



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LEVADURAS DE IMPORTANCIA MÉDICA,
MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LUIS FERNANDO MONTELONGO MARTÍNEZ

México, D.F., Ciudad Universitaria, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: **Profesor:** José Alejandro Bonifaz Trujillo

SECRETARIO: **Profesor:** Javier Araiza Santibáñez

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Adriana Guadalupe Mejía Chávez

2° SUPLENTE: **Profesor:** Eduardo Bonilla Espinoza

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ESTE PROYECTO FUE REALIZADO EN EL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”;
LABORATORIO DE MICOLOGÍA , SERVICIO DE DERMATOLOGÍA.

ASESOR DEL TEMA:

JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

SUSTENTANTE (S):

LUIS FERNANDO MONTELONGO MARTÍNEZ

Índice

1.- Introducción.....	5
1.1.- Planteamiento del problema	5
1.2.- Objetivos generales.....	7
1.2.1.- Objetivos particulares.....	7
1.3.- Hipótesis.....	7
2.- Antecedentes.....	8
2.1.- Importancia de las infecciones fúngicas oportunistas.....	8
2.2.- Infecciones por blastomicetos oportunistas.....	9
2.2.1.- Candidosis.....	10
2.2.1.1.- Epidemiología.....	10
2.2.1.2.- Patogenia.....	10
2.2.1.3.- Aspectos clínicos.....	12
2.2.1.4.- Micología.....	14
2.2.1.5.- Diagnóstico convencional.....	14
2.2.2.-Criptococosis.....	20
2.2.2.1.- Epidemiología.....	20
2.2.2.2.- Patogenia.....	20
2.2.2.3.- Aspectos clínicos.....	21
2.2.2.4.- Micología.....	22
2.2.2.5.- Diagnóstico convencional.....	22
2.3.- Tricosporonosis.....	26
2.4.- Métodos de identificación.....	28
2.4.1.- Estándar de referencia.....	28
2.4.2.- Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	30
2.4.2.1.- Historia y definiciones.....	30
2.4.2.2.- Instrumentación del equipo MALDI-TOF MS.....	34
2.4.2.3.- Fundamento.....	38
2.4.2.4.- Biofísica de los principales fenómenos.....	38
2.4.2.4.1.- Ionización.....	38
2.4.2.4.2.- Desorción y aceleración.....	41

2.4.2.4.3.- Análisis TOF.....	41
2.4.2.4.4.- Detector.....	42
2.4.2.4.5.- Base de datos.....	43
2.4.2.5.- Costos.....	43
2.4.2.6.- Factores pre analíticos.....	44
2.5.- Importancia de la verificación.....	46
3.- Procedimiento experimental.....	50
3.1.- Métodos.....	47
3.1.1.- Población y aislamientos de levaduras.....	47
3.1.2.- Tipo y diseño de estudio.....	48
3.1.2.1- Criterios de inclusión.....	48
3.1.2.2.- Criterios de exclusión.....	48
3.1.2.3.- Criterios de eliminación.....	48
3.2.- Identificación convencional (fenotípica-bioquímica).....	49
3.3.- Identificación molecular.....	49
3.4.- Identificación mediante MALDI-TOF, <i>Vitek-MS</i> [®]	49
3.4.1.- Obtención del espectro de masas.....	50
3.5.- Análisis estadístico.....	52
4.- Resultados.....	54
5.- Discusión.....	59
6.- Conclusiones.....	65
7. Anexos.....	66
7.1.- Materiales.....	66
7.1.1.- Instrumental.....	66
7.1.2.- Reactivos.....	66
7.1.3.- Equipo y software.....	66
7.2.- Abreviaturas.....	67
8.- Bibliografía.....	69

1.- Introducción

1.1.- Planteamiento del problema

El incremento de pacientes con diversos estados de inmunosupresión ha provocado que diversos microorganismos, principalmente oportunistas, y que de inicio, no eran considerados como agentes patógenos (o simplemente no se conocían) emerjan como causantes de diversos cuadros infecciosos. En micología, las enfermedades que provocan estos microorganismos son difíciles de identificar y tratar, debido a la poca información sobre su diagnóstico y terapéutica ^(1,2).

En algunas ocasiones, los datos clínicos y patogenia de la micosis, pueden orientar en la identificación del agente etiológico, sin embargo, existen protocolos para su correcta identificación, en éstos, se presentan con frecuencia factores adversos que complican la identificación, como el crecimiento lento del hongo o la variabilidad bioquímica de la especie, lo que genera resultados discordantes con lo esperado y por ello se retarda su identificación ⁽³⁾, lo cual, incrementa los gastos de hospitalización del paciente y por parte del médico desemboca en un manejo terapéutico inadecuado de la micosis ⁽⁴⁾.

La identificación microbiológica a nivel de especie es fundamental en cualquier laboratorio y debe ser el objetivo principal. Los métodos rutinarios de identificación fenotípica, conocidos como “convencionales” y que corresponden al estudio macro-microscópico de la colonia así como al perfil bioquímico son tardados y su capacidad de identificación puede ser limitada, mientras que, los métodos moleculares; que desde hace más de 20 años se utilizan como “estándar de referencia” resultan ser caros, inoperantes y generan resultados difíciles de interpretar ^(5,6). Como consecuencia, la falla en la identificación de la cepa tiene repercusiones en la epidemiología y tratamiento de estas enfermedades, debido a los diferentes patrones de susceptibilidad *in vitro* e *in vivo* a los agentes antifúngicos más utilizados; por ello la correcta identificación del microorganismo es crucial para la guía terapéutica correcta ^(2, 7, 8).

En la actualidad se cuenta con tecnologías, conocimientos y recursos necesarios para implementar sistemas de identificación microbiológica, comprobados a nivel mundial, que han

demostrado ser seguros, eficientes y rápidos; con el objetivo definir la etiología de las enfermedades y así, establecer un esquema de tratamiento benéfico para el paciente ⁽⁹⁾.

La disponibilidad de tecnología de punta basada en técnicas de proteómica, permite obtener resultados confiables para la identificación de diversos microorganismos; como es el caso del equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF. Este sistema se ha enfocado al campo de la micología para identificar las principales especies de hifomicetos (hongos filamentosos) y blastomicetos (hongos levaduriformes), muchos de los cuales tienen implicaciones médicas. Actualmente, esta técnica comienza a posicionarse como una herramienta complementaria, para la tipificación de cualquier microorganismo.

La técnica además de ser rápida es sencilla, barata a largo plazo, sensible, reproducible y específica, es por esto que ha sido validada por la *FDA (Food and Drug Administration)* para su uso de manera rutinaria en laboratorios clínicos. Sin embargo, es necesario verificar los procedimientos establecidos por la plataforma comercial *Vitek-MS[®]* para la identificación de levaduras mediante este sistema ⁽⁹⁻¹¹⁾.

La verificación se realiza comparando los métodos ya existentes, considerados como estándar de referencia para cualquier identificación microbiológica (biología molecular) contra este nuevo método, ya que de ésta manera podremos asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados ^(12,13). Sólo así podremos utilizarlo, de manera segura, para la identificación de las levaduras más comunes, de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*. Además que, algunas especies de estos géneros, son filogenéticamente muy cercanas y sólo logran identificarse por métodos genotípicos, siendo prácticamente indistinguibles por métodos fenotípicos ⁽¹¹⁾.

Como ejemplos de estas especies llamadas “crípticas” del género *Candida*, con resultados diversos (según el método utilizado) podemos citar la poca discriminación por métodos bioquímicos para *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*/ *Candida africana*/ *Candida stellatoidea*; *Candida glabrata* de *Candida bracarensis* /*Candida nivariensis*; así como las especies del complejo –*psilosis*- *Candida orthopsilosis* /*Candida metapsilosis* y *Candida parapsilosis*; también es difícil discriminar *Candida krusei* de *Candida inospicua* /*Candida*

famata; *Candida tropicalis* de *Candida guilliermondii* / *Candida lusitanae* y finalmente *Candida kefyr* de *Candida zeylanoides* / *Candida lipolytica* ^(7,10, 11).

Mientras que para levaduras del género *Cryptococcus* diversos investigadores han identificado hasta subespecies de *Cryptococcus neoformans* (VNI-VNIV), así como de *Cryptococcus gattii* (VG I-VGIV) ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. La importancia de su correcta identificación, recae en los diferentes patrones de susceptibilidad a los antifúngicos que pueden presentar estas levaduras, por lo cual una identificación errónea influye en el tratamiento óptimo del paciente ^(11, 14, 17).

1.2.- Objetivos generales

- Verificar el procedimiento establecido por la plataforma comercial *Vitek^{MS}* - *Biomérieux[®]* para la tipificación de levaduras de importancia médica mediante el sistema MALDI-TOF MS.

1.2.1.-Objetivos particulares

- Demostrar que el procedimiento del sistema MALDI-TOF MS, puede ser utilizado de manera rutinaria para la identificación de las principales levaduras de importancia médica.
- Tipificar las cepas de levaduras obtenidas de los casos de candidosis y criptococosis de pacientes del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”; mediante MALDI-TOF MS.

1.3.- Hipótesis

Con las cepas de levaduras identificadas previamente por biología molecular, se realizará una correcta etapa pre-analítica, indicada en los protocolos de *Vitek-MS[®]*; para analizarlas mediante el sistema MALDI-TOF MS, y así obtener una identificación a nivel de especie, y demostrar una asociación mayor al 85% con el método de referencia; siempre que la cepa exista en la base de datos. De igual manera, se espera que el sistema MALDI-TOF MS sea mejor que los métodos convencionales (fenotípicos y bioquímicos) para la identificación de levaduras de importancia médica.

2.- Antecedentes

2.1.- Importancia de las infecciones fúngicas oportunistas

Las enfermedades infecciosas son causadas por diversos tipos de bacterias, hongos, parásitos, algas y virus, que poseen distintas propiedades bioquímicas para la colonización, supervivencia y replicación celular; debido a ello, logran adaptarse al huésped causándole daño y enfermedad. ⁽¹⁾ A pesar de los avances tecnológicos, siguen siendo la causa de una elevada mortalidad y morbilidad a nivel mundial ⁽²⁾.

Hasta hace algunas décadas las infecciones micóticas eran menos frecuentes, salvo por las afecciones cutáneas superficiales (dermatofitosis y dermatomicosis), cuya presencia ha sido constante a través del tiempo aunque con algunas variaciones en sus manifestaciones clínicas, extensión y cronicidad. En contraste, las micosis de tipo sistémico han aumentado en forma notoria y su incidencia actual es alta en individuos inmunocomprometidos ⁽²⁾.

El progreso en nuevas técnicas diagnósticas, que incluye, métodos inmunológicos para la detección de componentes fúngicos, principalmente, determinación de galactomanano y 1,3- β -D-glucano (BDG); así como técnicas de biología molecular mediante PCR e hibridación, han permitido diferenciarlos e identificarlos ^(3,11). Pero, debido a diversos factores, el diagnóstico de estas enfermedades se sigue basando en la correlación de la sospecha clínica, análisis de factores de riesgo, manifestaciones de la enfermedad, cultivo e identificación fenotípica ^(2,3).

Actualmente los estudios taxonómicos mediante el concepto conocido como *phylogenetic species recognition* (PSR) que consistente en la secuenciación de varios genes y su posterior análisis filogenético, trae como consecuencia, el incremento del número de especies fúngicas potencialmente patógenas para el ser humano ^(2,18). Por ello, se han definido nuevas especies y delimitado géneros complejos, demostrando la existencia de nuevas especies que, tradicionalmente, se habían considerado como crípticas o simples morfo-especies, muchas de las cuales sólo son diferenciables molecularmente. Es frecuente que estas especies difieran en virulencia y en su respuesta a los antifúngicos por lo que su correcta identificación es de especial importancia para evitar el tratamiento empírico. ^(4, 11, 19).

La industria farmacéutica ha respondido a la necesidad de desarrollar nuevos y mejores antifúngicos con menor toxicidad y con un espectro amplio. Pero, aún no existe un medicamento panfúngico efectivo. Es improbable que la frecuencia de las micosis disminuya en las próximas décadas, por ello los clínicos deben estar conscientes del diagnóstico oportuno para el tratamiento de estas enfermedades ^(2,3).

2.2.- Infecciones por blastomicetos oportunistas

Existen micosis ocasionadas por hongos oportunistas, que en condiciones normales forman parte de la microbiota del ser humano y que se comportan como microorganismos saprofitos sin producir enfermedad. Hoy en día, a pesar de los avances clínicos y tecnológicos en el campo de la salud, estas enfermedades lejos de desaparecer se incrementan. Se han establecido ciertas condiciones o factores de predisposición, asociados al huésped, para que se pueda establecer la enfermedad micótica, entre ellos: enfermedades que comprometen el estado inmunitario del hospedero, como por ejemplo pacientes diagnosticados con HIV-SIDA, cáncer, síndromes hematológicos y metabólicos, trasplantados, pacientes con quemaduras, politraumatizados, etc. Mientras que, el desarrollo de potentes antimicrobianos y fármacos citotóxicos que, sin duda, son de gran ayuda en el tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas, pero por otro lado representan una “bomba atómica” para todas las células del organismo. Por si fuera poco el avance en la medicina ha permitido prolongar la vida de pacientes ancianos y niños prematuros, lo cual es una verdadera conquista en el campo de la medicina, pero constituye una población en alto riesgo de adquirir infecciones micóticas graves ⁽¹⁻³⁾.

No hay que dejar de lado las capacidades infectantes y metabólicas de los hongos, que les permiten pasar de saprofitos a patógenos oportunistas; algunas de las cuales son: soportar temperaturas de 37°C o más, realizar un cambio bioquímico-morfológico adecuado para invadir e infectar, así como contar con un arsenal de factores de virulencia que favorezcan dicha adaptación fúngica ⁽³⁾.

Los ejemplos más frecuentes de estas enfermedades a nivel mundial, son candidosis y criptococosis, en esta última aunque el hongo no se encuentra como microbiota del ser

humano, se comporta como patógeno oportunista, bajo las condiciones predisponentes anteriormente citadas, y por ello la enfermedad se considera oportunista ^(2, 20-21).

2.2.1.- Candidosis

Micosis oportunista causada por diversas especies del género *Candida*. Con un amplio espectro de formas clínicas, puede ser crónica o aguda, superficial, profunda o multisistémica. Sin embargo, afecta por lo regular mucosas (boca, vagina, tracto respiratorio y urinario, etc.), piel, uñas, y excepcionalmente pulmones e intestinos ⁽²⁾.

2.2.1.1.- Epidemiología

Enfermedad cosmopolita, causada por levaduras que pueden encontrarse de forma inocua en objetos inanimados, alimentos y ambiente intrahospitalario. Forman parte de la microbiota del cuerpo humano como comensales, por lo cual la mayoría de las veces cuando se afectan las defensas locales o sistémicas se presenta como una infección endógena, aunque se puede adquirir de manera exógena a través de grandes inóculos (traumatismos, soluciones de continuidad, inhalación directa, drogadicción, catéteres contaminados, relaciones sexuales, etc.). Se presenta en cualquier edad, y hay casos reportados de recién nacidos hasta adultos de la 3ra edad ^(2, 3, 22).

Las infecciones por estas levaduras, ocupan el 3er lugar entre los microorganismos más aislados del torrente sanguíneo (después del estafilococo coagulasa negativo y *Staphylococcus aureus*) y es responsable de aproximadamente el 10.1% de las infecciones adquiridas en el ambiente hospitalario; así mismo, ocupa el segundo lugar de las infecciones del tracto urinario; estos datos traen como consecuencia un índice de mortalidad hasta del 49% ^(23, 24). En pacientes con cáncer se ha reportado una reducción gradual de las infecciones por *C. albicans*, que ha sido reemplazado por especies emergentes como *C. glabrata* y *C. krusei*, debido al uso profiláctico de azoles, que genera resistencia ⁽²⁾.

2.2.1.2.- Patogenia

Requiere de varios factores predisponentes, como por ejemplo, el desequilibrio de la microbiota que perturba el microambiente y modifica el pH, acumulación de nutrientes, tratamiento con antimicrobianos, ruptura de barreras, humedad; así como enfermedades que

afecten el sistema inmune a nivel celular, sobre todo en pacientes neutropénicos. La mayor parte de las veces se origina de forma endógena en piel y mucosas. Si es exógeno, se necesita la adaptación enzimática y fenotípica del hongo, así como la función coordinada de la capacidad virulenta de la levadura: enzimas, adaptación al pH, mecanismos de respuesta al estrés, transición morfológica, formación de *biofilms*, dimorfismo inverso, etc. ^(2, 3, 20)

Las especies de *Candida* expresan una serie de factores de virulencia para su establecimiento e invasión. Para permitir la fijación, a la célula huésped, se secretan diversas adhesinas (mananas, aglutininas e integrinas); proteínas y polisacáridos codificados por los genes *HWP1*, *ALS1*, *INTP1* y *MNT1*, que permiten la unión a superficies y favorecen el tigmotropismo.

Se asocia la liberación de enzimas hidrolíticas como aspartil-proteasas (*SAP*'s) para obtener nutrientes a partir de albumina, colágena y queratina; fosfolipasas A-D que rompen enlaces éster presentes en los glicerolfosfolípidos de la célula huésped, así como lipasas que hidrolizan enlaces éster de mono-di y triacilgliceroles ⁽²⁾.

Las levaduras de *Candida* son acidófilas, lo significa que pueden crecer en ambientes ácidos. Sin embargo, logran adaptarse a diversos microambientes y sustratos mediante los genes *PHR*, que se activan e inactivan coordinadamente, por ejemplo, *PHR1* se activa en pH neutro o ligeramente básico y *PHR2*, que se activa en pH ácido ⁽³⁾. Adicionalmente pueden realizar un fenómeno conocido como "transición morfológica", lo que les brinda la capacidad de cambiar morfológicamente al parasitar, de blastoconidio a pseudohifa e hifa verdadera; término definido como "dimorfismo inverso", con ello la forma de pseudohifa es la que marca la infección, excepto en el caso de *C. glabrata* ^(2,3).

El cambio fenotípico llamado "conmutación o *switching*" permite cambios morfológicos; que son controlados por genes los *MTLa* y *MTL α* , lo que significa que a nivel celular, la levadura, puede cambiar de lisa a rugosa y ello, evidentemente, se expresa como cambios en la macromorfología colonial; ésto puede traer un cambio antigénico o bioquímico, a nivel celular, para atacar a la célula huésped y defenderse o evadir la respuesta inmune celular ⁽³⁾. Una propiedad de patogenicidad importante es la formación de *biofilms* o biopelículas, que son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie viva o inerte, donde las levaduras están unidas entre sí por una matriz de polisacárido, estas sustancias unen diversas

capas de microorganismos y brindan alta capacidad defensiva contra el sistema inmune, junto con la resistencia al ataque de antifúngicos ^(2, 25).

2.2.1.3.- Aspectos clínicos

Es polimórfico pero afecta principalmente mucosas, y a diferencia de otras enfermedades su profundidad y gravedad, depende del estado inmune del paciente o factor de predisposición asociado. La principal forma clínica es mucocutánea oral, es una forma pseudomembranosa llamada *thrush* o algodoncillo que afecta a recién nacidos, quienes adquieren la enfermedad a través del canal de parto.

La infección por cepas endógenas se asocia a factores iatrogénicos que reducen la microbiota bacteriana y con ello aumenta el desarrollo de *Candida* en el tubo digestivo, principalmente intestinos, mientras que las exógenas son por inoculación de cepas que puedan formar *biofilms* y permanecer en el ambiente hospitalario ⁽²⁶⁾. El 95% de pacientes inmunosuprimidos (HIV-SIDA, leucemias y linfomas) presentan la forma pseudomembranosa hiperplásica o lengua vellosa que puede extenderse hasta del esófago.

La segunda mucosa afectada con mayor frecuencia es la genital, en hombres y mujeres en edad reproductiva. En mujeres la vulvovaginitis provoca leucorrea; sin mal olor, eritema, y ardor; ésta depende de diversos factores; en su mayoría son hormonales durante la pubertad, mientras que, durante el embarazo se debe a la acumulación de glucógeno que cambia el pH, los altos niveles de progesterona y estrógenos que estimulan el crecimiento de *Candida*; por otro lado, en ancianas es por causa de padecimientos concomitantes como diabetes y antibióticoterapia.

Se calcula que 1/3 de las mujeres embarazadas cursan con candidosis vaginal en el último trimestre del embarazo, de donde la especie que se aísla con mayor frecuencia es *C. glabrata*. En los hombres se debe al incremento de la microbiota o por relaciones sexuales con pareja que cursa con vulvovaginitis y se expresa como balanopostitis y/o balanitis, generando prurito, ardor y pústulas.

La forma cutánea más común queda restringida a los intertrigos pequeños y grandes. Los factores asociados más comunes son, oclusión, humedad, antibióticoterapia, corticoterapia,

obesidad y postración, hacinamiento y mala higiene. Es común en área del pañal, donde la urea se degrada en amoníaco por bacterias y genera irritación, también en pliegue submamario, axilar, inguinal e interdigital; generando placas eritemato escamosas sin borde activo, con pústulas y placas satélites que generan prurito y ardor.

La onicomicosis se presenta con un porcentaje del 85% en uñas de las manos; frecuente en diabéticos, pacientes que han recibido pedicura o manicura, y en personas con exceso de humedad en las manos. La forma clínica más común que corresponde a un 75% de los casos es paroniquia proximal o lateral más perionixis (opacidad de la uña más inflamación y dolor alrededor del borde). Mientras que la onicólisis (desprendimiento de la uña) representa el 25% y es la segunda variedad; aislándose con mayor frecuencia *C. albicans* y *C. parapsilosis* ^(2-3, 21).

En los últimos años se ha incrementado el diagnóstico de candidemia (septicemia candidósica) representando del 10-20% de todas las candidosis y 10% de todas las infecciones del torrente sanguíneo en el medio hospitalario. Es propia de pacientes muy inmunosuprimidos en unidades de cuidados intensivos y en niños prematuros con catéter venoso central o desnutrición. Sus síntomas son vagos; fiebre, perifoliculitis y escalofríos. Se diagnóstica por hemocultivos, detección serológica de antígenos específicos, y actualmente MALDI-TOF MS; aislándose en orden decreciente *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* y *C.tropicalis* ⁽²⁾.

Su capacidad de diseminación a SNC, aunque es de baja frecuencia; causa meningitis y se asocia a pacientes leucémicos, diabéticos, tratados con corticosteroides y después de neurocirugías; es crucial diferenciarlo de la meningitis criptocócica y bacteriana. La candidosis invasiva puede o no estar acompañada de candidemia, afecta con mayor frecuencia corazón, huesos, y piel ⁽²⁾. Se observa con poca frecuencia, debido a que *Candida* no posee ureasa (enzima necesaria para atravesar barrera hematoencefálica) y se asocia a factores de predisposición muy severos; presentando baja respuesta a los antifúngicos. La invasión severa a pulmón ocurre como una diseminación hematógena o por aspiración de grandes propágulos de levaduras, es necesario diferenciar entre fungomas y tumores pulmonares ^(2,3).

En tracto urinario es más frecuente en mujeres y en recién nacidos, son infecciones ascendentes que pueden llegar hasta los riñones y derivar en pielonefritis. En heroinómanos e infecciones por cateterismo crónico la variedad más común es endocarditis; el diagnóstico es difícil y prácticamente indistinguible de la endocarditis bacteriana (fiebre, soplos y fallas cardiacas); realizándose mediante hemocultivos, cultivos repetidos y pruebas serológicas ^(2, 3).

2.2.1.4.- Micología

El género *Candida* comprende más de 200 especies. Mediante biología molecular se les clasifica dentro de la clase de los *Ascomycetes*, por lo cual se consideran “levaduras verdaderas” que pueden formar ascosporas. Sólo 40 especies son consideradas patógenas para el ser humano, pero son 6 u 8 las especies que se reportan con mayor frecuencia, las cuales son *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei* y *C.guilliermondii*; y que curiosamente, a pesar de ser las más aisladas, sólo de algunas se conoce su estado teleomórfico. Además, con menor frecuencia se han reportado infecciones por *C.lusitaniae*, *C.lipolytica*, *C.famata*, *C.kefyr*, *C.rugosa*, *C.pelliculosa* y *C.dublinskiensis* ^(2, 3, 11).

Su forma de reproducción anamórfica más común es mediante blastogénesis o “gemación”, lo cual ocurre por procesos mitóticos, donde la célula se replica, divide y se separa de la “madre” por estrangulamiento, adquiriendo independencia y maduración. Cabe resaltar que si las condiciones son adversas (pocos nutrientes) o al parasitar, la célula “hija” no se desprende de la célula “madre”, se mantienen unidas y se siguen replicando, con lo cual se forman pseudohifas. No producen pigmentos melánicos, y su forma puede variar según la especie, globosa, ovoide, elíptica, cilíndrica, triangular, etc. ^(3, 22).

2.2.1.5.- Diagnóstico convencional

Se realiza a partir de LBA, muestras de piel, mucosas, que se procesan realizando un examen directo con KOH 10%, buscando la presencia de pseudohifas y/o abundantes blastoconidios, estas estructuras indican que *Candida* está parasitando. Las muestras se siembran en medios como ADS, ADS/C CHROMagar *Candida*[®], Biggy, *corn-meal* más Tween 80 al 1%, que se incuban a 30°C, durante 48 horas. En ADS todas las especies de *Candida* forman colonias cremosas, blancas, convexas, muy similar al crecimiento bacteriano. Es necesario utilizar medios de primoaislamiento como agar Biggy, en este medio se permite la oxido-reducción de

sulfitos a sulfuros, lo que otorga una coloración café a los hongos, mientras que, el citrato inhibe el crecimiento bacteriano; por ello la principal ventaja es la eliminación de microbiota bacteriana acompañante del espécimen. Los medios cromogénicos como CHROMagar *Candida*[®], permiten la identificación presuntiva de las especies más comunes basándose en el color de la colonia, coloración obtenida según la asimilación de sustratos, esto también permite la identificación de las especies más comunes, así como de infecciones mixtas. Por otro lado, la utilización de medios especiales como *corn-meal* más Tween 80 al 1%, agar semilla de níger, etc., brindan características microscópicas para cada especie que nos orienta y permite comprobar la especie. La desventaja de estos medios de cultivo es que son pruebas subjetivas. Si, con esto no es posible identificar la especie es necesario emplear pruebas bioquímicas comerciales para completar la tipificación ^(20, 22, 26). La identificación por biología molecular es el estándar de referencia ^(23, 27 28).

Por su frecuencia de aislamiento se han dividido en dos grupos:

- I. (40-85%) ***Candida albicans***
- II. (15%) ***Candida no- albicans***, este grupo comprende diferentes especies y su frecuencia de aislamiento va incrementando. Sus características más relevantes para la identificación fenotípica y genotípica se presentan el cuadro 1 y en las imágenes 1-3.

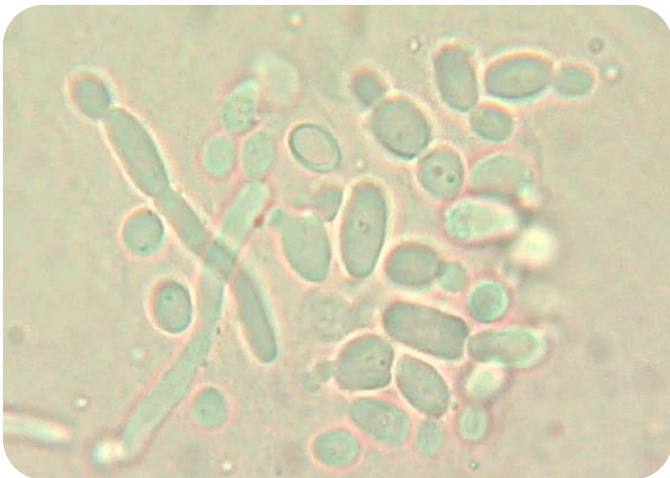


Imagen 1.- Examen directo con KOH 10% de muestra de LBA. Se observa presencia de pseudohifas y blastoconidios. Lo que indica parasitación.

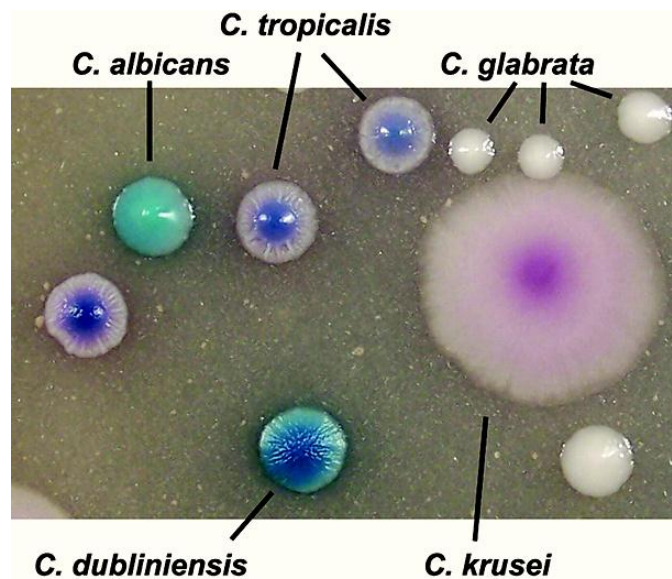


Imagen 2.- Crecimiento de levaduras del género *Candida* en medios cromogénicos (37°C/48h). Su identificación es subjetiva.

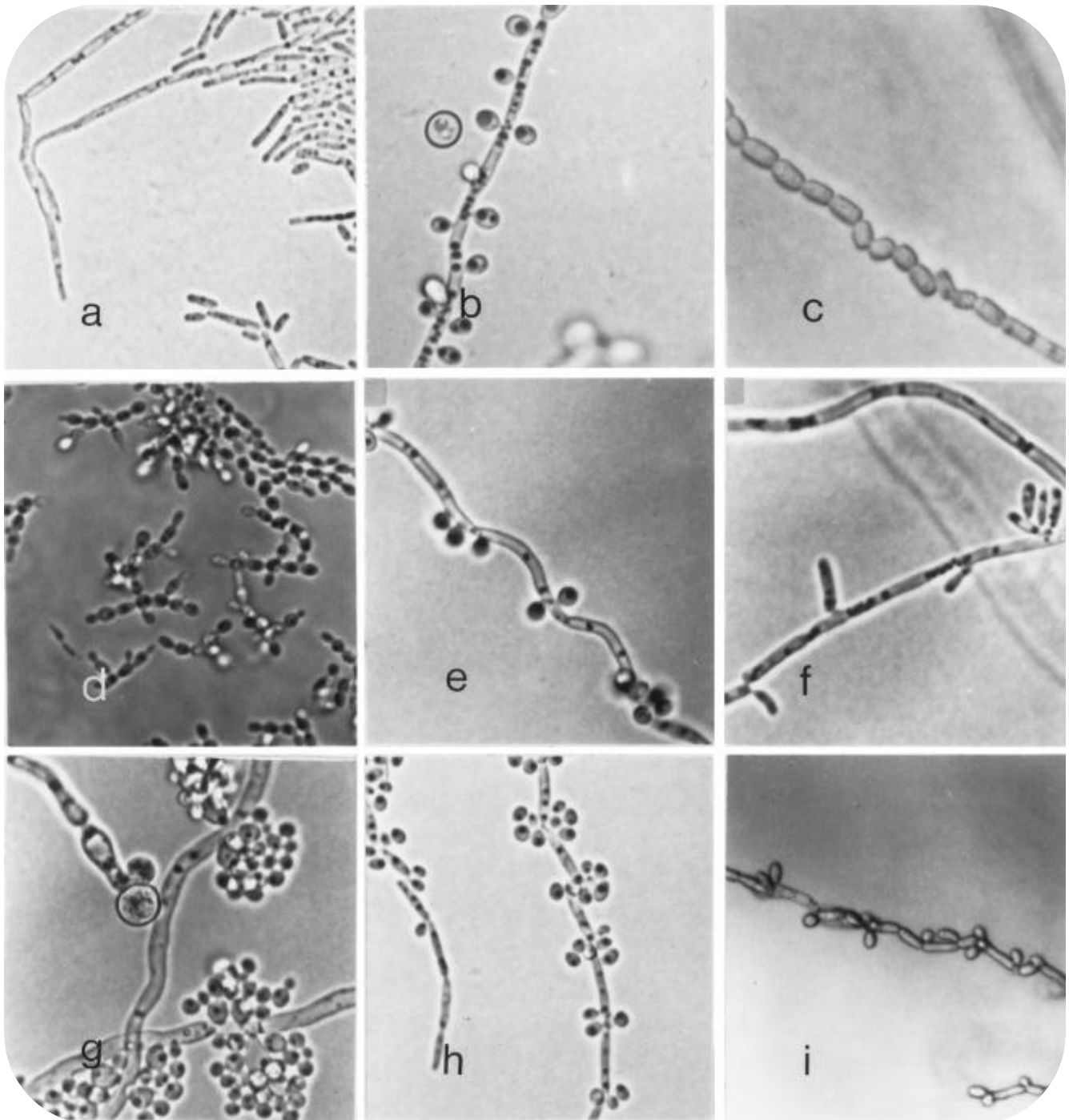


Imagen 3.- Morfología clásica de las principales especies de *Candida*, *Trichosporon* y *Geotrichum* en cornmeal más Tween 80 al 1% [24 horas / 30°C], amplificación 339X. (a) *Candida krusei*: pseudohifas extremadamente elongadas que rara vez ramifican y pocos blastoconidios. (b) *Candida tropicalis*: blastoconidios solitarios entre los septos y abundantes pseudohifas delgadas. (c) *Geotrichum candidum*: arthroconidios. (d) *Candida guilliermondii*: cadenas de blastoconidios formando pseudohifas cortas. (e) *Candida lusitanae*: pseudohifas cortas y curvadas con blastoconidios entre los septos. (f) *Saprochaete capitata*: hifas verdaderas y aneloconidios similares a arthroconidios. (g) *Candida albicans*: blastoconidios en cúmulos, pseudohifas, hifas verdaderas y clamidoconidios solitarios. (h) *Candida parapsilosis*: pseudohifas elongadas ligeramente curvadas con blastoconidios en los septos. (i) *Trichosporon spp*: arthroconidios en cadenas con blastoconidios que nacen de sus esquinas. Tomada y modificada de Murray P, et-al; 2007

Cuadro 1.-Identificación de las diferentes especies de *Candida*

Especie / Grupo	Epidemiología (ref. 3,22, 27)	Convencional (ref. 3,21,22)	Pruebas especiales (ref. 3,22,27,28)	Molecular (ref. 11,26,28)
<i>C. albicans</i>	40-85% de los aislamientos de mucosas y tracto gastrointestinal. Causa hasta el 65% de candidemias Puede formar <i>biofilms</i> Complejo críptico junto con <i>C.africana</i> , <i>C.stellatoidea</i> y <i>C.dubliniensis</i> .	Resistente a cicloheximida	Tubo germinativo (+) ^c	PCR del gen <i>HWPI</i> , banda en región de 941pb PCR del gen <i>PHRI</i> , banda de 1.6Kb. <i>SAP3</i> amplicon de 172pb Secuenciación de ITS2 (análisis de región de 35pb) Microarreglos de DNA Pirosecuenciación
		Colonias verde-claro ^a	Colonias lisas ^d	
		Clamidoconidios intercalares o finales, unidos a una célula alargada de sostén, pseudohifas y cúmulos de blastoconidios ^b	No reduce TTC, rosa-claro	
			Fluorescencia (+) con luz de Wood ^e	
			Crece 45°C	
	Crece en NaCl 6.5% ^f			
	β-glucosidasa (+)			
	Xilosa (+)			
	α-metil-D-glucano (+)			
	Resistencia a azoles por genes homólogos <i>MDRI</i> y <i>ERGII</i>			
	MALDI-TOF			
<i>C. dubliniensis</i> (1995,Sullivan)	Hasta el 6% en pacientes con HIV-SIDA obtenidas de orofaringe. En México se ha reportado un caso de endoftalmítis.	Resistente a cicloheximida	Tubo germinativo (+) ^c	PCR del gen <i>HWPI</i> , banda en región de 569 pb PCR del gen <i>ACTI</i> , banda en región de 288pb. <i>SAP3</i> amplicon de 134pb Secuenciación de ITS2 (análisis de región de 35pb) Microarreglos de DNA
		Colonias verde-oscuro ^a	Colonias rugosas y abundantes clamidoconidios. ^d	
		Blastoconidios en racimos y pseudohifas ramificadas con clamidoconidios finales que se agrupan en pares o en tripletes ^b	Reducción de TTC, colonias marrón	
			NO Fluorece con luz de Wood ^e	
			NO Crece 45°C	
	NO crece en NaCl 6.5% ^f			
	β-glucosidasa (-)			
	Xilosa (-)			
	α-metil-D-glucano (-)			
	Resistencia a fluconazol por genes <i>CdDRI</i> y <i>CdERGII</i>			
	Resistencia a anfotericina B.			
	MALDI-TOF			

C. glabrata	Aislada de un 8-12% a nivel mundial. 2do lugar de candidemias, Frecuente en vulvovaginitis Complejo críptico junto con <i>C. bracarensis</i> y <i>C. nivariensis</i>	Sensible a cicloheximida	No diferenciadas por ID32C ni Vitek 2	PCR del gen <i>RPL31</i> Análisis de multilocus
		Colonias rosa-purpura ^a	Crecimiento en ADS a 30,37 y 42°C para diferenciarlas	
		Única especie que no forma pseudohifas, abundantes clamidoconidios ^b	El 10% de los aislamientos presentan resistencia a fluconazol y algunas sensibilidad intermedia a anfotericina B.	
C. parapsilosis	El número de aislamientos ha incrementado en los últimos 20 años. Forma biofilms y es responsable del 15% de candidemias Menos patogénica. (Tavanti,2008).- Complejo críptico junto con <i>C. metapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> .	Sensible a cicloheximida	Discriminación del complejo mediante MALDI-TOF Biotyper®	Secuenciación de DNA r (ITS2 e ITS4) PCR-RFLP del fragmento del gen <i>SADH</i> utilizando N1aIII, así como PCR-real time del mismo gen. PCR del intrón <i>RPSO</i> , <i>VMA</i> . Taq-Man-MGB-PCR del gen mitocondrial <i>NADH 5</i> . Rep-PCR
		Colonias blancas ^a	La versión de VITEK-MS® no contiene los espectros para discriminar entre estas especies.	
		Abundantes pseudohifas ramificadas, con crecimiento arborescente, con cúmulos de 2-3 blastoconidios ^b	Resistencia a equinocandinas es aleatoria	
C. krusei (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	Se aísla con menos frecuencia de pacientes con granulocitopenia, tumores sólidos e infantes con diarrea.	Sensible a cicloheximida	Resistencia intrínseca a fluconazol	Secuenciación de DNA r (ITS1, ITS4 y 5.8S) con <i>primers</i> universales: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')
		Colonias de color rosa pálido y de borde velloso ^a	Resistencia dosis dependiente a itraconazol y anfotericina B	
		Seudohifas ramificadas, gruesas y cúmulos de blastoconidios ovoides que parecen agruparse en forma de "palillos chinos" ^b	MALDI-TOF	

<i>C.tropicalis</i>	Segunda especie con mayor poder patogénico. Su índice de mortalidad oscile entre 33-90% Comúnmente aislada de pacientes con candidemia y candidosis diseminada.	Sensible a cicloheximida	MALDI-TOF	Secuenciación de DNA r (ITS2 e ITS4)
		Colonias de color azul-metálico ^a		
		Abundantes pseudohifas ramificadas, largas, gruesas que nacen a partir de un cumulo de blastoconidios ovoides ^b		
<i>C. kefyr</i> (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	Raramente causa candidosis y se ha aislado de lesiones cutáneas	Sensible a cicloheximida	MALDI-TOF	Secuenciación de DNA r (ITS2 e ITS4)
		Colonias blancas ^a		
		Abundantes pseudohifas ramificadas largas y gruesas, formada por blastoconidios ovoides ^b		
<i>C. guilliermondii</i> (<i>Pichia guilliermondii</i>)	Se aísla de infecciones cutáneas, vulvovaginitis, y endocarditis. Se considera emergente en Latinoamérica , pero no así en el resto del mundo.	Resistente a cicloheximida, crece formando blanco-amarillentas	MALDI-TOF	Secuenciación de DNA r (ITS2 e ITS4) RFLP
		Colonias blancas ^a	Resistencia intrínseca a anfotericina B	
		Seudohifas con cadenas cortas de blastoconidios ^b	Sensibilidad intermedia a equinocandinas	
<i>C.lusitaniae</i> (<i>Clavispora lusitaniae</i>)	Se ha aislado de pacientes con leucemia, cáncer septicemia y con pielonefritis, así como en recién nacidos.	Sensible a cicloheximida	Difícil de discriminar mediante métodos automatizados de <i>C.tropicalis</i> .	Secuenciación de DNA r (ITS2 e ITS4) Utilizando la enzima <i>MspI</i>
		Colonias rosa tenue ^a		
		Abundantes pseudohifas con cadenas cortas de blastoconidios ^b	Resistencia intrínseca a anfotericina B MALDI-TOF	

Cuadro 1.-Identificación de las diferentes especies de *Candida*. **a=** en CHROMagar *Candida* (37°C, 72 h) ; **b=** en corn-meal más Tween 80 al 1%; **c =** en suero a la 2 ½ horas; **d =** en agar semilla de níger “Steib” (30°C,72 h); **e =** en Agar dextrosa de Sabouraud adicionado con azul de metileno (24 h, 37°C); **f =** en Sabouraud liquido hipertónico con 6.5% de NaCl [p/v]; **TTC=** cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (indica su reducción, por deshidrogenasas con cambio de color de blanco a rojo). **v =** variable; **(+)=** positivo; **(-)** negativo

2.2.2.-Criptococosis

Micosis de tipo sub-agudo o crónico, que se caracteriza por afectar inicialmente pulmones y diseminarse hacia SNC causando cuadros severos de meningitis/ meningoencefalitis ^(2, 29, 30).

2.2.2.1.- Epidemiología

La enfermedad es cosmopolita; a nivel mundial causa más de 1 millón de infecciones por año, con un índice de mortalidad de aproximadamente 650 mil ⁽³⁰⁾. La mayoría de los casos ocurren en pacientes inmunosuprimidos, incluyendo pacientes con HIV-SIDA, pacientes en terapia con inmunosupresores, y pacientes con trasplantes de órganos sólidos ⁽³¹⁾. Aunque con la introducción de la terapia TARGA la incidencia ha disminuido. Los agentes etiológicos y sus variedades, tienen localizaciones geográficas y nichos ecológicos muy diferentes. En climas cálidos es común aislar la especie *C. neoformans* var. *-neoformans-*, mientras que la variedad *-grubii* -tiene mayor distribución en Europa.

La otra especie más agresiva es *C. gattii*, el primer caso reportado fue realizado por Curtis en 1896, a partir de una paciente con un tumor lumbar ⁽³¹⁾. Actualmente es considerada como patógena primaria de humanos y animales; se distribuye en áreas tropicales y subtropicales, siendo endémica en Vancouver, Australia y Brasil ^(2, 14, 32).

En México se han aislado ambas especies de adultos jóvenes del género masculino con HIV-SIDA y otros estados de inmunosupresión severos donde el 90% de los aislamientos corresponden a *C. neoformans* y un 3-5% de *C. gattii*. Algunas publicaciones reportan hasta un 50 % de mortalidad, a pesar del tratamiento.

2.2.2.2.- Patogenia

La vía de entrada es aérea, mediante la inhalación de conidios y/o basidiosporas presentes en guano seco de aves que llegan a los alveolos, generando “primo contacto”, esto cursa de forma asintomática hasta la alteración de la respuesta inmune; iniciada generalmente por deficiencia de linfocitos CD4⁺, como lo son pacientes con HIV-SIDA. El mecanismo de virulencia más interesante de esta levadura es conocido como “*caballo de troya*”, en el cual *Cryptococcus* sp puede dejar de formar su cápsula, momentáneamente, para ser fagocitado por monocitos o macrófagos alveolares, con esto, logra atravesar capilares conservando sus

factores de virulencia; así se transporta vía linfagítica y hematógica hacia SNC, debido a que es en el encéfalo donde hay lignina, un aminoácido del cual pueden obtener una fuente de carbono, además de que el LCR, por ser inocuo; existe menor concentración del factor fungistático anticriptocócico (sistema del complemento). Una vez en cerebro, sale del monocito y se establecen en las meninges e inmediatamente sintetiza su cápsula y melanina para su protección, hasta ser detectado por el sistema inmune generando inflamación. Desde el encéfalo, si las condiciones son adecuadas puede diseminarse hacia vísceras, piel y huesos ^(2, 33).

Sus principales factores de virulencia que favorecen el desarrollo de la enfermedad son **i) Cápsula de glucorono-xilomanano (GXM)** que le brinda protección de la fagocitosis por macrófagos y células dendríticas; disminuye la adhesión del complemento e induce apoptosis celular, **ii) Producción de melanina *in vivo***, a partir de compuestos difenólicos como las catecolaminas del SNC (dopamina, epinefrina, norepinefrina), lo que explica su neurofilia. La melanina evita el estrés oxidativo y térmico; así como la fagocitosis, su formación es a partir de la oxidación de precursores de L- DOPA hasta polimerizar melanina, mediante la enzima laccasa o fenoloxidasa, enzima que también permite la degradación de lignina en cerebro y su desarrollo en materia de descomposición. **iii) La enzima ureasa**, que hidroliza urea en amonio con incremento de pH, le permite a la levadura atravesar la barrera hematoencefálica y explica su asociación a excretas de aves, protegiéndole del estrés osmótico. **iv) Crecimiento a 37-40°C** que le permite adaptarse a las condiciones fisiológicas del hospedero y diferencia al complejo *C.neoformans* / *C.gatti* del resto de las especies de este género. **v) Entrecruzamiento** de células α (*MAT- α*) y a (*MAT-a*) para formar basidiosporas ^(2, 14, 33).

2.2.2.3.- Aspectos clínicos

Tiene diversas manifestaciones, no obstante, la vía de entrada más común es pulmonar, por lo cual la enfermedad inicia aquí, de donde la levadura puede transportarse hacia SNC y de ahí diseminarse a cualquier órgano, y en casos graves a sistemas; causando cuadros de neumonía, meningitis con cefalea y fiebre, aunque, se han dado casos donde se reportan criptococomas en pulmón y cerebro con desenlace fatal. La diseminación y grado de la enfermedad dependen del hospedero y virulencia de la cepa ^(3, 22, 29).

2.2.2.4.- Micología

Cryptococcus es un género de basidiomicetos conformado por 39 especies. Es caracterizado por levaduras globosas, elongadas, mono o multigemantes; estas poseen una pared celular gruesa y contienen inclusiones lipídicas citoplasmáticas, visibles al microscopio. La formación de su cápsula, que depende del microambiente, mide aproximadamente el doble del tamaño de la levadura, aunque no siempre es así y hay cepas con cápsulas pequeñas o sin ella ⁽²⁾. En 1975-76 Kwon-Chung logró obtener las formas teleomórficas de las dos especies más comunes, quedando clasificadas en la división *Basidiomycota* como *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora* con esto se ha logrado conocer más sobre su ciclo de vida. Para *C. neoformans* su nicho ecológico es el guano de aves de corral, palomas y pichones, causando una infección asintomática en el intestino de éstas aves. La variedad *-grubii* - se ha aislado de detritus vegetal y es la más adaptada a soportar temperaturas corporales. Mientras que *C. gattii* es epífita de árboles de floración como el eucalipto, del cual los koalas reciben su única fuente de alimentación; también crece en el aceite de diferentes tipos de árboles como almendros, acacias y ficus utilizados en México para reforestar debido a su rápido crecimiento. De aquí la importancia de relacionar la ecología con epidemiología de la enfermedad ^(3, 22, 33).

Actualmente, un grupo de investigadores ha reconocido un complejo críptico, denominado *C. neoformans/ C. gattii*, con las siguientes especies: *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. deneoformans*, *C. tetragattii*, *C. decagattii* y *C. bacillisporus*; con fenotipos variables, y diferentes susceptibilidades, principalmente a fluconazol ⁽¹⁴⁾. Existen otras especies que en ocasiones se comportan como patógenas oportunistas, las más frecuentes son *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus*, *C. gastricus*. Algunas son similares al microscopio, por lo cual hay que clasificarlas mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas especiales ⁽²²⁾.

2.2.2.5.- Diagnóstico convencional

Se puede realizar a partir de muestras de LCR, LBA y biopsias, pero, la mejor muestra para los casos meníngeos es de LCR. De manera rápida se realiza un examen directo contrastado con tinta china, para identificar levaduras con un halo cápsular bien delimitado. Los medios de cultivo más utilizados son ADS/C, sin cicloheximida porque inhibe su crecimiento. Además es necesario utilizar medios diferenciales, como el agar alpiste negro o níger (*Steib*[®]), todos se

incubadas a 30-37°C, durante 48-72 horas. Si el crecimiento es positivo en ADS/C se observan colonias mucoides, blanco-amarillentas y convexas. Mientras que, en el medio diferencial, se permite la formación de “seudomelanina”, a partir de la utilización de compuestos análogos de DOPA, contenidos en la semilla de alpiste negro, esto confirma la presencia del “complejo” *C. neoformans* / *C.gattii* ^(3,14).

Existen métodos inmunológicos con anticuerpos dirigidos hacia antígeno GXM- cápsular, técnica conocida como (DACAD), así como pruebas de *ELISA*. Cuando existen discrepancias en la identificación de la especie son necesarias pruebas moleculares que son realizadas mediante análisis de multilocus (*MLST*), reacción en cadena de la polimerasa de *STR1* y análisis de *RFLP* del gen *Ura5* ^(3, 15, 31).

Se ha demostrado que las equinocandinas no tienen actividad contra el género *Cryptococcus*, porque su pared celular tiene una mayor proporción de enlaces (1,3)- α -D-glucano; y las equinocandinas actúan mediante inhibición competitiva de la enzima (1,3)- β -D-glucano sintasa por lo cual los enlaces del polímero (1,3)- α -D-glucano no son afectados ⁽³⁰⁾.

Aun no existe un tratamiento diferencial según la especie, a pesar de los diferentes estudios realizados. Aunque, *C. gattii* es considerada más agresiva y su tratamiento requiere de reducir la presión intracraneal, con altas dosis de dexametasona y largas terapias de anfotericina B, sin embargo, el tratamiento de elección para *C. gattii* / *C. neoformans* sigue siendo anfotericina B más fluconazol, debido a que este último puede atravesar la barrera hematoencefálica; con buenos resultados.

Algunos autores han reportado diferencias en los patrones de susceptibilidad *in vitro*, de diversas especies del género *Cryptococcus*. Por ejemplo *C. uniguttulatus*, *C. albidus* y *C. laurentii* han demostrado ser menos susceptibles al fluconazol ^(14-16, 30).

En el cuadro 2 y en las imágenes 4 y 5 se muestran las pruebas, basadas en los factores de virulencia, (pruebas fenotípicas) y moleculares utilizadas para la identificación de las especies.

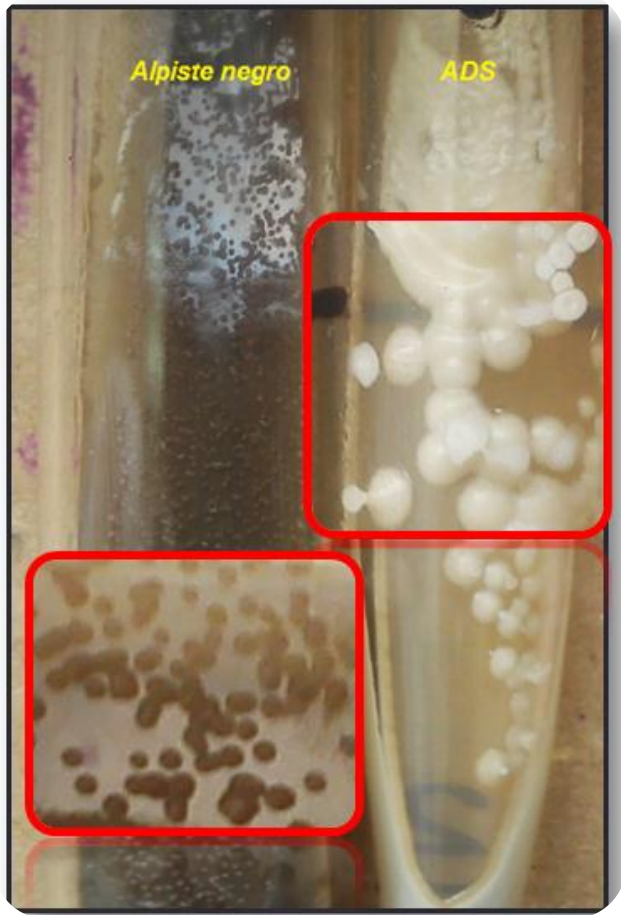


Imagen 4.- Crecimiento de levaduras del género *Cryptococcus* en ADS y alpiste negro incubados a 37°C durante 72h.

En ADS se observan colonias blancas-cremosas, mucoides, parecidas a “leche descremada”; mientras que en Alpiste negro las colonias son de color café, debido a la síntesis de análogos de melanina.

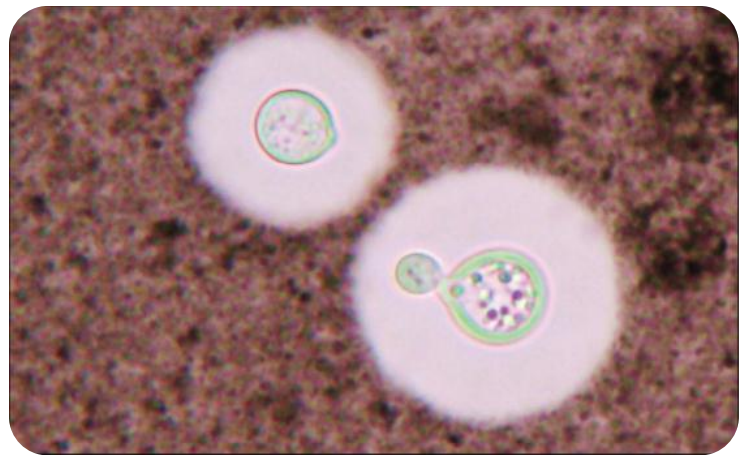
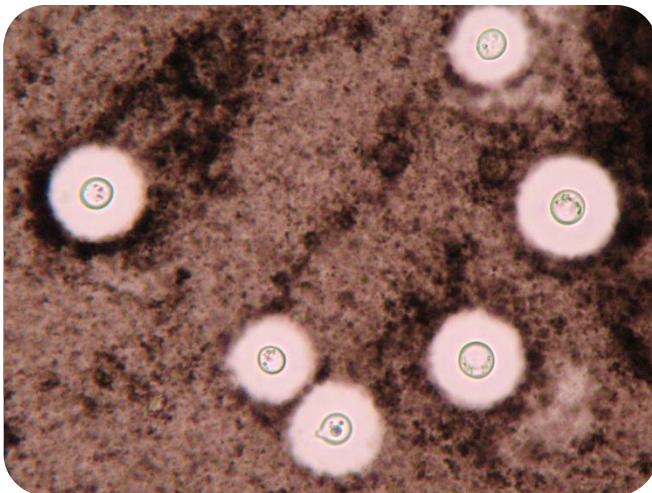


Imagen 5.- Examen directo contrastado con tinta china. Se observan levaduras globosas con halo cápsular bien definido de aproximadamente el doble del tamaño de la levadura, también se observan incrustaciones lipídicas. (10 y 40X).

Cuadro 2.-Identificación de las principales especies de *Cryptococcus*

Especie	Epidemiología (ref.3,14,32)	Convencional (ref. 3,22)	Pruebas especiales (ref. 3,22,31)	Id. Molecular (ref.16,25,32)
<i>Cryptococcus neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i>)	Patógeno oportunista Cosmopolita Marcadora de HIV-SIDA Excreta de aves de corral	Presencia de levaduras globosas con cápsula ^a Colonias blancas-cremosas ^b Pigmento café-oscuro ^c	Crecimiento a 37°C(+) Crecimiento a 40°C (+)	VNI,VNII y VNB / AFLP1- <i>C.neoformans var-grubii</i> - (serotipo A)
			Urea-EDTA ^d (-) D-prolina ^e (-) CGB ^f (-) KNO ₃ ^g (-) DACAD MALDI-TOF	VNIII / AFLP3 Híbrido AD
			Resistencia intrínseca a equinocandinas	VNIV /AFLP2.- <i>C.neoformans var-neoformans</i> (serotipo D)
<i>Cryptococcus gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>)	Patógeno primario Regiones tropicales y templadas. Epifito de árboles Hospederos animales Más agresiva. Forma criptococomas y disemina.	Presencia de levaduras ovoides "limones" con cápsula ^a Colonias blancas-cremosas ^b Pigmento café-oscuro ^c	Crecimiento a 37°C(+) Crecimiento a 40°C (+)	VGI /AFLP4 VGII /AFLP5 VGIII/ AFLP6 VGIV / AFLP7
			Urea-EDTA ^d (+) D-prolina ^e (+) CGB ^f (+) usa glicina como fuente de C. KNO ₃ ^g (-)	<i>C.gattii</i> (serotipos B y C)
			DACAD MALDI-TOF	
			Resistencia intrínseca a equinocandinas Sensibilidad intermedia a azoles	
<i>C. albidus</i>	Se han reportado pocas infecciones a humanos y su patogenia es aun cuestionable	Presencia de levaduras globosas con cápsula delgada ^a Colonias blancas-cremosas ^b Colonias blancas ^c	Crecimiento a 37°C(+) Crecimiento a 40°C (-)	Análisis de multilocus RFLP del gen <i>URA5</i> con doble digestión utilizando <i>Sau961</i> y <i>Hhal</i> .
			KNO ₃ ^g (+) MALDI-TOF	
			Sensibilidad reducida a fluconazol Resistencia intrínseca a equinocandinas	
<i>C. laurentii</i>	Se han reportado pocas infecciones a humanos	Presencia de levaduras alargadas con /sin cápsula ^a Colonias blancas-cremosas ^b Colonias blancas ^c	Crecimiento a 37°C(v) Crecimiento a 40°C (-)	Análisis de multilocus RFLP del gen <i>URA5</i> con doble digestión utilizando <i>Sau961</i> y <i>Hhal</i> .
			KNO ₃ ^g (-) CGB ^f (v)	
			MALDI-TOF	
			Sensibilidad reducida a fluconazol Resistencia intrínseca a equinocandinas	
<i>C. uniguttulatus</i>	Se han reportado pocas infecciones a humanos	Sin cápsula ^a Colonias blancas-cremosas ^b Colonias blancas ^c	Crecimiento a 37°C(+) Crecimiento a 40°C (+)	Análisis de multilocus RFLP del gen <i>URA5</i> con doble digestión utilizando <i>Sau961</i> y <i>Hhal</i> .
			KNO ₃ ^g (-) MALDI-TOF	
			Sensibilidad reducida a fluconazol Resistencia intrínseca a equinocandinas	

Cuadro 2.-Identificación de las principales especies de *Cryptococcus*. a= examen directo con tinta china; b= en ADS (37°C/72h) ; c = crecimiento en agar semilla de niger "Steib" (37°C,72 h) pone de manifiesto la actividad fenoloxidasa o lacasa; d = en medio de urea de Christensen previamente tratada con EDTA (positivo si vira de rosa a naranja) (24 h, 37°C); e = asimilación en ADS con sensidisco de D-prolina. f = medio agar canavanina-glicina-azul de bromotimol 3-5 días a 37°C (positivo si vira de amarillo a azul). g = en medio líquido con nitratos. DACAD=DetECCIÓN de antígeno cápsular. v = variable; (+)= positivo; (-) negativo

2.3.- Trichosporonosis

Infección causada por levaduras del género *Trichosporon*, algunas forman parte de la microbiota del ser humano, y aprovechan las condiciones adversas del huésped para parasitar (inmunosupresión-pacientes neutropénicos, trasplantes, y rotura de barreras fisiológicas). Mientras que, otras especies causan infecciones profundas y diseminadas. Es importante resaltar que la colonización sobre superficies inertes en catéteres, válvulas cardiacas y aparatos de venoclisis provoca cuadros de septicemia; mucha veces con desenlace mortal ⁽²⁾.

El diagnóstico es a partir de examen directo con KOH al 10%, y se basa en la búsqueda de pseudohifas con blastoconidios y es esencial la presencia de artroconidios, para descartar otras micosis (candidosis y geotricosis). El crecimiento en ADS- 28°C es rápido, con colonias blanco-amarillentas, húmedas, limitadas y de aspecto cerebriforme, que son sensibles a cicloheximida. La identificación a nivel de especie implica pruebas bioquímicas y examen macro-microscópico de la colonia (imagen 6 y cuadro 3). Estas levaduras han sido clasificadas como basidiomicetos, filogenéticamente muy cercanas al género *Cryptococcus*. Hay 38 especies, de la cuales solo seis o siete afectan al hombre (por termoresistencia). La identificación molecular se basa en el análisis de ITS (D1/D2) de la unidad larga de RNAr, aunque puede fallar porque solo existe el 1% de divergencia nucleotídica entre especies crípticas, por ello se recomienda el análisis de *IGS1* para diferenciarlas ⁽³⁴⁾.

El tratamiento en general es variable y depende de la especie aislada; pero, se pueden utilizar imidazólicos tópicos (cuadros cutáneos), anfotericina B desoxicolato e itraconazol (cuadros diseminados). Hay que mencionar que la mayoría son insensibles a fluconazol.

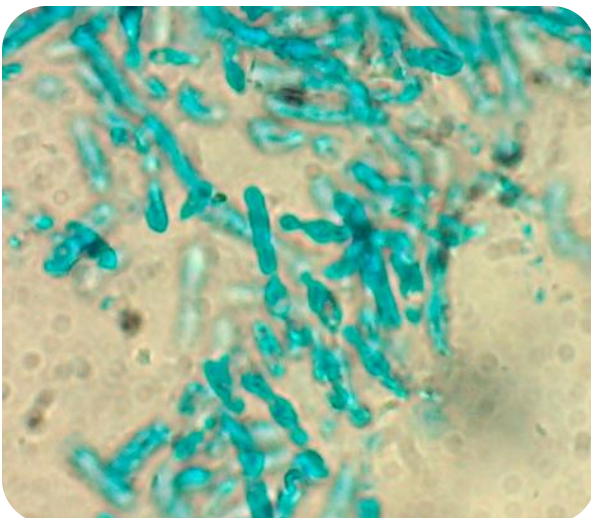


Imagen 6.- Examen directo con azul de algodón de lactofenol, a partir del crecimiento levaduriforme en ADS (37°C/48h). Se observa la presencia de blastoconidios, pseudohifas y artroblastoconidios; estructuras características de *Trichosporon* sp.

Cuadro 3.-Identificación de las principales especies de Trichosporon

Especie	Epidemiología ^(2,3)	Id Convencional ^(21,22)	Pruebas especiales ^(22,35)
T. asahii	Infección sistémica en pacientes linfopénicos (leucemias y HIV)	Seca y grumosa con zona marginal agrietada ^a Hifas tabicadas, artroconidios cilíndricos, esféricos y blastoconidios ^b .	L-arabinosa (+) Sorbitol (-) Melibiosa (-) Crecimiento a 37°C (+)
			MALDI-TOF
T. cutaneum	Microbiota de piel y mucosas Piedra blanca <i>capitis</i> Infecciones superficiales	Crema-cerebriforme, brillante con zona marginal ^a Hifas tabicadas- irregulares, artroconidios cilíndricos-elipsoidales, y blastoconidios. ^b	L-arabinosa (+) Sorbitol (+) Ureasa (+) Formación de biofilms (+)
T. inkin	Microbiota piel sana Piedra blanca <i>cruris</i> en humanos y primates (inguinal)	Blanca- cerebriforme sin zona marginal ^a Hifas y pseudohifas tabicadas- abigarradas, artroconidios cilíndricos alargados y blastoconidios en cadenas ^b	L-arabinosa (-) Apresorias (+) Sorbitol (-) Mio-inositol (+) Ureasa (+) Crecimiento a 37°C (+)
			MALDI-TOF
T. mucoides	Infecciones sistémicas Onicomycosis e infecciones cutáneas	Blanca-glabra, brillantes, fisuradas y elevadas ^a Artroconidios cilíndricos y blastoconidios con ramificaciones en forma de clava. Y conidios terminales de pared gruesa ^b	Tolera cicloheximida al 0.1% L-arabinosa (+) Sorbitol (+) Melibiosa (+) Crecimiento a 37°C (+)
T. ovoides	Microbiota de piel sana Piedra blanca <i>capitis</i> en humanos y primates	Blanca-granular, plegada al centro y con zona marginal plana ^a Hifas tabicadas ,artroconidios ovales-rectangulares y blastoconidios en cadenas ^b	L-arabinosa (+) Apresorias (+) Mio-inositol (-) Sorbitol (-) Nitrato de potasio (-)

Cuadro 3.-Identificación de las principales especies de Trichosporon. *a= morfología colonial en ADS (30°C/72h); b = examen microscópico con scotch y teñido con azul de metileno, a partir de crecimiento levaduriforme en ADS. Se indican los perfiles característicos de asimilación de carbohidratos.*

2.4.- Métodos de identificación

A pesar de que hoy en día existen nuevas tecnologías, la identificación sigue realizándose por métodos fenotípicos y bioquímicos junto con la correlación de datos clínicos relevantes del paciente. Los métodos “convencionales” son tardados y costosos, además de que el microbiólogo, médico y paciente dependen de la tasa de crecimiento del microorganismo para su identificación; lo que dificulta establecer un tratamiento oportuno, toda esta identificación puede llevarse semanas, incrementando también los gastos de hospitalización ^(4, 5, 6).

Desde hace más de 20 años se han utilizado los métodos moleculares y han demostrado ser precisos, de alto poder discriminatorio y complejidad, convirtiéndose en métodos de referencia para el campo de la investigación; bien llamados “estándar de oro”. Por desgracia, muchos laboratorios de microbiología clínica no tienen la capacidad o el conocimiento suficiente para utilizar estos métodos, por lo que a menudo deben recurrir a centros de referencia o laboratorios especializados ⁽²⁾. Aun así, cuando se cuenta con esta tecnología, sigue presente la desventaja de ser métodos laboriosos, costosos y que requieren de personal capacitado para su ejecución y análisis. Por ello la bioquímica automatizada sigue siendo lo más utilizado y al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos ^(4, 5).

Desde la década pasada, la identificación microbiana mediante espectrometría de masas ha surgido como una “revolución tecnológica” en la identificación rutinaria de microorganismos, aunque las bases teóricas ya son del siglo pasado, el avance científico ha permitido su orientación hacia el campo de la medicina clínica ⁽³⁶⁻³⁸⁾.

2.4.1.- Estándar de referencia

Las técnicas moleculares tienen un alto grado de especificidad y sensibilidad. Se benefician de la variabilidad en las secuencias del ADN que permite discriminar entre especies relativamente cercanas, detectar patógenos en estadios tempranos de la infección sin signos clínicos visibles, e incluso; se pueden identificar genes relacionados con diferentes mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Estas técnicas tienen diferentes fundamentos, ventajas e inconvenientes, éstas incluyen técnicas de PCR, Rep-PCR, secuenciación de DNA, pirosecuenciación, análisis de multilocus, microarreglos de ADNr, RFLP, AFLP, hibridación, Taq-man-PCR y análisis de cariotipo, todas ellas son precisas y específicas; pero son costosas, dependen de la experiencia del operador, el procesamiento de la muestra puede tardar de horas a días, y no son fáciles de interpretar ni de implementar como técnicas rutinarias en un laboratorio clínico ^(6, 28, 39, 40).

Los métodos moleculares se basan en el análisis de diferentes genes del ADN ribosomal altamente conservados, así como de regiones intergénicas cortas, pero muy variables, que son prácticamente únicas para cada microorganismo. En el caso del reino *Fungi*, se utilizan las regiones codificantes del ADNr que se mencionan a continuación. I) gen 18S, que ha variado lo suficiente durante la evolución para determinar taxonomía y así revelar la filogenia entre clases. II) gen 28S, que es más variable y ha sido utilizado para la clasificación de género a *Phylum*. III) gen 5.8S, que no contiene mucha información, pero sigue siendo útil para la identificación de ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos.

De igual forma las regiones no codificantes; que son aún más variables, y están ubicadas entre los genes 18S, 5.8S y 28S del ADNr; son conocidas como “espaciador transcrito interno” o por sus siglas en inglés “*internal transcribed spacer*” como (ITS) ⁽⁶⁾. Estas regiones son utilizadas de manera universal para la identificación de hongos. Se trata de un conjunto de genes multicopia dispuestos en tándem, lo que facilita su amplificación por medio del par de *primers* universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') que resulta en un fragmento de 400-800 pb. La secuenciación de éste fragmento y su posterior comparación con secuencias depositadas en bases de datos como *GenBank* permiten identificar la especie aislada. Existen diferentes técnicas genotípicas, la elección dependerá del objetivo del estudio y la cepa a identificar, así como de la infraestructura del laboratorio y de la experiencia del personal. Mediante la amplificación de estos genes o regiones, se pueden reconocer las diferentes especies fúngicas ^(5,6, 41, 42).

Las regiones más arriba son conocidas como espaciador transcrito externo o por sus siglas en inglés “*external transcribed spacer*” como (ETS). Mientras que los genes que se encargan de separar copias de ADNr son conocidos como “espaciador intergénico” o por sus siglas en

inglés “*intergenic transcribed spacer*” como (IGS) éstos son utilizados para reconocer subtipos de especies, razas y poblaciones.

Existen otros genes que pueden ser utilizados para la identificación de hongos como el locus del gen *cox2* del ADN mitocondrial (ADNm) que codifica para la subunidad 2 del citocromo c oxidasa y que anteriormente fue empleado en análisis filogenético de *Peronosporomyces*. También el gen que codifica para el citocromo b permite la discriminación de las especies de *Aspergillus*. Algunos genes más también pueden llegar a ser utilizados como dianas para el diagnóstico y caracterización de patógenos, por ejemplo los que codifican para proteínas como β -tubulina, calmodulina, actina e hidrofobinas ^(5,6).

Aunque los procedimientos de identificación involucran herramientas moleculares complejas son rápidos porque evitan el cultivo microbiano, sin embargo todo el proceso del análisis molecular sigue consumiendo tiempo y es costoso. La búsqueda de métodos más rápidos y confiables para identificar el agente etiológico con precisión aún continúa ^(6, 41, 42).

2.4.2.- Espectrometría de masas MALDI-TOF

2.4.2.1.- Historia y definiciones

La espectrometría de masas (EM) una rama de la ciencia que detalla los aspectos relacionados con los espectrómetros de masas y los resultados obtenidos de ellos. Pronto después de su descubrimiento del electrón en 1897, Thompson desarrolló el primer espectrómetro de masas (llamado espectrógrafo parabólico), el instrumento analítico fragmenta y separa una molécula diana, para determinar la relación masa-carga de los iones. El instrumento permitía que los iones generados en tubos de descarga pasaran por un campo electromagnético y se movieran en trayectorias parabólicas. Hoy es considerado un “*detector universal*” debido a que todos los compuestos tienen masa ^(42, 43).

Desde sus orígenes, a inicios del siglo XX, la espectrometría de masas ha tenido un sin fin de aplicaciones tecnológicas y analíticas. Convirtiéndose en una técnica instrumental que permite determinar la composición elemental de una mezcla de moléculas, obteniendo el valor exacto de su masa molecular, debido a que toma como premisa que la pérdida de un electrón, mediante procesos de ionización, es insignificante en relación a la masa total de la molécula.

La masa molecular (MM) se mide en *unidades de masa atómica* (u), también conocido como Dalton (Da) que es equivalente a 1/12 parte de la masa de un átomo de carbono en su estado de energía más bajo y no enlazado. Actualmente, existe un debate, debido a que siendo estrictos, (Da) es una unidad de masa, y no de relación m/z, por lo cual se ha propuesto introducir una nueva unidad para medir de forma cuantitativa la relación m/z de las moléculas, considerando la masa en (Da) y la carga (z), como la carga en el estado elemental, $z=1$; y estas unidades podrían llamarse Thompson (Th), en honor al pionero en EM. Sin embargo, esta terminología aún no ha sido totalmente adoptada^(6,36, 43).

La forma de obtener los iones ha cambiado a lo largo de la historia, ya sea por las condiciones del analito o por la metodología empleada. En 1920 se desarrolló la primera fuente de impacto de electrones (EI), para ionizar moléculas volátiles mediante un pulso de electrones desde un filamento caliente. Con esto, que aún se utiliza en equipos modernos, ha sido posible descubrir isótopos, determinar peso atómico, caracterizar nuevos elementos, analizar cuantitativamente gases, identificar rápidamente contaminantes/ drogas y, más recientemente, la caracterización de estructuras moleculares. Sin embargo, las aplicaciones en microbiología empezaron cerca de 1970, mediante la introducción de pirolysis-MS de bacterias. Casi simultáneamente, la identificación de componentes de lípidos pequeños <1.5 KDa, por ejemplo: porfirinas, ácidos grasos, lípidos polares, etc., han sido analizados por (EI). Mientras que para componentes de mayor peso ≥ 6 KDa (péptidos) es necesario utilizar bombardeo atómico (AB)^(36, 45).

Los intentos por introducir esta tecnología en la identificación de microorganismos habían sido un fracaso, debido a que los métodos de ionización fuerte eran demasiado “agresivos” debido a que fragmentaban demasiado las proteínas y en ocasiones las desnaturalizaban. Fue hasta 1975 que el investigador Japonés Tanaka desarrolló un método que le permitía analizar moléculas grandes y termolábiles, después de irradiar el analito con un rayo láser de nitrógeno, utilizando una matriz de glicerol. Los resultados de estos trabajos fueron completados por los científicos Karas y Hillenkamp, quienes lo asociaron a una matriz orgánica polar y soluble, con la finalidad de obtener iones monocargados estables; con ello lograron que la separación y detección dependiera del peso de la molécula y no de su carga; llamando a la técnica de ionización “suave”; MALDI, por la poca fragmentación que ocurre.

Fue hasta el año 2002, que se reconocieron sus trabajos y se les otorgó el premio Nobel de Química ^(36,46, 47).

Por sus siglas en inglés *Matrix Assited Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry*: MALDI-TOF, la traducción al español de esta técnica de espectrometría de masas sería “ionización-desorción mediante láser asistida por una matriz, acoplada a un analizador de masas por tiempo de vuelo”. Las ventajas de esta tecnología es que impide que las proteínas se degraden con facilidad, además, es rápido, sensible, reproducible, rentable, fácil de utilizar; aunado a que genera pocas interferencias y residuos ^(5, 36).

Con el desarrollo de la genómica y los métodos de secuenciación es posible determinar los perfiles genéticos y proteicos de ciertos microorganismos. Como consecuencia la tecnología MALDI-TOF, está disponible desde hace más de 30 años. En 1988 se inició la exploración del potencial del primer espectrómetro de masas, con la tecnología MALDI-TOF, desarrollado por *Shimadzu*[®], mientras que en el año 2000 se patentó la primera base de datos en Europa. El trabajo constante de *Bruker*[®] y *BioMérieux*[®] ha ayudado a promover y desarrollar esta tecnología, haciéndola más accesible, en primera instancia en laboratorios de investigación de Europa y después en el resto del mundo ^(36,44 -46).

Desde 2008, la técnica, es utilizada en proteómica y permite el análisis de las proteínas microbianas más abundantes, pesadas (de 1-500 KDa) y termolábiles para identificar microorganismos, creando y ampliando bases de datos para la comparación de espectros de masas. Actualmente se ha extendido su uso y es capaz de identificar microorganismos directamente de muestras clínicas (sangre, LCR) con una elevada concentración del microorganismo, aproximadamente 10^4 UFC/ml, así mismo, se pueden desarrollar protocolos para predecir la resistencia a determinados antimicrobianos, debido a cambios significativos del proteoma ^(37,41,45).

Se incluye el diagrama 1 y el cuadro 4 donde se especifican las principales ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos de identificación para hongos.

MALDI-TOF MS

CONVENCIONAL

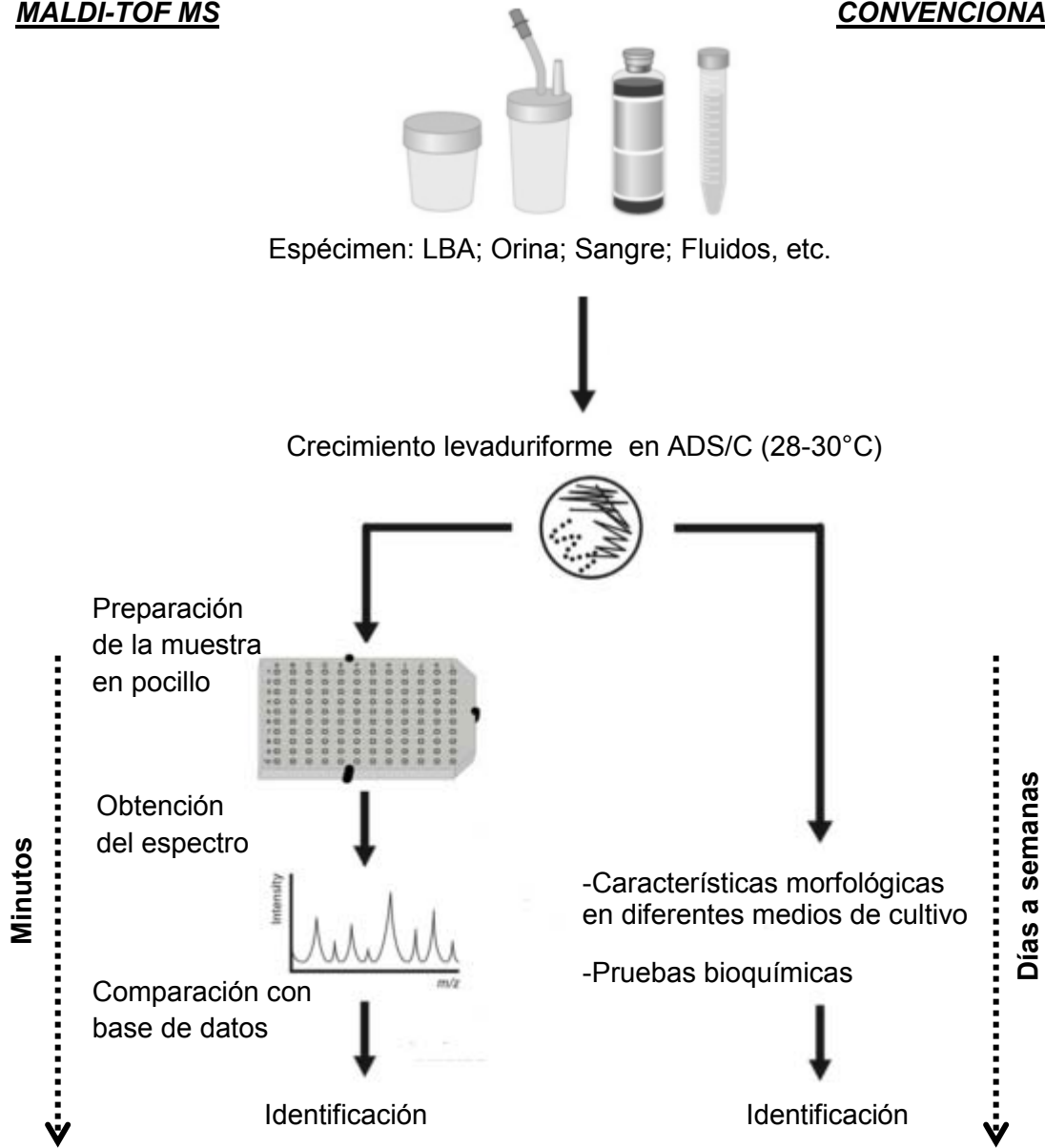


Diagrama 1.- Comparación del diagrama de trabajo para MALDI-TOF MS versus los métodos convencionales de identificación en el laboratorio de micología. A partir de un cultivo puro; si comparamos el tiempo de identificación, los métodos convencionales tardan de días a semanas (según el microorganismo), mientras que, MALDI-TOF MS permite identificar al microorganismo en minutos. [Diagrama modificado de Clark A; 2013] ⁽⁶⁾

2.4.2.2.- Instrumentación del equipo MALDI-TOF MS

Como cualquier espectrómetro de masas consiste en 6 partes fundamentales (diagrama 2):

- I. Fuente de ionización que es la región encargada de fragmentar las moléculas y formar iones, la ionización sucede por fenómenos de pérdida de electrones, al incrementar la energía de un átomo o molécula neutra.
- II. Sistema de vacío; evita que los iones formados no colisionen con otras moléculas durante su interacción con campos electromagnéticos, así como evitar la pérdida o entrada de iones externos que interfieran con el análisis. Ésto requiere de sistemas de vacío que alcancen 10^3 - 10^9 torr de presión, pero depende del tipo de analizador.
- III. Analizador de masas; se clasifican en dos tipos, los de impacto y los que “capturan” al ion. En los de impacto los iones una vez formados pasan a través del instrumento y después se impactan en el detector, donde son primero amplificados y al final, destruidos, el proceso dura microsegundos o milisegundos.

En el analizador TOF, los iones viajan libremente sin interacción de fuerzas magnéticas o eléctricas, por un tubo de 1.2m de largo, y se separan con en base en su peso molecular, sin destruirse hasta que llegan al analizador, creando un espectro de masas instantáneo, practicante al mismo instante que impactan en el detector.

- IV. Detector; con excepción de algunos instrumentos, los espectrómetros modernos usan multiplicadores de electrones para la detección de iones. Y aunque los hay de diferentes tipos el principio físico es el mismo “convertir una señal fisicoquímica en una señal digital”. Se realiza amplificando la señal cascada abajo, de tal forma que al impactar un ion en un dinodo, este causa la eyección de uno o más electrones, llamados “electrones secundarios”, a partir de la superficie del dinodo. Los electrones secundarios son acelerados hacia un segundo dinodo por una diferencia de potencial de 100V hasta impactarlo para eyectar más electrones y así a través de una cadena de 12-24 dinodos. La cascada produce hasta 10^8 electrones en menos de 10 ns.

Al momento, se crea un espectro de masas donde el ion con mayor masa molecular es llamado *ion molecular*; el cual representa aquel ion que menos se fragmenta, que tiene el potencial de ionización más bajo de toda la molécula y que por ende representa el peso exacto de la molécula. Mientras que el pico más abundante del espectro,

representa al *ion pico base*, lo que significa que es el fragmento que más se forma. Los iones que se forman a partir del ion molecular son conocidos como *iones fragmento*, y se ubican en las partes inferiores del espectro de masas, con un valor de m/z cada vez menor ^(43,45).

V. Computadora y *software*

Debido a la formación de múltiples iones en poco tiempo, el análisis debe ser igual aún más rápido, para poder detectar y transformar todas las señales químicas en digitales, para ello se han desarrollado sofisticados sistemas de computación. En proteómica se obtienen complicados espectros de masas y su identificación se basa en las propiedades de proteínas intactas, secuencias de aminoácidos y modificaciones post-transcripcionales. Debido a que la fragmentación de enlaces específicos depende de su naturaleza química, el espectro de masas puede ser interpretado en términos de la estructura molecular del analito o como una “huella digital proteica” que es comparada con las bases de datos existentes para la identificación ^(43,45).

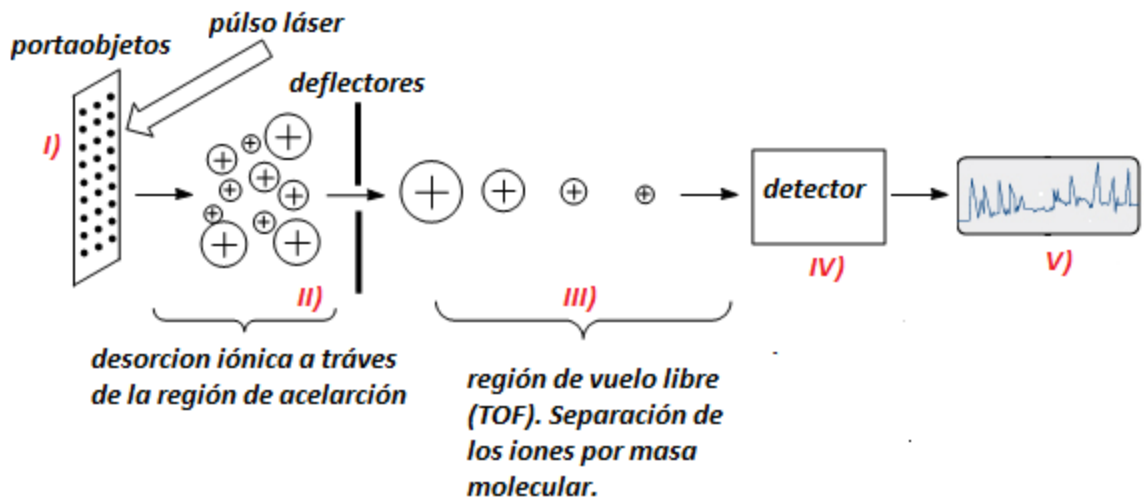


Diagrama 2.- Partes fundamentales del instrumento del sistema MALDI-TOF MS. I) Fuente de ionización. II) Sistema de vacío y aceleración. III) Analizador TOF. IV) Detector. V) Software y computadora ^(43,45).

Cuadro 4.- Principales diferencias entre los métodos de identificación actualmente utilizados en micología ^(10, 41, 42, 46)

Métodos	Fundamento	Ventajas	Inconvenientes
Morfológicos	<p>Basados en el análisis visual del crecimiento del hongo en diferentes medios de cultivo.</p> <p>Al microscopio se busca la presencia de estructuras especializadas y formas de reproducción anamórfica, características para cada hongo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Poco laborioso • Aplicable como método de rutina 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de trabajo 48-72 h. • Costo por espécimen US \$6 • Especificidad limitada • Se necesita experiencia del observador
Bioquímicos	<p>Utilizan las principales características metabólicas de los microorganismos, para obtener un perfil de degradación de carbohidratos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Aplicable como método de rutina • Equipo automatizado 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo de trabajo de horas a días. • Costo, aproximadamente US \$8 • Personal capacitado • Baja heterogeneidad de perfiles metabólicos. • Limitada discriminación
Inmunológicos	<p>Basados en evaluar la respuesta inmune del paciente (IDR,CTR). Por otro lado, detectan toxinas, anticuerpos, antígenos y microorganismos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medianamente laboriosos • Más rápidos que métodos bioquímicos • Específicos • Son cuantitativos, mediante títulos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo: hasta 96 h • Costo variable • No tan sensible ni específico como los métodos moleculares. • Dependen del estado inmune del paciente • Poca disponibilidad

Métodos	Fundamento	Ventajas	Inconvenientes
Moleculares	Aprovechan la variabilidad del DNAr, ya sean genes específicos o regiones intergénicas de la subunidad 18s.	<ul style="list-style-type: none"> • Estándar de referencia • Específicos, sensibles y precisos • Disponibilidad de diferentes técnicas y marcadores moleculares • No siempre se requiere cultivo • Pueden identificar microorganismos fastidiosos o los denominados “incultivables” 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo: según método • Costo :US \$20, por prueba • Laboriosos • Equipo sofisticado • Capacitación del personal • Difíciles de interpretar • No son de rutina • La identificación de un microorganismo no siempre implica la enfermedad
MALDI-TOF MS	Ioniza las proteínas más abundantes, pesadas y termolábiles del citoplasma (principalmente ribosomales); donde el total de las masas proporciona una distribución en posición y cantidad característica para cada especie llamado “huella dactilar de masas”	<ul style="list-style-type: none"> • Metodología sencilla y estandarizada • Rápido, sensible, específico Comparable al análisis molecular • Barato a largo plazo (US \$1 por muestra) • Alta discriminación entre especies • Posibilidad de identificación directamente del espécimen humano no sólido. • Probabilidad de identificar marcadores de resistencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Inversión inicial alta • Capacitación del personal • Base de datos en ampliación • Interferencias con: sales y detergentes iónicos (Triton-100, Tween 20) ; así como pigmentos (cromogénicos y melánicos) • Baja precisión para mohos • Necesario colonias aisladas • No determina sensibilidad a antifúngicos

2.4.2.3.- Fundamento

El fundamento básico de la técnica consiste en irradiar, mediante laser de nitrógeno, una mezcla de proteínas microbianas, previamente co-cristalizadas con una matriz orgánica volátil, esta radiación es suficiente para ionizar las proteínas ribosomales y no degradarlas. Una vez formados los iones monocargados, éstos son impulsados mediante un campo eléctrico hasta la entrada del analizador por tiempo de vuelo libre (TOF), donde al llevar la misma carga, su separación depende únicamente de su masa molecular. Dicha masa molecular permite establecer la velocidad de llegada al detector del analizador ⁽⁵²⁾. De esta forma el total de las masas de las proteínas proporciona una distribución característica en posición y cantidad, creando con ello un espectro de masas específico para cada especie conocido como *Huella Dactilar Proteica (HDP)*, término traducido de las palabras en inglés *Protein Mass Fingerprinting (PMF)* ^(5, 6,45).

2.4.2.4- Biofísica de los principales fenómenos

El fundamento fisicoquímico y matemático del método es más amplio y profundo, he implica diferentes hipótesis sobre la formación de iones monocargados y su viaje “libre” hasta ser detectados para crear un espectro de masas. Lo más complicado es que utiliza complejos algoritmos y matrices de semejanza para la comparación de los espectros crudos; contra la base de datos ⁽¹⁷⁾.

2.4.2.4.1.- Ionización

Los fenómenos de ionización, aún están en controversia, pero se toma como base que una molécula, en estado basal, tiene energía rotacional, vibracional y eléctrica la cual al ser radiada; es capaz de disiparla con su entorno y mantenerse estable, pero más allá de cierto umbral la molécula aumenta tanto su energía rotacional y vibracional que la convierte en energía cinética, pierde electrones y es capaz formar iones. Esta energía enfocada a un pequeño espacio puede ser suministrada por un láser con la finalidad de que sistema molecular expuesto pueda incrementar su energía interna en poco tiempo; lo que lleva a la fusión (aumenta energía rotacional, vibracional y electrónica), vaporización (incrementa energía cinética o transicional) e ionización (eyección de electrones); inclusive si la energía es demasiada puede haber descomposición de la molécula por la ruptura de enlaces ^(5, 6,48).

Lo interesante de la tecnología MALDI, es que al ser un método de ionización suave, debe utilizar matrices orgánicas para evitar la degradación molecular y desnaturalización de proteínas; para ello, se utilizan fuertes cromóforos que son ácidos orgánicos contenidos en solución. Esta matriz, tiene dos funciones importantes, la primera es que al ser un ácido débil en solventes proticos; su origen químico le permite establecer enlaces covalentes con los residuos básicos de los aminoácidos (histidina, lisina y arginina) para formar un cristalizado con la misma proteína. La segunda función es de “protección”, porque evita que las proteínas se degraden; debido a que su estructura resonante, le permite absorber luz ultravioleta y disipar esta energía a las moléculas vecinas; formando iones. Con ésto, la matriz permite llevar al analito (proteínas ribosomales) a la fase de vapor sin destruirlo: “desorción”^(45,46).

El ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) es comúnmente utilizado como matriz porque es un ácido estable y seguro, de fácil volatilización, bajo peso molecular y baja interferencia con la muestra, aunque depende del tipo de analito que se pretende analizar^(6,43).

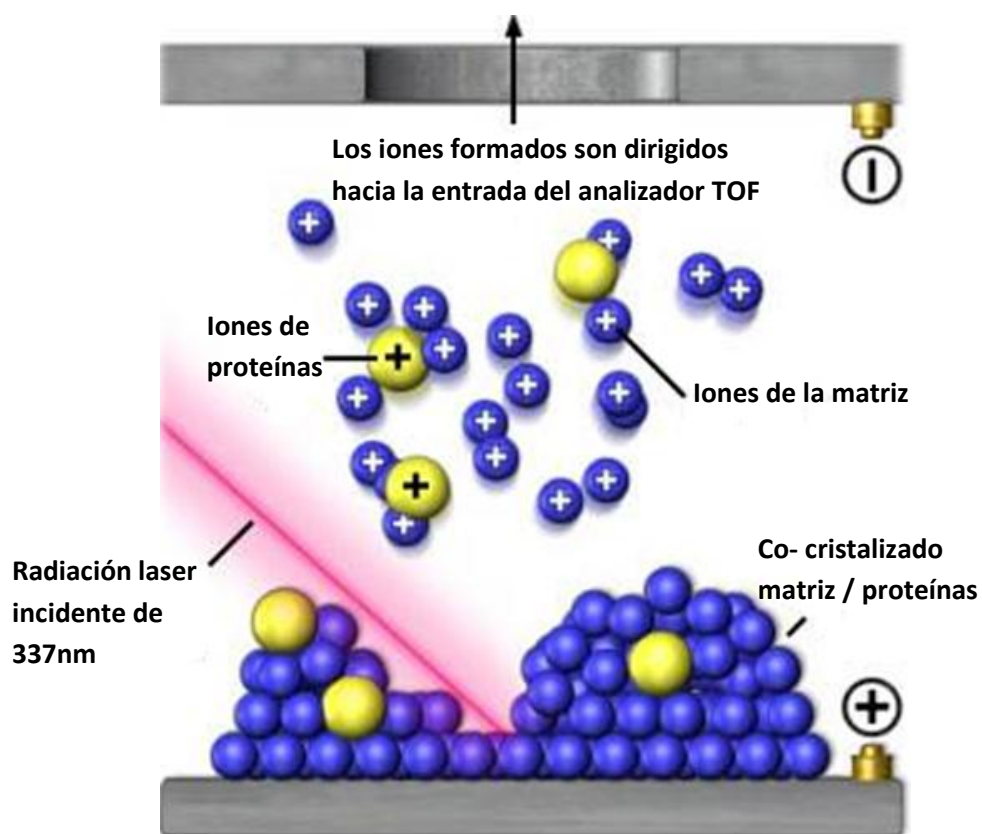
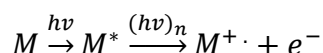


Diagrama 3.- Formación de iones monocargados del analito, después de la radiación láser del co-cristalizado. Una vez formados son dirigidos por una diferencia de potencial de 70eV hacia la entrada del analizador TOF. Tomado y modificado de Burtis C, et al; 2012.⁽⁴³⁾

El calentamiento rápido de los cristales, mediante pulsos laser genera fusión y posterior sublimación «de sólido a gas» de ambos (matriz y analito) el proceso de ionización aún no está bien entendido, pero se puede explicar de la mejor manera por dos hipótesis: ^(6, 46)

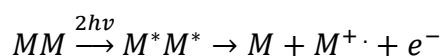
El primer paso hipotético de los mecanismos de ionización involucra ionización multifotónica de las moléculas de la matriz para formar un catión radical. En poco tiempo, los fotones del láser impactan el cristalizado matriz-analito, y remueven un electrón de una molécula de la matriz, generando un radical catión de la matriz $[M^{+/\cdot}]$. Se ilustra a continuación:



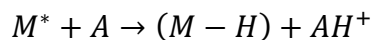
Se requieren de dos fotones para esta reacción, porque las irradiaciones del láser son muy bajas como para permitir una absorción adicional en esta escala de tiempo.

En este mecanismo hipotético, existe una advertencia, que debe tomarse en cuenta; es que los potenciales de ionización IP 's (energía mínima necesaria para separar el electrón más externo de una molécula neutra en su estado fundamental; y así convertirla en una catión positivo) para la matriz, son muy altos como para absorber dos fotones (IP matriz = 9 a 10 eV); mientras que el láser de nitrógeno $IP = 7.36$ eV ; por lo tanto una teoría de dos pasos, es también propuesta para la generación del catión radical de la matriz, llamada teoría de la "energía agrupada". En este modelo, dos o más moléculas de matriz en estado excitado producen un catión radical matriz. Esta reacción es posible, en la fase sólida, ya que las moléculas de la matriz están densamente empaquetadas y quedan en estrecha proximidad cuando se secan en la placa de análisis del sistema MALDI-TOF. Esto se ejemplifica por la presencia de agregados de la matriz presentes en la fase gas, cuando hay desorción.

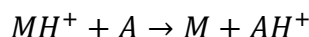
La teoría de la "energía agrupada" se explica por siguiente mecanismo; i) el fotón absorbido de la molécula de matriz en estado excitado $[M^*]$ es transferido a una segunda molécula de la matriz en estado excitado, resultando en la formación de un catión radical de la matriz $[M^{+/\cdot}]$, una molécula de la matriz $[M]$, y un electrón libre $[e^-]$:



ii) este paso involucra la transferencia de un protón de la molécula de matriz en estado excitado [M^*] a la muestra clínica o analito [A], resultando en la ionización del analito:



iones adicionales del analito se forman por reacciones ion-molécula secundarias, mediante interacciones de partículas de matriz-matriz y matriz-analito. Las reacciones son favorables termodinámicamente, porque la matriz tiene menor afinidad por los protones; mientras que los péptidos o proteínas que forman la muestra clínica “analito”, tienen mayor afinidad por los protones ^(6, 45, 46).



2.4.2.4.2.- Desorción y aceleración

Después del proceso de ionización, los iones recién formados de matriz y analito se desprenden del resto de la matriz en exceso para ser impulsados por un campo eléctrico de 70 V. Al pasar por este campo eléctrico todos los iones obtienen la misma carga (iones monocargados) y misma energía cinética. Después son orientados mediante deflectores; que son varios espejos que guían los iones hasta la entrada del analizador *TOF*, para que todos los iones monocargados entren juntos al analizador.

2.4.2.4.3. - Análisis TOF

Este analizador permite que los iones monocargados se muevan a la deriva en una región libre, donde la única fuerza que afecta su movimiento es la energía cinética, otorgada en el paso previo de aceleración.

La velocidad [v] de las moléculas ionizadas del analito puede ser calculada usando la siguiente ecuación, donde [KE] es la energía cinética, [m] es la masa, [z] es la carga del ion (+1 para MALDI), [eV] es el valor del voltaje aplicado, [D] es la distancia hacia el detector, y [t] es el tiempo.

$$KE = \frac{1}{2} mv^2 = zEV \quad ; v = \frac{D}{t}$$

En este contexto, $[D]$ y $[eV]$ son constantes (1.2m y 70eV, respectivamente, para MALDI-VITEK®). Mientras que $[t]$ es calculada, permitiendo determinar la relación $[m/z]$. Un simple reordenamiento de la ecuación resulta en:

$$t = D \sqrt{\frac{m}{2 (z * eV)}}$$

Esta ecuación demuestra que el tiempo de vuelo libre es directamente proporcional al valor de la relación $[m/z]$. Por lo cual, los iones más pesados tienen un tiempo de vuelo mayor, y por ende tardan más en llegar al detector. Con lo cual se demuestra que la separación de las moléculas está en función de su masa.

El modo lineal de este analizador es el más usado para el análisis de microorganismos, separando los iones de acuerdo a sus velocidades, antes de impactar en el detector localizado al final del tubo. Este modo lineal es demasiado sensible y eficiente, con la habilidad para analizar moléculas en concentraciones femtomolar (10^{-18} mol/L). Sin embargo, una desventaja es que ofrece poca resolución debido a que puede existir una distribución no equivalente de la energía del láser en la superficie de las moléculas, lo cual podría alterar la distribución y ancho de los picos, éste fenómeno puede normalizarse con la aceleración de los iones al mismo voltaje, utilizando un reflector. En éste, los iones cambian de dirección, de tal manera que los iones con mayor energía cinética impactan más profundo que aquellos con poca energía, por lo cual la trayectoria de vuelo se extiende. Por lo cual el reflector es efectivo para reducir las variaciones en el ancho de los picos^(6, 43,46).

2.4.2.4.4.- Detector

Al llegar al detector se toma en cuenta el tiempo en que tardan en llegar para determinar su relación m/z , como se explicó anteriormente. El detector convierte la señal química en digital, para formar un espectro que puede ser comparado en una base de datos de referencia e identificar el microorganismo. El espectro de masas generado representa el número de iones que impactaron el detector en cierto tiempo y debido a que la composición proteica (proteínas ribosomales), es diferente y funciona como un “reloj molecular” en la evolución de las especies

(2), es posible obtener una huella dactilar de masas (HDM) única y diferente para cada especie, y con ello discriminar entre especies crípticas^(6, 46).

2.4.2.4.5.- Base de datos

La identificación se basa en complejos algoritmos de semejanza, redes y matrices. *BioMérieux*[®] es propietario de un avanzado clasificador de espectros que usa análisis de matriz de caja de pesos “*Weigthed bin Matrix*” para construir una base de datos e identificar espectros crudos. No se hacen comparaciones de espectros, ni los espectros están incorporados en el *software* comercial, sólo se analizan los picos por matrices. Este proceso permite una mayor ganancia de la memoria y más rápido tiempo de cálculo.

Cada espectro obtenido en “crudo” se traduce en una serie de picos, que se detectan y se clasifican, uno a uno, con base en su masa molecular e intensidad en una serie de 1300 cajas. El amplio conjunto de los valores calculados para cada espectro es utilizado para asignar los valores de probabilidad y confianza de una identificación negativa o positiva. Mientras mayor número de aislamientos se incluyen en la base de datos se obtiene una mayor precisión en la identificación de diferentes especies^(46, 55).

El valor de la identificación puede realizarse a nivel de género, especie o familia. Para el sistema *Vitek-MS*[®] el valor de confianza tiene un intervalo de 0 - 100%. En el caso de levaduras diversos autores han establecido que la tecnología identifica correctamente hasta un 90% de aislamientos de *Candida* a nivel de especie^(38, 39, 46, 49, 50).

2.4.2.5.- Costos

La inversión inicial del equipo es cara y varía según la plataforma comercial entre \$150-250 mil dólares (2.5-4.2 millones de pesos mexicanos) y el costo aproximado en material por prueba es de \$0.5-1 dólar (9-17 pesos) , mientras que el gasto final para la identificación mediante métodos bioquímicos automatizados es aproximadamente de \$ 8-10 dólares . La controversia es que el instrumento de espectrometría de masas es caro (inversión inicial), mas no los reactivos, con lo cual a largo plazo podría ser costeable⁽⁵¹⁾. Según un análisis de costo-beneficio, un laboratorio que adquiriera el equipo y realice al menos 30 identificaciones por día,

y venda la prueba al paciente en \$150 pesos mexicanos (US \$7), estaría recuperando la inversión del equipo en máximo 3 años ⁽⁵²⁾.

Otra ventaja es que el tiempo en la identificación es menor al que se tendría que esperar, si la identificación se realizara por métodos convencionales y moleculares ⁽⁵³⁾.

Sin duda alguna, la finalidad de cualquier laboratorio debe ser establecer una plataforma universal de calidad que permita un diagnóstico rápido, específico y barato de las enfermedades infecciosas, mediante la identificación del agente etiológico; y que además genere los mejores beneficios en el tratamiento del paciente. El empleo y búsqueda de nuevas alternativas tecnológicas tiene que ser analizado y los métodos de identificación microbiológica, ya existentes, deben ser validados para cumplir con esta necesidad ^(9,52).

2.4.2.5.- Factores pre analíticos

Desde 1993, se han identificado moléculas que interfieren con la formación de iones, moléculas no volátiles como sales y metabolitos secundarios; aniones como fosfatos o boratos en buffers; detergentes iónicos como *Triton X-100* y *Tween 20*; así como los fosfolípidos presentes en la sangre, todas estas moléculas pueden interferir con los fenómenos de ionización y desorción ⁽⁴³⁾.

Además de los factores que involucran los tiempos de incubación y los diferentes medios de cultivo, existen diversos protocolos que se utilizan para la preparación de la muestra y que sin duda representan factores importantes a considerar. Se han descrito hasta el momento tres metodologías para la identificación de microorganismos, y que dependen de la morfología celular de cada microorganismo. Para los hongos, es indispensable romper la pared celular, la cual es una mezcla de quitina, glucanas, mananoproteínas, mananas, quitosan, ácido poliglucoronico entre otras, junto con pequeñas cantidades de proteínas, lípidos y polifosfatos. En el caso de actinomicetos, su composición celular es muy distinta, y más parecida a la de bacterias, por ello la presencia de ácido micólico y ceras; debe ser tomado en cuenta para su procesamiento ^(3,6). Además de lo anterior las células de los hongos (conidos o esporas) son anemófilas y se necesitan condiciones de seguridad específicas al preparar la muestra en la tarjeta de análisis.

En la literatura se han descrito 3 procedimientos que han sido utilizados con variaciones mínimas según las necesidades y recursos del investigador así como las condiciones del laboratorio i) Células intactas; que consiste en depositar la muestra e inmediatamente agregar la matriz, dejar secar y analizar. ii) Extracción corta en placa con ácido fórmico; es el método validado por la FDA y en éste hay que tratar primero la muestra con ácido fórmico, dejar secar, agregar CHCA, dejar secar y analizar. iii) Extracción completa; que involucra una serie de pasos extras para eliminar el *debris* celular mediante centrifugaciones, posteriormente se toma parte del extracto (equivalente a un concentrado de proteínas), se añade CHCA, se deja secar y se analiza ^(6,17, 46, 50, 54)

Los resultados son notables en el espectro de masas, de tal forma que la mejor resolución en ancho, número y tamaño de picos se logra con el tercer método de “extracción completa”, sin embargo, es tardado y laborioso. Mientras que el método de “extracción corta” tiene la misma reproducibilidad que el tercero pero es más rápido.

Otro fenómeno observado es la interferencia que generan los pigmentos. En el caso de hongos filamentosos y levaduras que producen pigmentos (principalmente DHN-melanina “dihidroxinaftaleno-melanina”, derivados de catecolaminas, β - carotenoides, etc.) como los diversas especies de feohifomicetos, *Cryptococcus* sp, *Fusarium* sp, *Rhodotorula* sp, *Candida* sp (en medios cromogénicos) se ha demostrado que la intensidad de los picos en los espectros de masas, están claramente disminuidos, debido a que se afecta la ionización por ello, la identificación puede no ser adecuada.

La melanina, presente en la pared celular de algunos hongos, es un grupo heterogéneo de derivados fenólicos que naturalmente son foto y quimioprotectores de la célula fúngica (blastoconidios, conidios e hifas) encargados de absorber la radiación U.V. y otras funciones de virulencia como neutralizar toxinas, proteasas e hidrolasas. En altas concentraciones (>5000 ng /pocillo) el pigmento compite con la matriz orgánica por los fotones irradiados, con lo cual puede interferir la formación de iones. Para solucionarlo y obtener mejores espectros se recomiendan lavados previos con ácido trifluoroacético y ácido fórmico para eliminar pigmentos del cultivo; así como la inhibición de la síntesis de melanina mediante el cultivo previo del hongo en agar extracto de malta con 50 μ g/ml de triciclazol ⁽⁵⁵⁾.

2.5.- Importancia de la verificación

Los microbiólogos deben asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico, la fiabilidad de los resultados. Lo que implica que, además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables con independencia del laboratorio que los ejecute. Ésto se logra validando las metodologías y técnicas utilizadas para tal fin. La validación puede definirse como el conjunto de pruebas necesarias que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico de los procedimientos analíticos. En otras palabras “confirman el funcionamiento, previsto del procedimiento” ⁽⁹⁾. La validación permite conocer si el instrumento o procedimiento diagnóstico que estamos utilizando obtiene resultados de una manera reproducible, consistente y exacta ⁽⁵⁶⁾.

Si la metodología ya fue validada previamente, y es distribuida por una plataforma comercial; significa que es analíticamente confiable, aun así, es indispensable realizar una validación secundaria (verificación) antes de implementarla en un laboratorio para uso rutinario.

La verificación de un método comercial, consiste en comprobar los valores de sensibilidad y especificidad establecidos por el fabricante. Se pueden realizar sólo análisis cualitativos, debido a que ya se cuenta con una validación completa ⁽⁹⁾, con la finalidad de evaluar la utilidad diagnóstica de una prueba, para con ello establecer la eficiencia del procedimiento o instrumento de análisis. Algunas organizaciones de estándares internacionales (*FDA, CLSI, Cumitech 31*) establecen que para verificar metodologías que identifiquen microorganismos a nivel de especie, éstas deben de ser probadas en paralelo con la prueba existente o algún método de referencia. Para las pruebas de identificación microbiológica deben analizarse al menos 200 microorganismos, y de preferencia analizar todas las especies presentes en la base de datos. Para considerar que el método de prueba está verificado debe existir al menos un 90% de asociación entre el método de referencia y método de prueba diagnóstica ^(12,56).

3.- Procedimiento experimental

3.1.- Métodos

3.1.1.- Población y aislamientos de levaduras

Para la verificación se analizaron 206 cepas de levaduras correspondientes a 13 géneros distintos. De las cuales 164 cepas (identificadas previamente por biología molecular) fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Monterrey, México) que incluyen (36) *Candida tropicalis*, (40) *C. parapsilosis*, (5) *C. metapsilosis*, (30) *C. orthopsilosis*, (20) *Trichosporon asahii*, (14) *T. inkin*, y (6) *T. dermatis*. Así mismo, por ser consideradas como cepas de referencia se incluyeron las siguientes cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), *C. albicans* (18), *C. glabrata* (8) *C. kefyr* (6), *C. krusei* (9) *C. lipolytica* (6), *Cryptococcus neoformans* (8); éstas últimas fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de microbiología la Facultad de Química de la UNAM. Todas estas cepas son consideradas como estándar de referencia para la verificación del método de extracción corta en placa del sistema MALDI-TOF MS utilizado para levaduras.

Estas cepas se cultivaron en ADS/C a 30°C, durante 24 horas, se revisó que no estuvieran contaminadas por otros microorganismos. Si presentaban crecimiento bacteriano se realizaron resiembras en agar Biggy con la finalidad de eliminar el desarrollo bacteriano presente, de ahí se obtuvo el cultivo final en ADS (30°C, 72h) para su posterior análisis mediante el sistema MALDI-TOF MS.

Por otro lado se obtuvieron 130 aislamientos de levaduras provenientes de diferentes tipos de especímenes humanos (lavado bronquial, piel, mucosas, LCR y sangre periférica) de pacientes del H.G.M. "Dr. Eduardo Liceaga" los cuales incluyen levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Geotrichum*. Éstas se analizaron con la finalidad de identificarlas mediante el sistema MALDI-TOF MS y los métodos convencionales (pruebas bioquímicas y fenotípicas) y finalmente confirmadas por biología molecular.

El primoaislamiento de estas levaduras se realizó en ADS, agar Biggy y posteriormente se sembraron en ADS/C (30°C, 72hr) antes de ser analizadas por MALDI-TOF MS. Para los

métodos convencionales se obtuvo el primoaislamiento en ADS y Micosel[®], se resembraron en CHROMagar Candida[®] y finalmente se revisó la morfología en *corn-meal* más Tween 80 al 1%, para la identificación de especies (página 18).

3.1.2.- Tipo y diseño de estudio

Se trata de un estudio cualitativo experimental, comparativo, ambilectivo y horizontal. Se divide en dos partes, en la primera se realiza la verificación del método de espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de hongos levaduriformes de importancia médica, para ello se analizan cepas de levaduras, que fueron previamente identificadas por biología molecular (“estándar de referencia”), los datos obtenidos son nominales dicotómicos. En la segunda parte (una vez verificado el método MALDI-TOF MS), se identifican las levaduras del género *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporon* provenientes de diversos tipos de muestras clínicas de pacientes del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga” (colectadas en el período comprendido de Junio del 2014 a Junio del 2015) utilizando MALDI-TOF-*Vitek-MS*[®] así como por métodos convencionales (morfología en *corn-meal* mas Tween 80 al 1%).

3.1.2.1- Criterios de inclusión

- Cepas de levaduras oportunistas que hayan sido identificadas mediante métodos de biología molecular (estándar de oro).
- Cultivos de muestras de procesos infecciosos con desarrollo levaduriforme (cultivos positivos) provenientes de pacientes de cualquier unidad del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”. Las cuales aún no hayan sido identificadas mediante métodos de biología molecular.

3.1.2.2.- Criterios de exclusión

- Cultivo sin desarrollo levaduriforme (cultivos negativos) en las condiciones ya descritas de las muestras enviadas al servicio de Micología U-109 para su diagnóstico.
- No se incluirán las levaduras, aisladas de cultivos subsecuentes de pacientes con manejo terapéutico, a condición de que se identifiquen especies diferentes de las levaduras encontradas en el primer cultivo.

3.1.2.3.- Criterios de eliminación

- Cultivos con desarrollo levaduriforme en las condiciones de incubación ya descritas (cultivos positivos), que presenten contaminación por hongos filamentosos.
- Pérdida de la cepa aislada, durante el desarrollo del estudio.

3.2.- Identificación convencional (fenotípica-bioquímica)

La identificación de las levaduras se llevó a cabo por pruebas disponibles en el laboratorio de Micología, e incluyen microscopía al examen directo del espécimen, morfología subjetiva en los diferentes medios de cultivo utilizados (indicados en los cuadros 1-3 de los antecedentes), en algunos casos fue necesario obtener el perfil de asimilación de compuestos de carbono utilizando el sistema comercial *AUXACOLOR*[®] y automatizado *VITEK*[®] *YST ID card*.

3.3.- Identificación molecular

Se realizó en el laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León (*UANL*), Monterrey, México; a cargo de la Dra. Gloria González González. El procedimiento implica primero la extracción de ADN y amplificación por PCR, mediante secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosómico, utilizando los *primers* universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

3.4.- Identificación mediante MALDI-TOF, *Vitek-MS*[®] (37, 50)

Los aislamientos son analizados utilizando la versión v.2.0 de la base de datos *Vitek-MS*[®] que incluye 110 especies fúngicas (hongos filamentosos y levaduriformes). Se emplea la metodología de acuerdo a las instrucciones de la plataforma comercial conocida como *extracción corta en placa* con ácido fórmico al 25%. Para ello se utilizan placas de polipropileno con acero inoxidable de 48 pocillos de reacción. Primero, en la estación de preparación, con un palillo de madera estéril se toma parte de la colonia aislada (10⁶ células) para formar una película fina sobre el pocillo de la placa de análisis. Inmediatamente se cubre con 0.5 µL de ácido fórmico 25% [v/v] (para la ruptura de la pared celular fúngica y liberación de proteínas ribosomales) y se deja secar a temperatura ambiente. Después se añade 1 µL de la solución matriz *CHCA* (3.1% [v/v] de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) para co-cristalizar las proteínas ribosomales previamente extraídas directamente en el pocillo de reacción y se deja

secar antes de introducirlo al instrumento *Vitek-MS*[®]. Para control de calidad se utiliza el control positivo *E. coli* ATCC 8739 o *Candida glabrata* ATCC MYA-2950 que se inocula en el pocillo extra, ubicado en la parte central de cada grupo de adquisición (cada 16 pocillos); el grupo de adquisición se divide en 15 pocillos para muestras y se utiliza un pocillo con solo matriz *CHCA* a manera de control negativo.

3.4.1.- Obtención del espectro de masas ^(10, 37, 50)

Se realiza en modo lineal (frecuencia de 50Hz- 50 pulsos láser por segundo, intervalo de masas 2-20 KDa) los datos obtenidos son transferidos de la estación de adquisición al servidor de análisis VITEK-MS, conocido como *Myla v2.4 middleware* el cual es un *software* que utiliza algoritmos de semejanza para comparar los espectros obtenidos contra los espectros de su base de datos. Una vez que se obtiene el espectro, el equipo brinda diferentes niveles de confianza a los resultados, que indican “que tan real es la identificación”.



- i. Debido a que la capa puede ser demasiado gruesa y no hay una correcta formación de iones (demasiada muestra, poca matriz orgánica). Ésto se puede resolver con un segundo análisis.
- ii. Más de 3 espectros parecidos; significa que la especie puede pertenecer a un complejo, “críptico” (especies filogenéticamente muy cercanas, que están implicadas en la misma enfermedad), por lo cual su identificación puede ser difícil hasta por métodos moleculares.
- iii. Que el espectro no está en la base de datos.



Las alertas con un triángulo amarillo indican que el espectro obtenido es parecido a no más de 3 especies diferentes, por lo cual es necesario volver a irradiar. Además nos brinda la oportunidad de elegir, la especie que consideremos ideal, considerando otras pruebas microbiológicas.



Todos los niveles de confianza que son mayores al 99%, se refieren a identificaciones que se realizaron adecuadamente y que el espectro de masas obtenido “en crudo” coincide con alta confianza al microorganismo indicado.

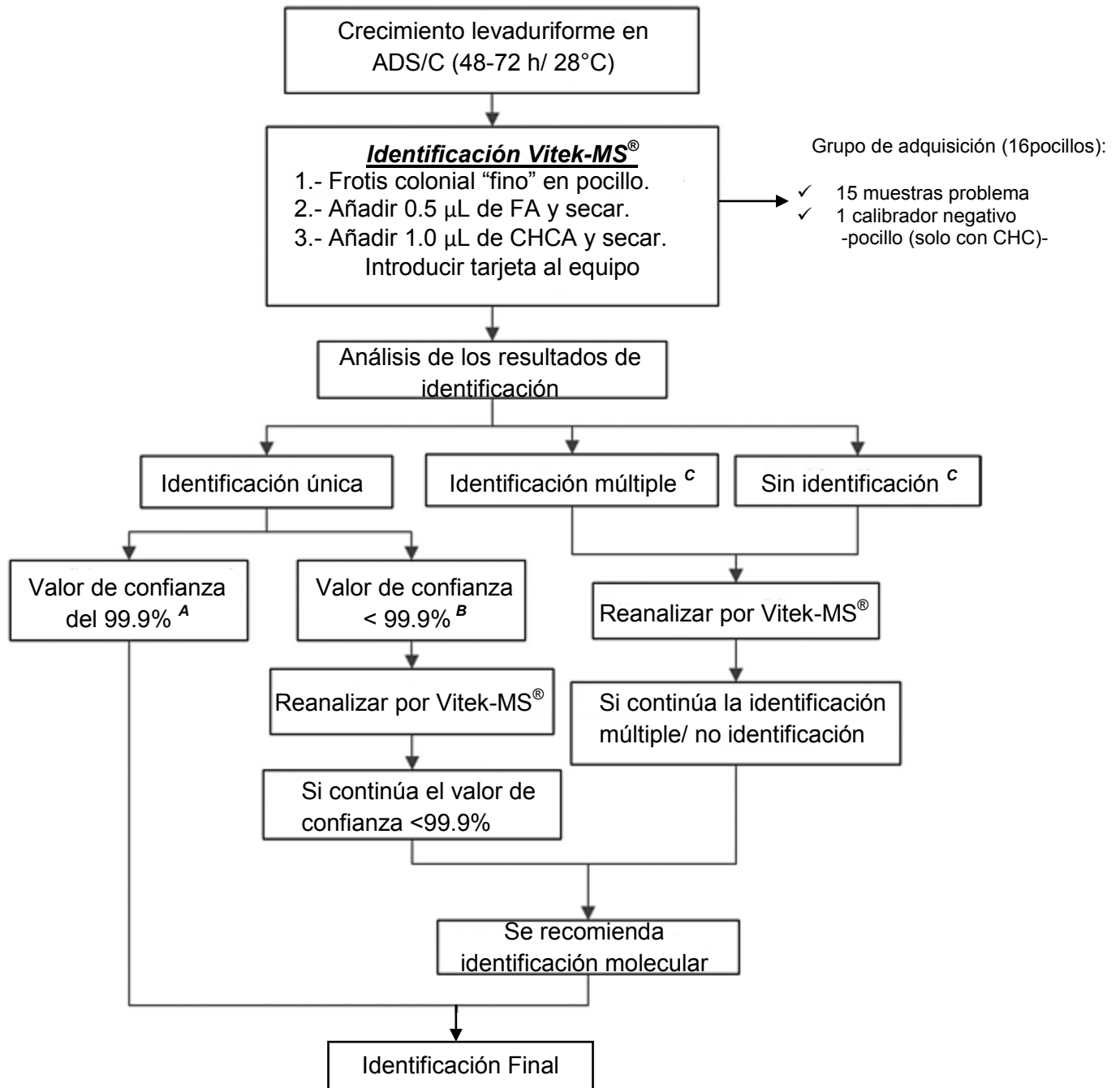


Diagrama 4.- Algoritmo de identificación para levaduras de interés médico, basado en la metodología establecida por Vitek-MS[®] conocida como extracción corta en placa con ácido fórmico (FA) al 25% v/v. A: la identificación obtenida es ideal y precisa. B: el valor de confianza <99.9% puede deberse a factores pre-analíticos (grosor del frotis o interferencias del medio de cultivo). C: la identificación múltiple puede ser resultado de la poca discrepancia entre especies muy relacionadas o a la cantidad de muestra depositada en el pocillo; mientras que la no identificación implica la ausencia del microorganismo en la base de datos v.2.0. Modificado de [Zhang L, et al; 2013]⁽³⁷⁾

3.5.- Análisis estadístico

Con la finalidad de establecer la eficiencia del procedimiento se realiza la verificación cualitativa del método de extracción corta con ácido fórmico al 25%, establecido por *Vitek-MS-Biomerieux*[®]. El análisis estadístico se realiza a nivel de especie. Los resultados obtenidos mediante la técnica MALDI-TOF MS, se evalúan contra los resultados de identificación previamente obtenida mediante biología molecular (estándar de referencia), de cepas de *Candida sp*, *Cryptococcus sp* y *Trichosporon sp* utilizadas para este estudio provenientes de UANL y algunas cepas ATCC.

Para ello se utilizan tablas de contingencia estadística de 2x2. Para fines de este estudio, se considera que al evaluar el método de prueba (MALDI-TOF MS), la variable desenlace; es decir, el resultado final, corresponde a la identificación correcta (+) o errónea (-) de la levadura a nivel de especie, determinada por el estándar de referencia (biología molecular) el cual siempre considera un resultado positivo cuando la identificación es correcta. Para ello es necesario llenar la tabla de contingencia estadística 2x2 con los siguientes valores, por cada especie de levadura analizada:

		<u>BIOLOGÍA MOLECULAR</u>		
		Identificación correcta (+)	Identificación errónea (-)	
<u>MALDI-TOF</u>	Identificación correcta (+)	a	b	a + b
	Identificación errónea (-)	c	d	c + d
		a + c	b + d	

a= Verdadero Positivo (*VP*): identificaciones conocidas como positivas, que dieron la prueba positiva por MALDI-TOF MS. **b**= Falso positivo (*FP*): identificaciones conocidas como negativas, que dieron la prueba positiva por MALDI-TOF MS. **c**= Falso negativo (*FN*): identificaciones conocidas como positivas, que dieron la prueba negativa por MALDI-TOF MS. **d**= Verdadero Negativo (*VN*): identificaciones conocidas como negativas, que dieron la prueba negativa por MALDI-TOF MS.

Una vez que se llena la tabla de contingencia estadística de 2x2 con estos datos, se calculan los elementos que evalúan la eficiencia de la prueba diagnóstica MALDI-TOF MS, que se indican a continuación;

- *Sensibilidad (S)*: Capacidad de la prueba diagnóstica MALDI-TOF MS para identificar correctamente la levadura a nivel de especie. En otras palabras, representa la proporción de resultados positivos correctamente identificados por el método MALDI-TOF MS.
- *Especificidad (E)*: Capacidad de la prueba diagnóstica MALDI-TOF MS para NO identificar correctamente la levadura a nivel de especie. Es decir, representa la proporción de resultados negativos correctamente asignados por el método MALDI-TOF MS.

También es importante, al juzgar la prueba diagnóstica MALDI-TOF MS, el significado de sus resultados cuando son positivo (correctos) o cuando son negativos (erróneos), lo que significa que tan bien predecirán los resultados de MALDI-TOF MS a los del estándar de referencia. Estos criterios son conocidos como valores de predicción, y se obtienen de la siguiente forma:

- *Valor predictivo positivo (VPP)*: probabilidad que tiene una cepa de ser realmente identificada correctamente, cuando el resultado de la prueba resulta positivo.
- *Valor predictivo negativo (VPN)*: probabilidad que tiene una cepa de ser realmente identificada erróneamente, cuando el resultado de la prueba resulta negativo
- *Exactitud diagnóstica (ED)*: capacidad del método MALDI-TOF MS para detectar correctamente positivos y negativos

Las ecuaciones para su cálculo son ⁽⁵⁶⁾:

$$S = \frac{a}{a+c} ; E = \frac{d}{b+d} ; VPP = \frac{a}{a+b} ; VPN = \frac{d}{c+d} ; ED = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Todos los índices están expresados como proporciones por lo que son convertidos a porcentajes al multiplicar por 100.

4.- Resultados

Los resultados obtenidos de este estudio se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 1.- Descripción de los resultados de las cepas utilizadas para la verificación del método de prueba MALDI-TOF MS vs Estándar de referencia

Especie	Número de identificaciones	
	Estándar de referencia	MALDI-TOF MS
<i>Candida albicans</i> *	18	18
<i>C.glabrata</i> *	8	8
<i>C.kefyr</i> *	6	6
<i>C.krusei</i> *	9	9
<i>C.lipolytica</i> *	6	5
<i>C.metapsilosis</i>	5	0
<i>C.orthopsilosis</i>	30	0
<i>C.parapsilosis</i>	40	40
<i>C.tropicalis</i>	36	35
<i>Cryptococcus neoformans</i> *	8	8
<i>Trichosporon asahii</i>	20	18
<i>T.dermatis</i>	6	0
<i>T. inkin</i>	14	13
TOTAL	206	

Tabla 1.- Se indica el número de cepas identificadas previamente por biología molecular (a nivel de especie) y que fueron incluidas en la verificación del equipo MALDI-TOF MS; para la identificación de las principales levaduras de importancia médica. Se utilizó la técnica de preparación de la muestra conocida como extracción corta en placa con ácido fórmico al 25% v/v indicada por la plataforma comercial Vitek-MS®.

Tabla 2.- Valores de eficiencia obtenidos para el método del sistema MALDI-TOF MS vs secuenciación de ITS

Especie	%S	%E	%VPP	%VPN	%ED
<i>Candida albicans</i>	100	100	100	100	100
<i>C.glabrata</i>	100	100	100	100	100
<i>C.kefyr</i>	100	100	100	100	100
<i>C.krusei</i>	100	100	100	100	100
<i>C.lipolytica</i>	83	100	100	50	86
<i>C.metapsilosis</i>	0	100	Nd	17	17
<i>C.orthopsilosis</i>	0	100	Nd	9	9
<i>C.parapsilosis</i>	100	100	100	100	100
<i>C.tropicalis</i>	97	100	100	75	97
<i>Cryptococcus neoformans</i>	100	100	100	100	100
<i>Trichosporon asahii</i>	86	100	100	40	87
<i>Trichosporon dermatis</i>	0	100	Nd	14	14
<i>Trichosporon inkin</i>	93	100	100	50	93

Tabla 2.- Se presentan los valores de los elementos obtenidos, para cada especie, mediante tablas de contingencia estadística de 2x2. Se realizó la asociación para el método de identificación MALDI-TOF vs. Estándar de referencia (ITS). Nd= no datos, no se puede obtener el valor.

Tabla 3.- Discrepancias en la identificación de cepas aisladas de pacientes del H.G.M. “Dr. Eduardo Liceaga”, mediante ambos métodos.

Microorganismo aislado	n	Convencional	MALDI-TOF MS	Discrepancias
<i>Candida albicans</i>	39	32	34	5
<i>C.boidinii</i>	1	1	1	
<i>C.glabrata</i>	21	19	19	2
<i>C.guilliermondii</i>	2	2	1	1
<i>C.kefyr</i>	6	5	5	1
<i>C.krusei</i>	4	3	4	1
<i>C.lambica</i>	2	2	2	
<i>C.lipolytica</i>	2	1	2	
<i>C.lusitaniae</i>	3	2	3	
<i>C.parapsilosis</i>	16	14	15	2
<i>C.tropicalis</i>	4	2	2	2
<i>C.utilis</i>	1	1	1	
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	1	1	
<i>C.neoformans</i>	19	19	19	
<i>Geotrichum candidum</i>	1	1	1	
<i>G.capitatum</i>	1	1	1	
<i>Prototheca wickerhamii</i>	1	1	1	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	2	2	
<i>T.inkin</i>	3	1	3	2
<i>T.dermatis</i>	1	0	1	1
TOTAL	130	111	118	17

Tabla 3.- Se muestra en número de las levaduras identificadas a nivel de especie, por ambos métodos (MALDI-TOF y CONVENCIONAL), estas levaduras fueron aisladas de muestras de pacientes del H.G.M “Dr. Eduardo Liceaga”. Se observa que existen discrepancias entre ambos, debido a que la identificación por no coincide.

Tabla 4.- Resolución de discrepancias entre los métodos de identificación utilizados

# muestra	Convencional	MALDI-TOF MS	Molecular (ITS)
975-15	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
682-15	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
375-15	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
508-15	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i> *
770-15	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>
817-15	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i> *
62060	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
607-15	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
1673-15	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida famata</i> *
715-15	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida kefyri</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
574-15	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida kefyri</i> *
835-13	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Candida tropicalis</i> *
224-15	<i>Candida krusei</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Candida guilliermondii</i> *
438-15	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon inkin</i>
1242-15	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
1278-15	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Trichosporon mucoides</i>	<i>Trichosporon dermatis</i> *
1305-15	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>

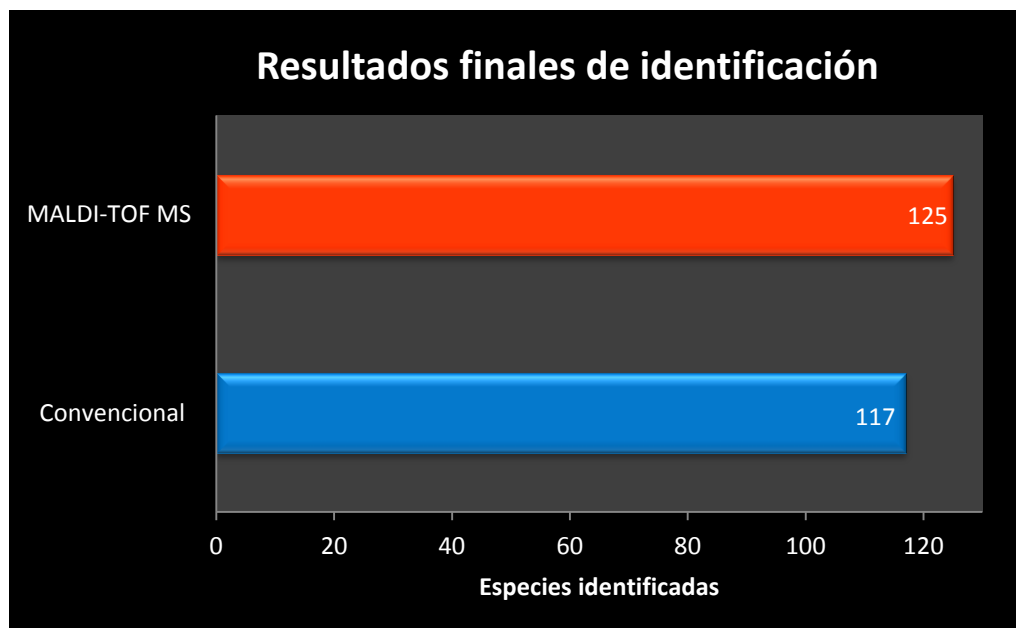
Tabla 4.- Se muestran los resultados obtenidos del análisis molecular de ITS, realizado por la Dr. Gloria M. González-González y colaboradores en la UANL, Monterrey; México. Éstos indican la identificación final de levaduras aisladas de pacientes del H.G.M “Dr. Eduardo Liceaga”. Es una tipificación decisiva que se obtuvo para resolver las discrepancias entre ambos métodos (Convencional y MALDI-TOF) para las levaduras obtenidas aquí mostradas.

* Especies que no coincidieron con ninguno de los métodos de identificación.

Tabla 5.- Resumen de las discrepancias resueltas por biología molecular

Resultado (ITS)	Convencional	MALDI-TOF
<i>C. albicans</i> (5)	2	4
<i>C. tropicalis</i> (2)	1	0
<i>C. parapsilosis</i> (4)	2	1
<i>C. kefir</i> (1)	0	0
<i>C. krusei</i> (1)	0	1
<i>C. famata</i> (1)	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (1)	0	0
<i>T. inkin</i> (1)	1	1
<i>T. dermatis</i> (1)	0	0
Total	6	7

Tabla 5.- Especies que generaron duda en su identificación, debido a que no coincidía por ambos métodos utilizados, y fue necesario el análisis molecular. Según el análisis de ITS, se muestran cuales fueron identificadas correctamente y así como el método.



Grafica 1.- Se muestran los resultados finales de la identificación de 130 levaduras aisladas de pacientes del H.G.M “Dr. Eduardo Liceaga”, mediante ambos métodos, tomando en cuenta los valores obtenidos de la resolución de las discrepancias.

MALDI-TOF Vitek-MS®: identificación mediante espectrometría de masas, utilizando ácido fórmico al 25% para la extracción corta en placa. **Convencional:** análisis de micromorfología en agar cornmeal más Tween 80 al 1%, y en algunos casos utilizando pruebas bioquímicas comerciales (Auxacolor® y Vitek YST card®)

5.- *Discusión*

En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia y mortalidad de las infecciones por levaduras oportunistas del género *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporon* como resultado de muchos factores, que sin duda, dependen tanto del hospedero como del microorganismo infectante, generando una auténtica “lucha” entre ellos. Por parte del hospedero, influye la estabilidad de su sistema inmune; los cambios más notables se han observado en pacientes inmunocomprometidos; como los pacientes con HIV-SIDA, cáncer, así como pacientes en tratamiento con antimicrobianos o con largas estancias hospitalarias; lo cual los hace vulnerables a adquirir infecciones micóticas.

Predecir el tratamiento de una infección fúngica es casi siempre una prueba difícil, porque los hongos, además de sus múltiples factores de virulencia, han desarrollado mecanismos de resistencia a diferentes antifúngicos, lo cual tiene como resultado el fracaso terapéutico. Por ello, la identificación del agente causal es importante, sin embargo, en muchos laboratorios no sucede así y siguen ocurriendo identificaciones incorrectas, a pesar de que se utilicen métodos automatizados. Ésto trae como resultado cambios en la epidemiología y clínica pero sobre todo un mal manejo terapéutico del paciente, aunado al incremento en los gastos de hospitalización.

MALDI-TOF MS es una técnica proteómica que se basa en el análisis de las proteínas ribosomales, ya que han sido descritas como excelentes candidatas para la identificación de microorganismos, éstas son proteínas abundantes en el citoplasma celular; representando hasta 2/3 del peso total de una célula, también son altamente conservadas y prácticamente se mantienen sin cambios, a pesar de las condiciones externas y la etapa de crecimiento; por ello son consideradas como un “reloj molecular” en la evolución de las especies ⁽⁵⁷⁾. Estas características le brindan reproducibilidad y precisión en la generación de espectros de masas ^(38,43), la técnica permite obtener un perfil de masas, parecido a una “huella dactilar de masas de proteínas” para cada especie y que con la ayuda de una base de datos pueden ser tipificadas ^(5,6). El método actualmente se considera revolucionario, pero en especial rápido, para la identificación de las principales levaduras de interés médico ^(45, 50).

Diversos autores han discutido sobre la precisión y rapidez del sistema MALDI-TOF MS. En general, han comparado la técnica contra las metodologías ya conocidas (fenotípicas, bioquímicas y moleculares) para evaluar los diversos factores que pueden interferir con este sistema. La mayoría de ellos coincide en que es una herramienta complementaria, considerándola más sensible que los métodos bioquímicos automatizados, e inclusive, algunos han reportado que sus resultados son equivalentes a los obtenidos por técnicas de biología molecular en un 90-98% (4,37,54,58). Algunos otros han indicado que su mayor desventaja es el tamaño y la calidad de la base de datos, lo cual es esencial para la precisión y la parte fundamental del equipo, pero, este inconveniente puede solucionarse, ampliando la base de datos con nuevas especies.

En este trabajo el tiempo aproximado de preparación (por muestra) fue de 2 minutos, esto significa que para preparar toda una tarjeta de análisis, equivalente a 3 grupos de adquisición (45 muestras problema, 3 calibradores internos positivos de *E. coli* ATCC 8739 y 3 controles negativos- sólo matriz orgánica-) fue de poco más de 1 hora. Mientras que, el instrumento tarda 10 minutos para adquirir las condiciones de vacío y temperatura para poder iniciar el análisis de la tarjeta. Una vez que el equipo adquiere las condiciones para iniciar el análisis, el tiempo en que se obtiene el espectro e identificación del patógeno es de un minuto y medio; por ello, tiempo total, desde la preparación, hasta la obtención de resultados de cada 45 muestras problema es aproximadamente de 3 horas. Si el control positivo no es identificado, es necesario volver a preparar los 16 pocillos que corresponden a un grupo de adquisición, debido a que el equipo considera que la preparación de la muestra problema no fue adecuada.

Observamos que, de los factores pre-analíticos que pueden interferir en el análisis, lo más importante es tener la cepa aislada y joven, de preferencia en ADS/C a 37°C y de no más de 72 horas, debido a que este medio permite eliminar microbiota bacteriana acompañante en el espécimen humano, debido a que el cloranfenicol es un inhibidor de la síntesis de proteínas; que se une a la subunidad 50s de los ribosomas, unidad sólo presente en bacterias. Además en este medio de cultivo pueden desarrollarse favorablemente todas las cepas de *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporon* sin alteraciones en su morfología.

Tampoco es recomendable utilizar la cepa levaduriforme de un medio de cultivo sintético que le permita al microorganismo formar algún tipo de pigmento; ya que estos últimos pueden tener en su estructura química moléculas que puedan ser heterocíclicas, aromáticas o lineales y por ello puedan comportarse como cromóforos. Estos pigmentos, ya sean cromogénicos o melánicos, inhiben la ionización de las proteínas e impiden obtener un espectro adecuado, al absorber la ionización U.V., de tal forma que compiten con la matriz orgánica por captar los fotones emitidos del láser de nitrógeno; lo que trae como consecuencia una pobre ionización de las proteínas y un mal espectro de masas. Es decir, no es favorable utilizar una levadura de medios como el alpiste negro o CHROMagar *Candida*[®].

Por otro lado, además de tomar en cuenta estos factores pre-analíticos, el objetivo principal fue verificar la metodología utilizada por MALDI-TOF MS y definir si el instrumento permite obtener resultados confiables, consistentes y reproducibles para la identificación de levaduras de importancia médica. Se utilizó la técnica conocida como extracción corta en placa con ácido fórmico al 25% v/v. Para ello se asociaron los resultados obtenidos a nivel de especie en paralelo con el estándar de referencia que para este estudio fue análisis de ITS's^(12,13, 56).

En este trabajo se analizaron 206 cepas diferentes identificadas previamente por el estándar de referencia y después, estas cepas se analizaron, sin que el analista conociera su identidad, mediante el sistema MALDI-TOF MS; con la finalidad de obtener los valores de eficiencia para cada especie. (Tabla 1)

Los valores de S, E, VPP, VPN y ED para cada una de las especies analizadas y utilizadas en la verificación del procedimiento experimental del sistema MALDI-TOF MS son mostrados en la Tabla 2 de la sección de resultados. Estos valores se obtuvieron a nivel de especie, para las cepas de *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii* y *Trichosporon inkin*, y demuestran que los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad son en su mayoría mayores al 90%. Por ello, al asociar un mínimo de 200 análisis obtenidos por del método de prueba MALDI-TOF MS en paralelo contra la prueba de referencia, como lo indican Clark R.⁽¹²⁾ y Cámara-Sala M.⁽⁹⁾, y de esta asociación obtener más del 90% de sensibilidad y especificidad entre los resultados, entonces el método de prueba puede considerarse como un método verificado; aunque no se incluyan todas las especies contenidas en la base de datos utilizada.

Es así como la metodología utilizada por *Vitek-MS*[®] conocida como extracción corta en placa con ácido fórmico al 25% v/v para la identificación de levaduras se considera verificada, para las especies de las levaduras, antes mencionadas, y puede ser implementada en el laboratorio para uso rutinario.

Estos resultados demuestran que la sensibilidad y especificidad del sistema MALDI-TOF MS son, en su mayoría altos, para las especies más comunes y se asocia, en algunos casos, en un 100% con el estándar de referencia. Estos resultados son similares a los obtenidos por Westblade L. ⁽⁵⁰⁾ ; Zhang Li ⁽³⁷⁾; Jamal W. ⁽⁵⁴⁾; y Deak E. ⁽¹⁰⁾ , para las especies que están incluidas en la base de datos *Vitek*[®] *MS IVD Knowledgebase v.2.0* utilizada para este estudio.

Sin embargo, los resultados de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica más bajos se obtuvieron al analizar las cepas de *Trichosporon dermatis*, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*. Esto significa que si consideramos el valor de exactitud diagnóstica (ED), como un valor predictivo, este puede indicarnos la capacidad que tiene el sistema MALDI-TOF para diferenciar entre un resultado correcto o incorrecto, a nivel de especie. Por ello, los resultados de ED y S son bajos para estas especies debido a que no están incluidas en la base de datos de *Vitek-MS*[®] v2.0; según Zhang Li ⁽³⁷⁾ y Deak E. ⁽¹⁰⁾ ; es por ello que aunque el valor de especificidad es alto (nos indica que no está siendo identificado), la sensibilidad (capacidad para identificar lo correcto) no lo es, porque el equipo no encuentra la especie en su base de datos; dando como resultado errores en la identificación. Por ejemplo al analizar las cepas de *Candida metapsilosis*, ésta fue identificada erróneamente como *Cryptococcus laurentii*; una levadura que pertenece a otro género; a pesar de que se repitió el análisis porque se pensó que el error era pre-analítico al preparar la muestra, siguió siendo identificada así. Sería necesario conocer el porcentaje de variabilidad genómica entre estas especies para poder dilucidar el error.

Por otro lado, para las cepas de levaduras de *Candida orthopsilosis* y *Trichosporon dermatis*, el equipo no logró la identificación, a pesar de repetir el análisis en varias ocasiones. Lo que significa que estas levaduras no están incluidas en la base de datos v 2.0.

Una vez que se verificó el método de prueba MALDI-TOF MS se procede a identificar 130 cepas de hongos levaduriformes obtenidos de especímenes humanos (sin identificación previa alguna), esto se realizó por el sistema MALDI-TOF MS y por metodología convencional. Como resultado preliminar se obtuvieron 17 cepas que no coincidieron, en su identificación a nivel de especie, por estas metodologías; estos resultados se consideran discrepancias entre los métodos y para poder resolverlas se realizó análisis molecular de *ITS*'s.(Tabla 3)

Como resultado del análisis molecular se obtuvieron algunas especies de *Candida kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata* y *Trichosporon dermatis* que no pudieron ser identificadas por ninguno de los métodos utilizados. Es decir, su identificación preliminar no coincide ni por metodología convencional ni por MALDI-TOF (Tabla 4).

Después de resolver las discrepancias y añadir los resultados a cada una de las metodologías, se calcularon los porcentajes de identificación para cada método. Finalmente, a nivel de especie se logró la identificación de 125 levaduras mediante el sistema MALDI-TOF y 117 levaduras mediante metodología convencional. Lo cual representa un porcentaje de identificación del 96% para MALDI-TOF y 90% para metodología convencional. (Grafica 1)

Según nuestros resultados, podemos establecer que el sistema MALDI-TOF MS, realmente tiene un mayor nivel de identificación a nivel de especie, comparado con los métodos convencionales que se basan en análisis de la micromorfología en agar corn-meal más Tween 80 al 1% y en pruebas bioquímicas comerciales; los cuales son utilizados de manera rutinaria en el laboratorio de Micología del H.G.M "Dr. Eduardo Liceaga", ésto coincide con lo reportado por autores como Rosevinge F⁽⁸⁾; Van Herendael B. ⁽¹⁷⁾; De Carolis E. ⁽³⁸⁾; Pinto A.⁽³⁹⁾; Jamal W. ⁽⁵⁴⁾; Galán F. ⁽⁴¹⁾,Chao Q. ⁽⁵⁹⁾, entre otros; quienes consideran que la tecnología de espectrometría de masas es más rápida y precisa que los métodos bioquímicos, para la identificación de hongos levaduriformes.

Finalmente nosotros lo consideramos como un método de tamizaje, que permitirá evitar realizar un análisis molecular a todos los aislamientos de levaduras que, por metodologías convencionales, se dificulte su tipificación.

Podemos recomendar el método de extracción corta en placa con ácido fórmico al 25% v/v del sistema MALDI-TOF MS para incluirlo en el diagrama de trabajo rutinario del laboratorio de Micología del H.G.M “Dr. Eduardo Liceaga”; y utilizarlo para la identificación de las levaduras más frecuentes de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*, siempre que se tengan presentes las limitaciones del mismo y se conozca el alcance de la base de datos utilizada. Para ello se añade el algoritmo de trabajo en la página 54.

También se recomienda reportar los resultados de *Candida parapsilosis* como *Candida parapsilosis* complex; porque puede ser que la especie evaluada sea críptica y en esta base de datos no se puede diferenciar entre la especies pertenecientes a este complejo llamado – *psilosis*- ; es decir, *C.parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. De igual manera, si los resultados por la metodología convencional no son confiables, según el criterio del microbiólogo, se puede utilizar como herramienta complementaria la espectrometría de masas y si no, finalmente realizar análisis molecular.

Por otra parte, hoy en día se intenta introducir esta técnica para identificar patrones de resistencia a los antifúngicos, mas no de susceptibilidad; comprendiendo que estos mecanismos se expresan como moléculas de naturaleza proteica, como por ejemplo las bombas de eflujo de diversas especies de *Candida*. La presencia, de estas proteínas genera notables cambios en el espectro de masas, los cuales que pueden ser identificados como un biomarcador y con ello “predecir” un probable mecanismo de resistencia. Aunque no están validados ya hay algunos trabajos publicados como lo explican los autores De Carolis E. ⁽⁶⁰⁾ y Hrabák J. ⁽⁶¹⁾.

6.- Conclusiones

Se presenta la verificación del protocolo establecido por *Vitek-MS*[®] como una herramienta rápida y precisa para la identificación de levaduras. Los altos niveles de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica del método MALDI-TOF MS, para las especies de levaduras aquí evaluadas, pueden asociarse en un 90 a 100% con los resultados que se obtendrían, si la identificación se realizara por biología molecular.

Se recomienda elegir el método de extracción ideal, según la naturaleza celular del microorganismo, para una adecuada preparación pre-analítica de la muestra. En el caso de levaduras se recomienda utilizar colonias aisladas en ADS con cloranfenicol de no más de 72 h de incubación a 30°C. Así mismo pueden tomarse en cuenta las propiedades fúngicas del hongo, es decir, los hongos dimórficos son más sencillos de trabajar en su fase levaduriforme.

Además del ser un método flexible y sencillo, el corto tiempo en la identificación y la posibilidad de ampliar la base de datos demuestran que puede ser considerado como una técnica complementaria para la identificación rutinaria de levaduras y hongos dimórfico en el laboratorio de micología; inclusive puede ser utilizada como método de tamizaje para evitar llegar al análisis molecular, cuando éste se pretenda. Sin embargo, no reemplazará el trabajo “tradicional” del microbiólogo, ni su criterio, en la toma de decisiones. Además de que la identificación correcta no es siempre suficiente para el diagnóstico y cura terapéutica, porque es necesario realizar pruebas de susceptibilidad a los principales antifúngicos.

7.- Anexos

7.1- Material

7.1.1.- Instrumental

- Micropipeta ajustable (0.1-2.5 µL) + puntas estériles sin filtro.
- Palillos de madera estériles
- Portaobjetos VITEK MS-DS desechable compuesto de una base de polipropileno y una capa de acero inoxidable con 48 pocillos de reacción y 3 de calibración interna (ref. no. 410893 , BioMérieux, Durham, NC, USA)
- Cepa de calibración. LyfoCultus Plus *E. coli* ATCC® 8739 (ref. no. 301145 , BioMérieux, Durham, NC, USA)
- Agar dextrosa Sabouraud (ADS) con cloranfenicol BBL™
- CHROM-agar Candida BBL™
- Corn –meal con tween 80 al 1% ®
- Agar alpiste negro o Staib ®
- Auxacolor™ 2 (Bio-Rad ®)

7.1.2.- Reactivos

- Acido Fórmico al 25% (MS grade, ref. no. 411072, BioMérieux, Durham, NC, USA)
- Matriz: VITEK MS-CHCA : ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (ref. no. 411071, BioMérieux, Durham, NC, USA)
- Hidróxido de sodio al 10%
- Tinta china Parker®

7.1.3.- Equipo y software

- VITEK® MS – MALDI-TOF (BioMérieux, Durham, NC, USA).
- Myla V3.0.0.™
- VITEK® MS (IVD Knowledgebase v.2.0)

7.2.- Abreviaturas

ADNm: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

ADS: agar dextrose Sabouraud

ADS/C: agar dextrose Sabouraud con cloranfenicol

ALS1: Agglutinin Like Sequence 1

APC: célula presentadora de antígeno

Biggy: Bismuth sulfite glucose glycine yeast

BDG: 1,3-β-D-glucano

CHCA: ácido α-ciano-4-hidroxicinámico

Da: Dalton

DACAD: determinación de antígeno capsular por aglutinación directa

DOPA: dihidroxifenilalanina

EDTA: etilendiamina ácido tetracético

FDA : Food and Drug Administration

°C: grados Celsius

EUA: Estados Unidos de América

HDP: huella dactilar proteica

H.G.M. : Hospital General de México

HIV-SIDA: virus de inmunodeficiencia humana- síndrome de inmunodeficiencia adquirida

HWP1: Hyphal Specific Cell Wall Protein 1

INTP1: Integrin found Prtotein 1

ITS: Internal transcibed spacer

KOH: hidróxido de potasio

LBA: lavado broquioalveolar

LCR: líquido cefalorraquídeo

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight

MM: masa molecular

MNT1: Mannosyltransferase 1

MS: Espectrometría de masas

PCR: Protein Chain Reaction

pH: potencial de hidrogeno

PSR: Phylogenetic Species Recognition

RFLP: "rif-lip" Análisis por fragmentos de restricción

RM: razón de momios

SAP : secretory aspartyl preteinase

SNC: sistema nervioso central

u: unidad de masa atómica

z: valor de carga eléctrica

8.- Bibliografía

1. Esser K. *The Mycota: XII Human Fungal Patogens*. 2nd. Kurzai O., editor. Germany: Springer; 2014.p.3-8
2. Vesga O, Leiderman E, Restrepo A, Lázaro A, Vélez G. *Enfermedades infecciosas de Homo Sapiens*. Cap 181, 183. 1ª ed. Colombia: CIB; 2015.
3. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2015.
4. Pence MA. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33: 1703-12.
5. Chalupová J, Raus M, Sedlářová MS, et al. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotech Adv*. 2014; 32: 230-41.
6. Clark A, Kaleta E, Arora A, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *CMR*. 2013; 26: 547-603.
7. Marklein G, Josten M, Klanke U, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *JCM*. 2009; 47: 2912-17.
8. Rosevinge F, Dzajic E, Knudsen E, et. al. Performance of matrix assisted laser desorption - time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *Mycoses*. 2013; 56: 229-235
9. Cámara-Sala ML, Martínez R, Olmos P, Catalá V, Ocete MD, Gimeno C. Validación y verificación analítica de métodos microbiológicos. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin*. 2015;33:1-6
10. Deak E, Charlton C, Bobenchik A, et. al. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diag Microbiol & Infect Dis*. 2015; 81: 27-33
11. Criseo G, Scordino F, Romeo E. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J. Microbiol. Methods*. 2015; 111: 50-56.
12. Clark R, Lewinski M, Loeffelholz M, Tibbetts R. *Cumitech 31A, Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory*. Washington, D.C.: ASM Press; 2009.
13. Laurel EB. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. *CMNNEJ*. 1997; 19:153-160.

14. Hagen F, Khayhan K, Kolecka A, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol.* 2015
15. Firacative C, Trilles L, Weiland M. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. *PLoS one.* 2012; 7: e37566.
16. McTaggart L, Eric L, Richardson S, et al. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *JCM.* 2011;49 : 3050-53.
17. Van Herendael B, Bruynseels M, Bensaid M, et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31:841–848.
18. Guarro J. Taxonomy and biology of fungi causing human infection. *Enf infec y microbiol clín.* 2012; 30:33-39
19. Cuenca-Estrella M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *CMI.* 2013; 20:54-59.
20. Allen T, Griffin E. Update on fungal diagnostics. *Curr Infect Dis Rep.* 2014; 415: 2-10.
21. Arango M, Castañeda E. *Micosis Humanas: Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos.* 2nd ed. Medellín, Colombia: CIB y DSID del INS; 2003.
22. Ellis D. *Description of Medical Fungi.* 2nd ed. Australia: ISHAM; 2007.
23. Pulcrano G, Iula D, Vollaro V, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Meth.* 2013; 94:262-266.
24. Murray PR, Jo Baron E, Jorgensen J, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th edition. Chapters: 115-119. Washington, D.C. : ASM Press; 2007
25. Borkovich KA, Ebbole DJ. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi.* Washington, D.C.: ASM Press; 2010. p. 717-35,751-767
26. Marcos-Zambrano L, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Aplicación de las técnicas de tipificación molecular al estudio de brotes hospitalarios de candidemia. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31:97-103

27. Sullivan D, Moran G, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Resch.* 2004;4:369-376.
28. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillard C, Poulain D, Nguyen H. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *JMD.* 2011;13:12-22.
29. Chayakulkeeree M, Perfect J. Cryptococcosis . *Infec Dis Clin N Am.* 2006; 20: 507-544.
30. Franco-Paredes C, Womack T, Bohlmeier T, Sellers B, Hays A, Patel K, et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15: 348-55.
31. Bernal L, Gomez A, Castelli M, Mesa A, Zaragoza O, Rodrioguez J, Cuenca M. Susceptibility profile of clinical isolates of non- *Cryptococcus neoformans* / non- *Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literatura review. *Med Mycology.* 2010; 48: 90-96.
32. Posteraro B, Vella A, Cogliati M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 2472-6.
33. Kronstand J, Attarian R, Cadieux B, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Mic.* 2011; 9: 193-203.
34. Almeida J, Figueiredo D, Toubas D, Negro G, Motta A, Rossi F, et al. Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. *CMI.* 2013;20:784-790.
35. Guevara Robles M, Urcia Ausejo F, Casquero Cabero J. *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas.* Lima, Perú: INS; 2007.
36. Welker M. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics.* 2011; 11: 3143-53.
37. Zhang Li, Xiao M, Wang H, et al. Yeast identification algorithm based on use of the Vitek MS system selectively supplemented with ribosomal DNA sequencing: proposal of a reference assay for invasive fungal surveillance programs in China. *JCM.* 2014; 52: 572-7.
38. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Posteraro P, Ricciardi W, et al. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight

mass spectrometry –based yeast identification using a fast Protein extraction procedure. *JCM*.2014;52:1453-8.

39. Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry identification of yeast is contingent on robust reference spectra. *PLoS ONE*. 2011; 6: 1-7
40. Basková L, Buchta V. Laboratory diagnosis of invasive fungal infections : an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol*.2012; 57: 421-430
41. Galán F, García L, Guerrero I, Marín P, García A, García P, et al. Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés médico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2014. In press.
42. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*. 2012; 109; 6241-46.
43. Burtis C, Ashwood E, Bruns D. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Saunders, 7th ed. 2012
44. Shah HN, Gharbia SE. *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*. Chichester: John Wiley; 2010.
45. Cotte Rodriguez I. *Characterization of protein therapeutics using mass spectrometry*. 1st ed. Cheng G., editor. USA: Springer; 2013.p.1-7
46. Patel R . MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*. 2015;61: 100-111
47. Havlicek V, Lemr K, Schung K. Current trends in microbial diagnostics based on mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013;85:790-797
48. Liu Z, Schey K. Fragmentation of multiply-charged intact protein ions using MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spect*. 2008;19:231-238
49. Vitek-MS. [Actualizado Enero 2015, Visitado 30 de Septiembre 2015] disponible en <http://www.vitekms.com/technology.html>
50. Westblade L, Jenneman R, Branda J, Bythrow M, Ferreraro M, Garner O, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeast. *JCM*. 2013; 51: 2267-2272

51. Legarraga P, Moraga M, Lam M, et al. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chilena Infectol.* 2013; 30: 140-146.
52. Dhiman N, Hall L, Wohlfel S, Buckwalter S, Wengenack N. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *JCM.* 2011;49: 1614-1616.
53. Tan K, Ellis B, Lee R, et al. Prospective Evaluation of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System in a Hospital Clinical Microbiology Laboratory for Identification of Bacteria and Yeasts: a Bench-by-Bench Study for Assessing the Impact on Time to Identification and Cost-Effectiveness. *JCM.* 2012; 50: 3301-8.
54. Jamal W, Ahmad S, Khan Z, Rotimi V. Comparative evaluation of two matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) systems for the identification of clinically significant yeast. *Int J Infect Dis.* 2014. In press
55. Buskirk AD, Hettick JM, Chipinda I, Law BF, Siegel PD, Slaven JE, et al. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal Biochem.* 2011; 411:122-8.
56. Mendoza Núñez V, Sánchez Rodríguez M. *Análisis y difusión de resultados científicos.* 1ª ed. 2da reimpresión, México: FES Zaragoza; 2002.
57. Demidov E, Starostin K, Popik V, Peltek S. Use of MALDI-time of flight mass spectrometry for microorganism identification. *Russian J. Gen. Applied Resech.* 2014;4:758-764
58. Hamprecht A, Christ S, Oestreicher T, Plum G, Kempf V, Gottig S. Performance of two MALDI-TOF systems for identification of yeast isolated from bloodstream infections and cerebrospinal fluids using a time-saving direct transfer protocol. *Med Microbiol Immunol.* 2014;203: 93-99
59. Chao Q, Lee T, Teng S, Peng L, Chen P, Teng L, et al. Comparison of accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeast. *PLoS ONE-* 2014;9 :1-13
60. De Carolis E, Vella A, Florio A, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *JCM.* 2012; 50: 2479-83

61. Hrábak J, Chudácková E, Walková R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanism: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol. Rev.* 2013; 26:103-14.