntiva de otras levaduras, sin embargo esto hallazgos deben ser corroborados por otro estudio.

También se realizó una comparación en el tiempo de aparición de los productos, tanto en medio BCA y CHC y se observó que el tiempo de aparición de la coloración de las colonias del hongo fue después de 60 minutos de que se sembró, mientras que en el medio CHC la coloración se comenzó a presentar coloración a las 4 horas después de la siembra, por lo

que se puede decir que, el medio BCA la identificación presuntiva es más rápida que el CHC, sin embargo, para tener la certeza de ello es necesario realizar otro estudio utilizando cepas de recién aislamiento.

Aunque, actualmente no se tiene un costo establecido para el medio de cultivo en estudio, la elección del BCA o CHC dependerá del costo y de las preferencias del operador, dado que ambos son fáciles de preparar y brindan resultados confiables para la identificación presuntiva, debe recalcar la importancia de seguir las instrucciones de preparación del fabricante, para evitar resultados erróneos.

Otra prueba de identificación comparada con el CHROMagar Candida® es la tarjeta de prueba OBIS para *C. albicans*, no hay estudios realizados en México, sin embargo, el análisis estadístico mostró que hay similitud entre el medio de cultivo y la tarjeta, obteniéndose un valor estadístico de $X^2 = 0.762$ y $P = 0.383$ ($P > 0.05$).

Es importante mencionar que la tarjeta de prueba OBIS es rápida y proporciona los resultados en un tiempo menor a 48 horas. Una vez aislado el patógeno, se inocular en la tarjeta y después de una hora de incubación y al adicionar los reveladores correspondientes se determina si el microorganismo es *Candida albicans* o no.

Es indispensable llevar a cabo las indicaciones del fabricante para obtener resultados favorables, y se debe tener en cuenta que la coloración de la mayoría de las colonias es amarilla que puede confundirse con la coloración presentada al adicionar el revelador.

La identificación de los aislamientos micóticos hasta el nivel de especie en un laboratorio clínico requiere del empleo de procedimientos rápidos y precisos, porque esta información puede ser importante para orientar al tratamiento antifúngico. En otras razones, la importancia de identificar estos organismos en cuanto a género y especie, se encuentran las epidemiológicas, ya que esto permite ampliar el conocimiento de estas especies desde el punto de vista clínico y micológico.⁵⁰

Hasta ahora, los procedimientos para la identificación de hongos levaduriformes se basan en varias pruebas, incluida la habilidad de asimilar azúcares como única fuente nutricional. De las pruebas fisiológicas y bioquímicas se han derivado como ya se mencionó, los ensayos de asimilación (auxograma) y fermentación (zimograma) para la identificación de levaduras.

Para la identificación confirmativa de diferentes hongos levaduriformes se tiene el panel de prueba ID 32C® que se basa en la asimilación del hongo para crecer en presencia de compuestos de carbono y nitrogenados. Este sistema se utiliza con frecuencia para la estandarización de diferentes pruebas diagnósticas y es el utilizado en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Se evaluó la capacidad de un nuevo sistema de identificación para hongos levaduriformes RapID Yeast Plus System®, este zimograma fue comparado con el auxograma ID 32C®, dicho estudio reveló que el RapID Yeast Plus no es de gran eficacia para la tipificación. En el análisis estadístico se obtuvo una χ^2 de 7.286 y un valor de P de 0.007 ($P > 0.05$), deduciendo que no hay relación con la prueba estándar.

Los resultados obtenidos no coinciden con otros estudios realizados, Sanguinetti y col.⁵¹ concluyeron que el sistema RapID Yeast plus® es un buen método de identificación para levaduras, ellos lo compararon con el VITEK 2, con ID 32C® y el API 20C®. Otro estudio realizado por Stockman y col.⁵² en el que compararon el RapID Yeast Plus System con el API 20 C® determinaron que tienen un 95% de correlación entre ellos.

Aunque el sistema RapID Yeast Plus® es fácil de preparar y da resultados 4 horas después de la inoculación del panel, se tiene que tomar en cuenta que la suspensión preparada para la inoculación debe tener características especificadas por el fabricante y que debe hacerse en lo posible que cada pozo contenga aproximadamente el mismo volumen para evitar resultados erróneos.

La única diferencia que tiene el RapID Yeast Plus® con el ID 32C® es que éste debe incubarse es de 48 a 72 horas después de la inoculación del panel, y aunque el tiempo de procesamiento es más prolongado la confiabilidad en el diagnóstico es alta.

El RapID Yeast Plus®, además de que no mostró buenos resultados, se observó que no es capaz de diferenciar a *C. parapsilosis* de *C. lusitaniae*, así como géneros de *Geotrichum*, por lo que el sistema puede utilizarse únicamente para la identificación de especies de *Candida* y *Cryptococcus* spp.

En la actualidad se cuentan con diversos métodos, los cuales varían en tiempo de ensayo, especificidad, sensibilidad, costos, etc. Varios sistemas existen en el mercado, como: API 20C®, API ID32 C®, panel MicroScan®, Vitek®, entre otros, con la finalidad de simplificar y acelerar la identificación de los hongos. No obstante, estos poseen elevados precios, elemento que limita su uso en la rutina del laboratorio clínico.

En cuanto a las pruebas de identificación evaluadas en el trabajo, la diferencia en costos es un poco superior a las pruebas estandarizadas, esto es debido a la poca rotación en el mercado de estos productos (OBIS®, RapID Yeast Plus System®, BCA®) debido a que son productos de recién ingreso al mercado. En el anexo K se muestran la comparación de precios con diferentes distribuidores.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis estadístico, se comprobó que dos de los tres métodos en estudio son útiles para su uso en el diagnóstico, el medio Agar Brillante Candida® y el sistema de identificación bioquímica para *Candida albicans*, al mostrar buena correlación con el CHROMagar Candida® el cual fué utilizado como prueba estándar.

Cabe mencionar que todas las cepas utilizadas fueron previamente identificadas con el sistema ID 32C®, que también se utilizó como el estándar de oro para la comparación con el sistema RapID Yeasts Plus®, y de acuerdo al análisis estadístico no presentó buenos resultados ya que no hay relación, su capacidad de identificación es muy baja.

Existen numerosas pruebas para la identificación de hongos levaduriformes, tomando en cuenta características morfológicas y bioquímicas los cuales requieren de tiempo prolongado para un diagnóstico certero. Sin embargo, a pesar de que el Yeasts Plus® proporciona resultados en un tiempo menor a 48 horas, no resultó muy eficiente para el diagnóstico, no obstante, puede utilizarse únicamente para sospechas de candidosis o criptococosis realizando también pruebas adicionales para confirmar.

En referencia a los costos, la diferencia no es muy alta en comparación con las pruebas que en este caso se utilizaron de referencia, por lo que la elección del método de identificación dependerá de cada laboratorio y de acuerdo a sus posibilidades y sobre todo a la confiabilidad de la prueba.

X. ANEXOS

ANEXO A

Agar Dextrosa Sabouraud®

Tabla 8. Composición del medio SDA.

Ingrediente	Cantidad
Digerido enzimático de caseína	10 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada c.b.p	1 L

Preparación del medio

Suspender 65 g de medio deshidratado en 1 L de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes evitando el sobrecalentamiento. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, dispensar en placas Petri estériles y mantener en refrigeración.

ANEXO B

CHROMagar *Candida*®

Tabla 9. Composición del CHROMagar *Candida*®.

Ingrediente	Cantidad
Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Mezcla cromogénica	2 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada para	1 L

Preparación del medio

Disolver 20 g de CHROMagar *Candida* en 250 mL de agua destilada estéril. Calentar la mezcla hasta disolución completa. El medio no requiere esterilización por autoclave, sin embargo, después de enfriarlo en el baño de agua a 45°C, el agar puede ser vertido en placas. Después de solidificadas, las placas deben almacenarse a 4°C hasta su uso.

Agar *Brilliance*™ *Candida*®

Tabla 10. Composición del Agar *Brilliance*™ *Candida*®.

Ingrediente	Cantidad
Peptona	4 g
Mezcla cromogénica	13.6 g
Cloranfenicol	0.25 g
Agar	13.6 g
Agua destilada c.b.p	1 L

Preparación del medio

Suspender 15.6 g de medio deshidratado en 500 mL de agua destilada. Añadir un vial de suplemento selectivo del medio *Brilliance*™ *Candida* (cloranfenicol), al cual previamente se le añadirán 5 mL de etanol al 70%. Mezclarse cuidadosamente y llevar a ebullición agitando frecuentemente. Este medio no se puede esterilizar en autoclave, por lo que una vez preparado se debe enfriar a 45°C y se colocará en placas Petri estériles.

ANEXO C

Tabla 11. Composición de la galería del ID 32 C®.

Cúpulas	TEST	Substrato	Cantidad (mg/cúpula)
1.0	GAL	D-Galactosa	0.70
1.1	ACT	Cicloheximida (ACTidiona)	0.014
1.2	SAC	D-SACarosa	0.66
1.3	NAG	N-Acetil-Glucosamina	0.64
1.4	LAT	Acido LAcTico	0.64
1.5	ARA	L-ARAbinosa	0.70
1.6	CEL	D-CELibiosa	0.66
1.7	RAF	D-RAFinosa	2.34
1.8	MAL	D-MALtosa	0.70
1.9	TRE	D-TREalosa	0.66
1.A	2KG	2-cetoGluconato potásico	1.09
1.B	MDG	Metil- α -D-Glucopiranosida	1.92
1.C	MAN	D-MANitol	0.68
1.D	LAC	D-LACtosa (origen bovina)	0.70
1.E	INO	INOsitol	0.70
1.F	0	Sin substrato	---
0.0	SOR	D-SORbitol	2.72
0.1	XYL	D-XILosa	0.70
0.2	RIB	D-RIBosa	0.70
0.3	GLY	GLIcerol	0.82
0.4	RHA	L-RHAMnosa	0.68
0.5	PLE	PaLatinosa	0.66
0.6	ERY	ERItrol	1.44
0.7	MEL	D-MELibiosa	0.66
0.8	GRT	GlucuRonaTo sódico	0.76
0.9	MLZ	D-MeLeCitosa	0.66
0.A	GNT	GlucoNaTo de potasio	0.92
0.B	LVT	Ácido LeVulinico	0.48
0.C	GLU	D-GLUCosa	0.78
0.D	SBE	L-SorBosa	0.70
0.E	GLN	GLucosamiNa	0.68
0.F	ESC	ESCulina	0.28

ANEXO D

Composición del Medio API C 7MI

Tabla 12. Componentes del medio API C del ID32 C®.

Ingrediente	Cantidad
Sulfato amónico	5 g
Fosfato monopotásico	0.31 g
Fosfato dipotásico	0.45 g
Fosfato disódico	0.92 g
Cloruro sódico	0.1 g
Cloruro cálcico	0.05 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
L-Histidina	0.005 g
L-Triptofano	0.02 g
L-Metionina	0.02 g
Agente gelificante	0.5 g
Solución de vitaminas	1 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Agua desmineralizada cts.	1000 mL

ANEXO E

Sistema RapID Yeast Plus

Tabla 13. Componentes del panel del Sistema RapID™ Yeast Plus®.

N° de pocillo	Código de la prueba	Ingredientes de los reactivos	Cantidad (%)
1	GLU	Glucosa	1.0
2	MAL	Maltosa	1.0
3	SUC	Sacarosa	1.0
4	TRE	Trehalosa	1.0
5	RAF	Rafinosa	1.0
6	LIP	Ester de ácido graso	1.0
7	NAGA	p-nitrofenil-N-acetil- β ,D-galactosaminidina	0.05
8	α GLU	p-nitrofenil- α ,D-glucósido	0.05
9	β GLU	p-nitrofenil- β ,D-glucósido	0.05
10	ONPG	p-nitrofenil- β ,D-galactósido	0.05
11	α GAL	p-nitrofenil- α ,D-galactósido	0.05
12	β FUC	p-nitrofenil- β ,D-fucósido	0.05
13	PHS	p-nitrofenil fosfato	0.05
14	PCHO	p-nitrofenil fosforilcolina	0.05
15	URE	Urea	0.3
16	PRO	Prolina β -naftilamida	0.01
17	HIST	Histidina β -naftilamida	0.01
18	LGY	Leucil-glicina β -naftilamida	0.01

ANEXO F

Tabla 14. Interpretación de la prueba Rapid Yeast Plus®

Cavity #N° de pocillo	Código de la prueba	Reactivo	Reacción		Comentario
			Positivo	Negativo	
1	GLU				
2	MAL				
3	SUC	Ninguno	Amarillo	Azul, verde-azul, o verde	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo bien definido.
4	TRE				
5	RAF				
6	LIP	Ninguno	Amarillo	Rojo, rosa, naranja o dorado	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo limón bien definido.
7	NAGA				
8	αGLU				
9	βGLU				
10	ONPG	Reactivo Rapid™ Yeast Plus A	Amarillo	Transparente o botón cremoso	El desarrollo de cualquier tono de amarillo se debe puntuar como positivo
11	αGAL				
12	βFUC				
13	PHS				
14	PCHO				
15	URE	Ninguno	Rojo o rojo-naranja oscuro	Amarillo, amarillo-naranja o naranja	Sólo se puntuará como positivo el desarrollo de un color rojo o rojo-naranja oscuro. Los demás tonos de naranja se puntuarán como negativo.
16	PRO	Reactivo Rapid™ Yeast Plus B	Morado, rojo o rosa oscuro	Transparente, pajizo, naranja o rosa de pálido a intermedio	Sólo se puntuará como positivo el desarrollo de un color bien definido morado, rojo o rosa oscuro. Los tonos pálidos se puntuarán como negativos.
17	HIST				
18	LGY				

*NOTA: Los paneles se deben leer mirando a través de los pocillos de reacción sobre un fondo blanco.

ANEXO F

Test Test Test Test Prueba	Cavity Cavité Kammer-Nr. Pozetto Pocillo	Positive Reactions Réactions positives Positive Reaktionen Reazioni positive Reacciones positivas	Negative Reactions Réactions négatives Negative Reaktionen Reazioni negative Reacciones negativas
GLU	1		
MAL	2		
SUC	3		 
TRE	4		
RAF	5		
LIP	6		  
URE	15	 	 
NAGA	7		
αGLU	8		
βGLU	9		
ONPG	10	Any yellow color Toute couleur jaune Jede Gelfärbung Qualsiasi colore giallo Cualquier tono de amarillo	 
αGAL	11		
BFUC	12		
PHS	13		
PCHO	14		
PRO	16		
HIST	17	  	  
LGY	18		

Figura 23. Guía de colores RapID®.

Se muestran los colores típicos de reacción positivos (+) y negativos (-).

ANEXO G

Cepas clínicas utilizadas en el estudio

Tabla 15. Cepas del género *Candida* utilizadas en el estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes en el HIMFG.

No. de Cepa	Género y Especie	No. de Cepa	Género y Especie
2	<i>C. albicans</i>	73	<i>C. albicans</i>
4	<i>C. tropicalis</i>	74	<i>C. albicans</i>
10	<i>C. parapsilosis</i>	79	<i>C. tropicalis</i>
13	<i>C. albicans</i>	80	<i>C. tropicalis</i>
14	<i>C. parapsilosis</i>	82	<i>C. tropicalis</i>
19	<i>C. albicans</i>	84	<i>C. tropicalis</i>
28	<i>C. albicans</i>	88	<i>C. parapsilosis</i>
30	<i>C. parapsilosis</i>	90	<i>C. tropicalis</i>
31	<i>C. parapsilosis</i>	91	<i>C. albicans</i>
32	<i>C. tropicalis</i>	95	<i>C. albicans</i>
33	<i>C. tropicalis</i>	109	<i>C. albicans</i>
35	<i>C. albicans</i>	115	<i>C. albicans</i>
45	<i>C. albicans</i>	120	<i>C. krusei</i>
47	<i>C. albicans</i>	122	<i>C. albicans</i>
51	<i>C. tropicalis</i>	124	<i>C. parapsilosis</i>
53	<i>C. tropicalis</i>	126	<i>C. albicans</i>
58	<i>C. albicans</i>	153	<i>C. tropicalis</i>
64	<i>C. parapsilosis</i>	168	<i>C. parapsilosis</i>
69	<i>C. albicans</i>	176	<i>C. albicans</i>
70	<i>C. tropicalis</i>	181	<i>C. albicans</i>
72	<i>C. tropicalis</i>		

ANEXO G

Cepas ATCC utilizadas en el estudio

Tabla 16. Cepas ATCC de *Candida* utilizadas en el estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes en el HIMFG.

No. de Cepa	Género y Especie
ATCC 390M	<i>Candida krusei</i>
ATCC CB5138	<i>Candida glabrata</i>
ATCC 38	<i>Candida guilliermondii</i>
ATCC 123	<i>Candida tropicalis</i>
ATCC 14053	<i>Candida albicans</i>
ATCC 34449	<i>Candida lusitaniae</i>
ATCC 10231	<i>Candida albicans</i>
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>
ATCC 14116	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Cepas clínicas diferentes a *Candida* utilizadas en el estudio

Tabla 17. Cepas utilizadas en el estudio comparativo de tres pruebas de identificación para hongos levaduriformes en el HIMFG

No. de Cepa	Género y Especie
387	<i>Cryptococcus</i>
21	<i>neoformans</i>
---	<i>Geotrichum capitatum</i>
---	<i>Cryptococcus gattii</i>
---	<i>Schizosaccharomyces</i>
---	<i>pombe</i>
---	<i>Trichosporon</i>
---	<i>mucoïdes</i>
---	<i>Rhodotorula rubra</i>

ANEXO H

Tabla 18. Principios y Componentes de la galería del Sistema RapID Yeast Plus®.

Nº de pocillo	Código de la prueba	Ingredientes de los reactivos	Cantidad	Principio
1	GLU	Glucosa	1,0%	La utilización del hidrato de carbono da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
2	MAL	Maltosa	1,0%	
3	SUC	Sacarosa	1,0%	
4	TRE	Trehalosa	1,0%	
5	RAF	Rafinosa	1,0%	
6	LIP	Éster de ácido graso	1,0%	La hidrólisis del ácido graso da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
7	NAGA	p-nitrofenil-N-acetil-β,D-galactosaminida	0,05%	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril-sustituido o fosfoéster libera σ- o p-nitrofenol amarillo que es detectado con ayuda del reactivo RapID™ Yeast Plus A.
8	αGLU	p-nitrofenil-α,D-glucósido	0,05%	
9	βGLU	p-nitrofenil-β,D-glucósido	0,05%	
10	ONPG	o-nitrofenil-β,D-galactósido	0,05%	
11	αGAL	p-nitrofenil-α,D-galactósido	0,05%	
12	βFUC	p-nitrofenil-β,D-fucósido	0,05%	
13	PHS	p-nitrofenil fosfato	0,05%	
14	PCHO	p-nitrofenil fosforilcolina	0,05%	
15	URE	Urea	0,3%	La hidrólisis de la urea da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH e inducen el cambio del indicador.
16	PRO	Prolina-β-naftilamida	0,01%	La hidrólisis enzimática del sustrato de arilamida libera β-naftilamina que se detecta con el reactivo RapID™ Yeast Plus B.
17	HIST	Histidina β-naftilamida	0,01%	
18	LGY	Leucil-glicina β-naftilamida	0,01%	

ANEXO I

Resultados de la utilización de sustratos en el Sistema RapID Yeast Plus®.

Tabla 20. Utilización de los componentes de la galería por hongos levaduriformes.

Cepa/ galería	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
10	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
14	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
32	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
45	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
47	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
53	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
120	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
387	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ATCC 10231	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
ATCC 14053	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
ATCC 14116	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ATCC 34449	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>C. gattii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. pombe</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-

ANEXO J

Tabla 21. Diagrama diferencial del Sistema RapID Yeast Plus®.

Microorganismo	GLU	MAL	SUC	TRE	RAF	LIP	NAGA ^g	αGLU	βGLU	ONPG	αGAL	βFUC	PHS	PCHO	URE	PRO ^g	HIST	LGY
<i>Aureobasidium pullulans</i>	29	4	19	5	0	74	84	81	80	1	81	7	92	78	96	95	18	90
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	16	9	8	6	4	74	0	21	41	0	0	0	5	2	0	5	98	96
<i>Candida albicans</i>	96	94	2	14	1	3	90	94	4	0	0	0	76	2	1	99	36	9
<i>C. apicola</i>	98	0	94	1	1	0	0	1	1	0	2	7	2	9	0	0	96	95
<i>C. ciferri</i>	3	0	2	0	0	58	96	79	94	0	11	2	0	86	2	0	55	11
<i>C. colliculosa</i>	98	5	98	97	1	0	0	95	90	1	0	2	89	0	3	99	86	66
<i>C. famata^a</i>	90	0	77	4	8	0	0	49	74	7	7	2	76	26	0	99	18	4
<i>C. glabrata^b</i>	98	8	2	96	2	24	1	4	11	0	1	0	1	1	0	0	29	13
<i>C. guilliermondii</i>	91	0	92	4	38	3	0	63	40	0	70	1	91	88	7	99	70	29
<i>C. intermedia</i>	98	44	96	74	72	1	0	33	99	0	0	0	96	32	0	96	97	28
<i>C. kefyri^c</i>	97	7	98	3	92	6	0	4	93	73	0	88	0	0	3	1	16	4
<i>C. krusei</i>	99	1	1	1	0	1	0	0	26	0	0	0	1	0	9	0	69	35
<i>C. lambica</i>	96	0	0	0	0	4	0	0	8	0	0	0	90	91	1	92	78	8
<i>C. lusitanae</i>	99	0	10	8	0	2	0	97	98	0	0	0	90	88	6	99	66	6
<i>C. marina</i>	95	0	0	0	0	0	0	1	98	95	0	92	88	90	2	98	92	2
<i>C. parapsilosis</i>	98	3	4	0	0	2	0	94	9	0	0	1	80	77	4	98	15	6
<i>C. rugosa</i>	0	0	0	0	0	84	14	0	2	60	0	0	16	5	2	16	77	9
<i>C. stellatoidea</i>	98	95	1	9	2	9	95	95	6	1	1	1	81	2	2	0	42	9
<i>C. tropicalis^d</i>	98	64	87	84	3	4	14	95	5	0	1	1	60	67	2	1	31	28
<i>C. utilis</i>	98	1	96	1	96	4	0	2	90	0	1	5	88	92	2	17	90	85
<i>C. zeylanoides</i>	7	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	12	2	1	98	2	1
<i>Cryptococcus albidus</i>	86	61	81	69	11	14	0	90	92	0	1	18	90	88	90	70	61	11
<i>Cr. Humicolus^a</i>	8	3	0	0	2	1	38	86	90	0	98	66	88	93	81	65	17	36
<i>Cr. laurentii</i>	4	0	1	0	0	0	1	81	77	0	91	16	88	85	98	8	5	4
<i>Cr. neoformans</i>	68	16	44	5	11	3	15	12	36	0	0	0	11	1	98	1	2	2
<i>Cr. terreus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	98	0	74	70	70	98	66	21
<i>Cr. uniguttulatus</i>	2	2	2	2	0	2	1	1	96	2	8	13	23	19	99	95	25	39
<i>Geotrichium spp.</i>	2	0	0	0	0	2	0	0	84	0	0	71	1	0	1	0	90	61
<i>Hanseniaspora guilliermondii / uvarum</i>	98	0	0	0	5	2	0	2	98	0	0	81	0	1	0	1	16	2
<i>Hansenula wingei</i>	98	0	0	0	0	2	1	90	97	0	0	90	90	93	0	13	90	24
<i>Kluyveromyces spp.</i>	98	2	98	2	96	2	0	13	7	0	0	0	6	2	0	55	3	37
<i>Pichia anomala^f</i>	99	22	96	1	94	2	0	90	98	0	0	82	86	88	2	1	31	7
<i>Prototheca wickerhamii</i>	98	76	85	92	74	64	0	1	0	0	0	0	66	90	1	90	8	3
<i>P. zopffii</i>	98	70	80	63	71	8	0	0	2	0	0	1	90	1	0	3	15	5
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	1	1	1	1	33	0	34	0	0	1	33	2	1	99	96	5	3
<i>R. minuta</i>	2	2	2	2	1	38	3	90	81	0	2	88	23	2	98	29	7	21
<i>R. rubra</i>	9	6	5	3	2	46	0	64	2	0	0	0	28	26	97	99	71	62
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	24	96	1	92	2	1	85	82	5	9	1	3	1	1	1	66	44
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	97	98	88	96
<i>Trichosporon beigelii</i>	5	0	1	1	0	47	79	46	93	0	71	58	60	64	78	43	47	62
<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	0	0	0	0	95	0	0	32	0	0	1	73	61	3	98	90	86

ANEXO K

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

MEDIOS DE CULTIVO CROMOGÉNICOS

Tabla 21. Tabla de contingencia de 2x2 de los medios cromogénicos CHC® y BCA®

			Identificación		Total
			Si	No	
Medio de cultivo	CHC	Recuento	33	14	47
		Frecuencia esperada	33.0	14.0	47.0
	BCA	Recuento	30	17	47
		Frecuencia esperada	33.0	14.0	45.0
Total	Recuento		63	31	94
	Frecuencia esperada		66.0	28.0	92.0

Tabla 22. Análisis estadístico de los medios cromogénicos CHROMagar Candida® y Brilliance Candida®

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0.448	1	0.503		
Corrección por continuidad	0.143	1	0.705		
Razón de verosimilitudes	0.448	1	0.503		
Estadístico exacto de Fisher				0.570	0.353
Asociación lineal por lineal	0.443	1	0.506		

CHROMagar Candida® y OBIS®

Tabla 23. Tabla de contingencia de 2x2 del sistema OBIS y CHROMagar Candida®

			Identificación		Total
			Si	No	
Panel de identificación	CHROMagar Candida	Recuento	19	5	24
		Frecuencia esperada	19.0	5.0	24.0
	OBIS	Recuento	18	6	24
		Frecuencia esperada	19.0	5.0	24.0
Total		Recuento	37	11	48
		Frecuencia esperada	38.0	10.0	48.0

Tabla 24. Análisis estadístico del OBIS® y CHROMagar Candida®

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0.762	1	0.383		
Corrección por continuidad	0.190	1	0.663		
Razón de verosimilitudes	0.775	1	0.379		
Estadístico exacto de Fisher				0.666	0.333
Asociación lineal por lineal	0.746	1	0.388		

SISTEMA RAPID YEAST PLUS® E ID 32C®

Tabla 25. Tabla de contingencia de 2x2 del Sistema Yeast Plus® e ID 32C®

		Identificación		Total	
		Si	No		
Panel utilizado	ID 32C	Recuento	17	0	17
		Frecuencia esperada	14.5	2.5	17.0
	Yeast	Recuento	12	5	17
		Frecuencia esperada	14.5	2.5	17.0
Total	Recuento		29	5	34
	Frecuencia esperada		29.0	5.0	34.0

Tabla 26. Pruebas de chi-cuadrado del Yeast Plus® e ID 32C®

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5.862	1	0.015		
Corrección por continuidad	3.752	1	0.53		
Razón de verosimilitudes	7.798	1	0.005		
Estadístico exacto de Fisher				0.044	0.022
Asociación lineal por lineal	5.690	1	0.17		

ANEXO L

COMPARACION EN COSTO DE LAS PREUBAS EN ESTUDIO

PRODUCTO.	OBSERVACIONES.	MARCA.	PRECIO
DISPOSITIVOS MEDICOS MBM S.A DE C.V			
CHROM AGAR CANDIDA.	10 PZS.	BECTON DICKINSON.	\$ 269.30
ID 32 C.	25 GALERIAS	BIOMERIEUX.	No disponible
AGAR BRILLANCE CANDIDA.	MEDIO PARA PREPARAR	OXOID.	\$ 8,339.00
RapID Yeast Plus System	20 PANELES	REMEL.	\$ 1,569.00
OBIS	TARJETA DE PRUEBA	OXOID.	\$ 4,865.00
DISTRIBUIDORA BIOGAMA			
CHROM AGAR CANDIDA.	10 PZS.	BECTON DICKINSON.	\$ 269.30
ID 32 C.	25 GALERIAS	BIOMERIEUX.	\$ 4,515.14
AGAR BRILLANCE CANDIDA.	MEDIO PARA PREPARAR	OXOID.	No disponible
RapID Yeast Plus System	20 PANELES	REMEL.	No disponible
OBIS	TARJETA DE PRUEBA	OXOID.	No disponible
REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL DE LABORATORIO S.A DE C.V			
CHROM AGAR CANDIDA.	10 PZS.	BECTON DICKINSON.	\$ 252.50
ID 32 C.	25 GALERIAS	BIOMERIEUX.	\$ 5,300.00
AGAR BRILLANCE CANDIDA.	MEDIO PARA PREPARAR	OXOID.	No disponible
RapID Yeast Plus System	20 PANELES	REMEL.	No disponible
OBIS	TARJETA DE PRUEBA	OXOID.	No disponible
CENTRO PROVEEDOR DE LABORATORIOS CEPROLAB			
CHROM AGAR CANDIDA.	10 PZS.	BECTON DICKINSON.	\$ 188.50
ID 32 C.	25 GALERIAS	BIOMERIEUX.	\$ 5,079.00
AGAR BRILLANCE CANDIDA.	MEDIO PARA PREPARAR	OXOID.	\$ 6,848.00
RapID Yeast Plus System	20 PANELES	REMEL.	\$ 6,359.50
OBIS	TARJETA DE PRUEBA	OXOID.	No disponible

XI. REFERENCIAS

- ^{10,49}Alfonso C. López M. Arechavala A .Revista Iberoamericana de Micología. (2010). "Identificación presuntiva de Candida spp y de otras levaduras de importancia clínica: Utilidad de Brillance Candida agar". pp. 90-93
- ⁴Arango A., Moreno N. Rev Asoc Colomb Dermatol. (2012). Artículo de revisión "Diagnóstico micológico: del examen directo a los métodos moleculares". Colombia. pp. 76-82.
- ⁹Ayats J. Pemán J. Elsevier. (2010). "Recomendaciones sobre el diagnóstico de las enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica". No. 29. Vol. 1. pp. 39.e1-39.e15.
- ⁴⁷Bial-Aristegui. Revista Iberoamericana. (2002). "El reino de los hongos". pp. 1-4.
- ⁴³Blanco J. L. García E. M. Rev. Iberoamer. micol. (3003). "Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales". 2003. No. 17. pp. S23-S28.
- ¹²Boiron P .Red de Revistas Mexicana de micología. (2004). "Ocurrencia de las micosis: riesgo y expectativas". No. 18. pp. 69-74.
- ⁴¹Bolívar N. Revista electrónica Portales médicos. (2012). "Identificación mediante el sistema Vitek® de bacterias y hongos más frecuentes aislados de 120 muestras líquidas de diálisis peritoneal continua ambulatoria". No. 3. Vol. 9. pp. 18-20.
- ²⁴Cantón E., Viudes A. Rev Iberoam Micol. (2001). "infección sistémica nosocomial por levaduras". No. 18. pp. 51-55.
- ⁴⁵Carnero P.C. Rev. De Neurología. (2005). "Evaluación de Pruebas Diagnósticas". No.40. Capítulo 11. pp. 641-643.
- ⁴⁷Cercenado E., Cantón R. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. (2006). "Diagnóstico microbiológico de las micosis". No. 86. pp. 3540-3547.
- ²⁶Chai L.Y. Warn P. Rev. Microbiol. (2010). "*Candida tropicalis* in human disease". No. 36. Vol. 4. pp. 282-298.
- ²¹Cortés J. A. Rev Chil Infect. (2011). "Métodos de diagnóstico en candidemia: una revisión sistémica de la literatura con meta-análisis". Vol. 28. No. 5. pp. 423-428

⁴⁴Duarte. A. Revista de la sociedad Venezolana de microbiología. (2009). "Modalidades de la prueba del tubo germinativo". No. 29. pp. 66-68.

¹⁸Giusano G. E. Departamento de Micología. Instituto de medicina regional Argentina. (2003). "Hongos levaduriformes aislados de neonatos en unidades de cuidados intensivos". pp. 1-4

⁷Giusiano G., Rojas F. Instituto de Medicina Regional de Argentina, Departamento de Micología. (2002). "Hongos levaduriformes aislados de neonatos en unidades de cuidados intensivos".

¹⁹Gómez J. Rev Esp Quimioter. (2010). "Candidemias nosocomiales: nuevos retos de un problema emergente. Vol. 23. No.4. pp. 158-168

¹⁶Guillem P. (2006). "Microbiología clínica". 6ª ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. pp. 80-92

³⁸Inserto Auxacolor™ 2. Bio Rad. (2008). "Colorimetric sugar assimilation test for identification of the main yeast of medical interest".

⁴²Iriart X., Lavergne A. R. American Society for Microbiology. (2012). "Desempeño del nuevo sistema Vitek 2® en la identificación de hongos de relevancia clínica, utilizando una estrategia eficaz en tiempo". No. 10. pp. 10-11

^{33,39}Koneman W. (2008). "Diagnóstico microbiológico". 6ta ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. pp. 1106-1117, 1179-1180.

^{34, 40,43} Linares S. M. Solis C. F. Rev. Iberoamer micol. (2007) a. "Identificación de levaduras". Vol. 11. No. 1. pp 11:20.

¹Llop H. A. Valdés D.V. Zuazo S.J. (2001). "Microbiología y Parasitología Médicas". Tomo I. La Habana. pp. 459-463.

^{48,50}Lobaina R. T. (2010). "Métodos cromogénicos y fluorogénicos para el diagnóstico de especies de *Candida* de relevancia clínica". Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la salud. La Habana. pp. 14-27.

⁵⁹Lobaina R. T. Revista Cubana. (2010). "Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxograma modificado". No. 1. Vol. 62.

²²López G. Giro M. Revista Argentina de microbiología. (2005). "Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*". No. 37. pp. 16-21.

³⁵Martínez E., García E.J. *Dermatología Rev Mex.* (2008). "Candidiasis cutánea: utilidad del CHROMagar Candida en la identificación de especies". No. 52. Vol. 3. pp. 121-126.

⁵⁸Mella M.S. *Rev Chil Infect.* (2009). "Cloranfenicol e identidad". No. 6. Vol. 26. pp. 560-561

¹⁷Méndez T. J. *Rev. Med Inst Mex Seguro Soc.* (2012). "Micosis invasivas en pacientes inmunodeprimidos". Vol.50. No. 6. pp. 609-614

²⁰Morales M. Y. *Dermatol Rev Mex.* (2013). "Candidemias en un hospital general de la ciudad de México: estudio de sensibilidad antifúngica con el método de microplaca colorimétrica y microdilución en caldo". No. 57. pp. 155.-158

¹³Murray P. R. (2009). "Microbiología médica". 6ta. ed. Ed. Elsevier. España. pp. 679-689.

¹⁴Negrori M. (2009). "Microbiología. Fundamentos y guía práctica". 2da ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 74-86.

²Nester, W.E. (2007). "Microbiología Humana".5° ed. Ed. Manual Moderno. México. pp. 13, 13, 336-342

³¹Padilla D. C. M, Navarrete F. C. *Dermatol Rev Mex.* (2012). "Criptococosis diseminada asociada con VIH". Vol.56. No. 2. pp. 126-131

⁸Pontón J. *Revista Iberoamericana de Micología.* (2002) "Diagnóstico microbiológico de las micosis". No. 19. pp. 25-29.

⁶Pontón J, Palacio A *Revista Iberoamericana de Micología.* (2007). "Avances y limitaciones del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras". pp. 181-186.

⁴⁶Programa de análisis estadístico Statistical Product and Service Solutions (SPSS). (2012) recuperado de: <http://www.gratisprogramas.org/descargar/spss-statistics-19-espanol-full-rg/>

³⁶Quindós Guillermo., Vargas. *Rev. Iberoam Micol.* (2001). "Evaluación micológica de un nuevo medio cromogénico (Candida ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico". No. 18. pp. 23-28.

³⁰Ramos A., Cabero M. *Rev. Esp. Quimioter.* (2012). "Fungemia por *Rhodotorula mucilaginosa*". Vol. 25. No. 1. pp. 76-78

²³Reséndiz S. J., Morales A. J. *Medigraphic.* (2007). "Factores asociados a mortalidad por fungemia causadas por *Candida* sp. en niños. Vol. 64. pp. 91-97

³⁷Rodríguez L.T., Zayas R. Y. Rev Cubana Med. Trop. (2010). "identificación de especies de Candida de importancia clínica con un método auxonograma modificado". No. 1. Vol. 62. pp. 48-57.

³²Romero C. R. (2007). Microbiología y parasitología humana". 3ra. ed. Ed. Panamericana. México D.F. pp. 1228-1230.

^{10,51}Sanguinetti Mauricio. Journal of Clinical Microbiology. (2007). "Evaluation of VITEK 2 and RapID Yeast Plus Systems for Yeast Species Identification: experience at a large clinical microbiology laboratory". Vol. 45. No. 4. pp. 1343-1346.

⁵Silva V .Revista Biomedica. (2005). "Present and future in the diagnosis of invasive fungal infections". Vol. 5. No.7.

⁵²Stockman L. Roberts G. Pincus D. (1998). Journal of clinical Microbiology. No. 4. Vol. 36. pp. 883-886.

²⁷Tapia P.C. Rev. Chil Infect. (2008). "*Candida glabrata*". No. 25. Vol. 4. pp. 293.

²⁹Tapia P. C. Rev Chil Infect. (2009). "*Género Trichosporon*". No. 26. Vol.3. pp. 263-264

²⁸Tapia P.C. Rev Chil Infect. (2010). "*Candida lusitaniae*". No. 27. Vol. 2. pp.153-154.

³Tiroboschi N. I. Revista de historia y humanidades médicas. (2007). "Breve reseña histórica de la micología médica en el último cuarto del siglo XX". Vol. 3. No.1.

¹⁵Tortora G. (2007). "Introducción a la microbiología". 9ª ed. Ed. Panamericana. Buenos aires. pp. 344- 350

²⁵Treviño R. R., González G. J.G. Elsevier. (2012). "*Candida parapsilosis* una amenaza desafiante". No. 14. Vol. 56. pp. 157-165.