

**CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

**MÉTODOS CROMOGÉNICOS Y FLUOROGÉNICOS  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESPECIES DE *Candida*  
DE RELEVANCIA CLÍNICA**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**TAMARA LOBAINA RODRÍGUEZ**

**La Habana**

**2010**

**CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

**MÉTODOS CROMOGÉNICOS Y FLUOROGÉNICOS  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESPECIES DE *Candida*  
DE RELEVANCIA CLÍNICA**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autora: Ing. TAMARA LOBAINA RODRÍGUEZ, M Cs**

**Tutores: Inv. Tit., Ing. Claudio Rodríguez Martínez, Dr C**

**Inv. Tit., Ing. Raisa Zhurbenko, Dra C**

**La Habana**

**2010**

Dedicatoria:

Los resultados de esta investigación, junto con todo su esfuerzo, se la dedico a todos los profesionales y técnicos de la ciencia y la salud, para que puedan utilizarlos eficazmente y le procuren un bienestar a aquellas personas que en algún momento de su vida necesiten un diagnóstico rápido y certero de una infección por *Candida*.

## Agradecimientos

Ante todo, quiero expresar mi admiración y respeto a todos los doctores en ciencias de Cuba, pues al transitar este camino, he conocido cuanto esfuerzo, sacrificio, constancia, voluntad, amor y tenacidad va aparejada al cumplimiento de este propósito.

Decía Marx que: “para que la conciencia y el pensamiento se desarrollen, los individuos deben satisfacer sus necesidades vitales y sus condiciones materiales”, así es que consciente de que voy a comenzar a la inversa de lo acostumbrado en otros documentos; pero muy de acuerdo con las normas elementales de la aritmética -de que el orden de los factores no altera el producto- deseo agradecerle a mi esposo **Joel San Germán**. Hombre, amigo, padre de mis hijos y mi compañía de tantas batallas. Juntos hemos defendido tres tesis (Ingeniera Química, Master en Fisiología y el Doctorado en Ciencias de la Salud), tal vez la tercera es la vencida. Muchas gracias por soportar el desorden del hogar, los desvelos, por ocupar mi lugar cuando fue necesario y por tu cariño. Besos.

Manifiesto, además, mi inmensa gratitud, al **Dr C Claudio Rodríguez**, mi tutor, director, amigo y hasta hermano en ocasiones. La realización de este trabajo me ha permitido aprender mucho de ti y me ha enseñado a confiar en mí misma y madurar en lo profesional. ¿Cuántos retos me has confiado, doctor? Te agradezco la dirección de esta tesis, el haber creído en mí, tus consejos, tu claridad para ver desde el principio lo que se debía hacer, tu atención a toda hora, tu optimismo, tu energía y tu ejemplo de perseverancia.

Con qué palabras podría expresarle a la **Dra C Raisa Zhurbenko**, mi tutora, cuán agradecida le estoy. Ese ser humano tan especial, emigrado desde la antigua URSS, que vive por los demás. Cuando descubrí tu capacidad para orientar, respaldar y apoyar a tus discípulos, sopesando sus defectos, impulsos y entusiasmo, supe que era junto a ti que quería formarme. Ha sido muy valioso contar con tu asesoramiento, evaluación objetiva y revisión de este trabajo. Estoy consciente de que además de invadir tu tiempo libre, para ello tuviste que realizar en varias ocasiones un sobre esfuerzo. ¡Muchas gracias, Zhurben!

Agradezco también a **Yordania Zayas Ruiz**, mi mano izquierda (porque soy zurda). Por ser la persona responsable de todos los resultados técnicos satisfactorios alcanzados durante la ejecución práctica de las tareas investigativas. Gracias por seguir con el mismo interés mi ímpetu, por tu solidaridad, tu fortaleza y tu lealtad.

Es para mí un honor haber tenido la oportunidad de iniciar mi formación acerca de la micología en el “Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri”, prestigiosa institución nacional y conocer al **Dr C Carlos M. Fernández Andreu**, maravilloso profesor y amigo, al cual estoy muy agradecida por su acogida desde el principio, su paciencia para escucharme, su apoyo en todo momento y por sus consejos que contribuyeron a facilitarme el acceso a la información requerida para alcanzar la meta.

Mi estancia en el IPK me permitió, además, conocer a la **Dra C Alina Llop**, distinguida científica cubana, que me abrió las puertas del laboratorio de referencia nacional, quien me inspiró a amar el camino escogido y me aconsejó en cada presentación para superar la calidad del trabajo. Así mismo, agradezco la posibilidad de haber conocido a los compañeros **Gerardo Martínez**, **Mayda Perurena** y **María Teresa Illnait** de quienes también aprendí mucho y pienso que aún me queda por aprender.

Agradezco, a su vez, a la **Lic Maribel Chao** y la **Dra C Susana** por ser tan amables, y brindarme apoyo y tranquilidad al conducirme por los diferentes pasos a seguir para alcanzar el objetivo final.

A **Gloria Caso**, por su cariño y sus consejos.

A los miembros del consejo científico, el tribunal de la pre-defensa y a mis oponentes **Dra C Gilda Toraño** y **Dr C Antonio Melchor**, por aceptar esta tarea, por escucharme y por la revisión exhaustiva del documento, el cual se perfeccionó más luego de tener en cuenta sus sugerencias.

Deseo expresar mi gratitud a mis amistades cercanas, **Vivian, Dianelis, Meylín, Daynier, Gisel Sánchez, Jorge Enrique Bello, Raúl Morales, Carlos Martínez, Grisel Pérez** a quienes formalmente uno no tiene la ocasión de decirles lo agradecida que les estoy por soportarme, por aliviar mis preocupaciones con su cariño, por escucharme y ayudarme a sobre llevar los momentos complicados de mi vida.

Aprovecho el momento para agradecer a mi centro, **BioCen**, a la Planta de Producción de Medios de Cultivo, a los diferentes departamentos y laboratorios de todas las direcciones que han colaborado en alguna fase del trabajo, en especial: **Franklin Barroetabeña, Alberto Varela, Albertina Estrada, Ariel Famadas, Yoana Contreras, Odalis Espinosa, María Teresa Simil, Zamil, Lourdes Chi, Mabel Alfonso, Caridad Suárez, Sandra Osorio Maylén Tibau, Marielis Armenteros, José Miguel García Marichal, Tatiana Hernández, Vivian San Germán, Didialis, Sidelsis, Juan Carlos Vega, Marleris Sánchez, Gervasio Cuervo, Sadielys Sánchez**, entre muchos otros.

Agradezco también el amor y el cariño brindado por mis compañeros del departamento de investigaciones, **Marilyn, Diana, Yasuramih, Yanary, Ana Luisa, Ana Iris, Ana Zenaida, Yoandry, Maikel** y las nuevas adquisiciones **Ivonne** (mi estudiante incansable), **Rachel, Dennis y Maykel**, a ustedes que han sabido darme valor para realizar mi trabajo y que han confiado más que yo misma en esta faena, muchas gracias.

A los doctores en ciencias: **Elisa Aznar, Raúl González, Alexis Labrada y Orestes Mayo** por sus consejos oportunos y su preocupación.

Agradezco al **Lic Jorge Luis Muñoz, Dra Ana Berta Dueñas, Dr C Rafael Nodarse, Lic Iliana Paneque**, entre otros técnicos y profesionales de laboratorios que participaron en la evaluación microbiológica de los nuevos diagnosticadores, lo cual significó un sobre esfuerzo añadido al trabajo que diariamente realizan.

Muy agradecida estoy de mi director **Alberto Agraz**, por facilitar y permitir mi dedicación casi exclusiva a la realización de esta tesis, por su confianza, ayuda y preocupación siempre tan oportunas. Así mismo agradezco a todos los directores de BioCen, por su apoyo en los materiales, así como para la transportación necesarios para la ejecución este trabajo.

Mi agradecimiento para mis familiares más próximos: **Danny San Germán** (mi hijo mayor) quien siempre es capaz de sorprenderme en la vida, **Aramís San Germán** (mi hijo menor) por ser mi admirador preferido hasta el punto de aprenderse las especies de *Candida* por su color, **Caridad Rodríguez** (mi mamá), por encontrar el secreto y la fuerza para vivir y a **Rocney Lobaina** (mi hermano mayor) por su ejemplo de tenacidad y valentía. Me es indispensable mencionar a mi abuela, mi papá y mi hermano menor, ya extintos, pero a pesar de todo su cariño resucita dentro de mí continuamente. Así como, a todas sus santas y hadas protectoras que me acompañan en el camino.

Para culminar deseo compartir una frase del poeta americano Ralph Waldo Emerson: “Reír a menudo y mucho; ganar el respecto de gente inteligente y el cariño de los niños, conseguir el aprecio de críticos honestos y aguantar la traición de falsos amigos; apreciar la belleza; encontrar lo mejor en los demás; dejar el mundo un poco mejor, sea con un niño saludable, una huerta o una condición social redimida; saber que por lo menos una vida ha respirado mejor porque tú has vivido. Eso es tener éxito”.

Muchas gracias a todos

TAMA

## SÍNTESIS

La obtención de un nuevo extracto vegetal de *Ipomoea batatas* permitió el crecimiento de especies de *Candida* de importancia clínica y su detección mediante las reacciones cromogénicas y fluorogénicas en medios sólidos. Sus propiedades posibilitaron el diseño de dos novedosos medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos y sus respectivos métodos para el cultivo, aislamiento primario, detección, identificación simultánea y enumeración de 10 especies de *Candida*, directamente de las muestras, con una excepcional recuperación relativa y en un tiempo mínimo de 36 h. Ambos medios fueron registrados como diagnosticadores por el CECMED y se otorgaron cuatro Certificados de Autor de Invención en Cuba. Se modificó un procedimiento para la prueba de auxonograma, incluyendo una original composición agarizada, facilitando la obtención de resultados en 24 h con una elevada exactitud relativa. Por primera vez, se estudiaron más de 30 parámetros de validación y de la incertidumbre de las mediciones en el diagnóstico microbiológico clínico evidenciando la total equivalencia de los nuevos métodos con respecto a la metodología de referencia. La producción nacional de los diagnosticadores desarrollados resultó económicamente factible, lo que posibilita la sustitución de importaciones de medios y reactivos para el mismo propósito.

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS

$\chi^2$	distribución chi cuadrado
A	conformidad
AcL	ácido láctico
ACT	actidiona o cicloheximida
ADO	adonitol
ADS	agar dextrosa de Sabouraud
AELG	agar extracto de levadura y glucosa con cloranfenicol
AFNOR	<i>Association Francaise de Normalisation</i>
AN	acuerdos negativos
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AP	acuerdos positivos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLT	blastosporas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
C	concordancia
CECMED	Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
CEL	celobiosa
CLM	clamidosporas
CMI	concentración mínima inhibitoria
CT	carbohidratos totales
CUC	peso cubano convertible
CUP	peso cubano moneda nacional
CV	coeficiente de variación
CVC	catéter venoso central
D	3% del valor medio de la media de los recuentos
DC	diferencia de cuadrados
DN	desvíos negativos
DP	desvíos positivos
E	eficiencia
ENCB, IPN	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional de México
EsR	especificidad relativa
ExR	exactitud relativa
F	selectividad
FDA	<i>Food and Drug Agency</i>
$F_{SNA}$	factorial de la suma de los negativos por el método alternativo
$F_{SNR}$	factorial de la suma de los negativos por el método de referencia

$F_{SPA}$	factorial de la suma de los positivos por el método alternativo
$F_{SPR}$	factorial de la suma de los positivos por el método de referencia
$F_{TA}$	factorial del total del método alternativo
$F_{TN}$	factorial del total de los negativos
$F_{TP}$	factorial del total de los positivos
$F_{TR}$	factorial del total del método de referencia
$F_{TT}$	factorial de todos los valores positivos y negativos por ambos métodos
GAL	galactosa
gL	grados de libertad
GLU	glucosa
$G_{n-1}^2$	índice de proporcionalidad
I+D	investigación y desarrollo
IC	intervalo de confianza
INO	inositol
ISO	<i>International Standards Organization</i>
LAC	lactosa
LC	nivel crítico
LD	límite de determinación
LI	límite inferior
lnX	logaritmo del recuento individual
LOQ	límite de cuantificación
L-Pro	L-prolina paranitroanilida
LS	límite superior
M	media global
MAL	maltosa
MDG	metil $\alpha$ -D-glucopiranosido
MLPU	medio listo para el uso
MLZ	melecitosa
MU- $\alpha$ -glc	4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido
MU-gal	4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida
MWU	unidad modificada de Wolhgemuth
$n^+$	número de resultados positivos
Nam	nitrógeno amínico
NC	nivel de confianza
NordVal	<i>Nordic System for Validation of Alternative Methods</i>
Nt	nitrógeno total
OCPI	Oficina Cubana de la Propiedad Industrial



P	probabilidad
p/p	peso en peso
PF	producto de los factoriales
PM	valor medio de la media de los recuentos
Pn	probabilidad de los resultados negativos
PNO	procedimiento normalizativo de operación
Pp	probabilidad de los resultados positivos
Pp <sub>mr</sub>	probabilidad de los pares con los mismos resultados
Pp <sub>n</sub>	probabilidad de los pares de resultados negativos
Pp <sub>p</sub>	probabilidad de los pares de resultados positivos
PR <sub>IL</sub>	pares de las réplicas inter-laboratorios
PR <sub>IL-IR</sub>	pares de las réplicas inter-laboratorios con iguales resultados
PSH	pseudohifas
R	variable de proporcionalidad
RAF	rafinosa
Ros-glc	6-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido
rpm	revoluciones por minuto
RR	recuperación relativa
RSD	desviación estándar relativa
RSD <sub>i</sub>	desviación estándar individual
RSD <sub>L</sub>	desviación estándar entre los laboratorios
RSD <sub>r</sub>	desviación estándar relativa de la repetibilidad
S <sub>0</sub>	desviación estándar
SDC	suma de la diferencia de cuadrados entre los recuentos
SE	diferencia entre la media puntual y la media global elevada al cuadrado
SN	suma de resultados negativos
SOR	sorbitol
SP	suma de resultados positivos
S <sub>r</sub>	desviación estándar de la repetibilidad
SR	sensibilidad relativa
ST	sólidos totales
Sx <sub>m</sub>	desviación estándar de la media
TG	tubo germinativo
TPH	trasplante de progenitores hematopoyéticos
T <sub>R</sub>	recuento relativo respecto al volumen
TRH	trehalosa
TTC	2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio

$T_X$	suma de los recuentos de las réplicas
$u$	factor de sobredispersión
$U$	incertidumbre expandida
UCI	unidad de cuidados intensivos
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	ultravioleta
$V$	varianza de los recuentos para cada intervalo de tiempo
$V_0$	varianza de los recuentos
$V_A$	varianza agrupada para el conjunto de valores del par de temperaturas
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
$V_{ML}$	volumen del inóculo por placa
$V_R$	volumen relativo
$V_{SD}$	varianza dentro de las placas
$V_{SE}$	varianza entre placas
$X_0$	mediana de los valores
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida
X-glc	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosido
X-glu	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida
$X_H$	recuento para cada período de tiempo
$X_i$	recuento de unidades formadoras de colonias por placa
XIL	xilosa
$X_{iP}$	porcentaje de la diferencia relativa del logaritmo de los recuentos promedios
$X_{in}$	media puntual de los logaritmos de los recuentos
$X_m$	media de los recuentos
$X_{MP}$	valor medio de $X_{iP}$
$X_P$	recuento promedio de las réplicas de la muestra
$Y$	razón de Lexis

ÍNDICE	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	7
1.1 Generalidades de los hongos .....	7
1.2 <i>Candida</i> : taxonomía, ecología y principales agentes etiológicos .....	7
1.3 Candidiasis y candidemias. Factores predisponentes.....	8
1.4 Aspectos epidemiológicos cambiantes, sus implicaciones clínico-terapéuticas y necesidad del diagnóstico a nivel de especie .....	11
1.5 Principales fuentes nutricionales para el cultivo de levaduras .....	12
1.6 Identificación de especies de <i>Candida</i> empleando técnicas de cultivo convencionales..	14
1.6.1 Diagnóstico diferencial de <i>Candida dubliniensis</i> .....	17
1.7 Sistemas comerciales basados en la asimilación de nutrientes, pruebas enzimáticas e inmunológicas para la identificación de levaduras .....	18
1.7.1 Identificación rápida de <i>Candida albicans</i> .....	18
1.7.2 Identificación rápida de <i>Candida glabrata</i> .....	18
1.7.3 Métodos inmunológicos .....	20
1.7.4 Técnicas de biología molecular .....	20
1.8 Métodos para el estudio de la sensibilidad <i>in vitro</i> de las levaduras .....	21
1.9 Diagnóstico a partir del cultivo primario utilizando métodos cromogénicos .....	22
1.10 Medios cromogénicos y fluorogénicos para el diagnóstico diferencial de las especies de <i>Candida</i> de importancia clínica.....	23
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1 Materiales.....	28
2.1.1 Materias primas de origen vegetal .....	28
2.1.2 Agente enzimático .....	28
2.1.3 Material biológico .....	28
2.1.4 Sustratos cromogénicos y fluorogénicos .....	28
2.2 Desarrollo de un extracto nutritivo de origen vegetal .....	29
2.2.1 Metodología para la obtención del extracto de batata.....	29

2.2.1.1 Estudio de la influencia del pH en el proceso de hidrólisis enzimática sobre la calidad del extracto de batata .....	29
2.2.1.2 Evaluación de la influencia de la concentración de la enzima durante la hidrólisis	29
2.2.1.3. Métodos para la purificación del extracto de batata .....	30
2.2.2 Procedimiento para la obtención del extracto de tomate .....	30
2.2.3 Funcionalidad microbiológica de los extractos nutritivos .....	30
2.2.4 Evaluación de la influencia de los extractos nutritivos en el desarrollo de características cromogénicas y fluorogénicas en composiciones para la identificación de especies de <i>Candida</i> .....	31
2.2.5 Fabricación a nivel industrial del extracto de batata.....	31
2.2.5.1 Análisis organoléptico y físico-químico .....	31
2.2.5.2 Análisis microbiológicos.....	31
<b>2.3 Desarrollo a ciclo completo del medio cromogénico.....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Evaluación funcional de composiciones cromogénicas.....	32
2.3.2 Evaluación microbiológica de formulaciones que combinan los sustratos con el glicerol .....	32
2.3.3 Evaluación del efecto inhibitorio del desoxicolato de sodio y el ácido nalidíxico .....	33
2.3.4 Evaluación funcional de la composición cromogénica con una mayor concentración del extracto de batata.....	33
2.3.5 Introducción en la industria del medio de cultivo cromogénico y del Suplemento Glicerol .....	33
2.3.6 Evaluación externa del desempeño del medio cromogénico.....	34
<b>2.4 Modificación del método de auxonograma para la identificación de <i>Candida</i> spp. ....</b>	<b>34</b>
<b>2.5 Desarrollo a ciclo completo de un método cromogénico-fluorogénico.....</b>	<b>35</b>
2.5.1 Estudio de la influencia del sustrato MU- $\alpha$ -glc para la diferenciación de <i>Candida</i> spp.	35
2.5.2 Introducción del medio de cultivo cromogénico-fluorogénico en la industria .....	35
2.5.3 Evaluación externa del desempeño del medio cromogénico-fluorogénico .....	36
<b>2.6 Validación intra- e inter-laboratorios y determinación de la incertidumbre de los métodos .....</b>	<b>36</b>

2.6.1 Validación del método cromogénico .....	36
2.6.1.1. Evaluación de los parámetros de inclusividad y exclusividad .....	36
2.6.1.2 Determinación del límite de detección .....	36
2.6.1.3 Determinación del nivel crítico y el límite de cuantificación.....	37
2.6.1.4 Cálculo del límite de determinación.....	37
2.6.1.5 Estudio de la robustez a diferentes temperaturas de incubación .....	37
2.6.1.6 Estudio de la robustez del tiempo de incubación .....	37
2.6.1.7 Evaluación de la proporcionalidad o linealidad (robustez del volumen a inocular)37	
2.6.1.8 Determinación de la exactitud relativa y selectividad del medio CromoCen CND-C utilizando cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes .....	38
2.6.1.9 Estudio de la exactitud relativa del medio CromoCen CND-C en exudados vaginales .....	38
2.6.1.10 Cálculo de la recuperación relativa total.....	39
2.6.1.11 Estudio de la equivalencia del método alternativo con respecto al de referencia39	
2.6.1.12 Evaluación de la repetibilidad individual (intra-laboratorio) .....	39
2.6.1.13 Estudio de la repetibilidad inter-laboratorios (reproducibilidad media del método) .....	39
2.6.1.14 Determinación de la dispersión de los recuentos según la distribución de Poisson .....	39
2.6.1.15 Estudio de la sobredispersión de los recuentos paralelos .....	40
2.6.1.16 Análisis de la conformidad y la concordancia.....	40
2.6.2 Validación del método cromogénico-fluorogénico .....	40
2.6.2.1. Evaluación de los parámetros de inclusividad y exclusividad .....	40
2.6.2.2 Determinación de la exactitud relativa del medio CromoCen CND-F a partir de cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes .....	40
2.6.2.3 Estudio de la exactitud relativa del CromoCen CND-F utilizando exudados vaginales .....	40
2.6.2.4 Cálculo de la recuperación relativa total del medio CromoCen CND-F.....	41

2.6.2.5 Estudio de la equivalencia de los recuentos del CromoCen CND-F con los medios agar dextrosa de Sabouraud y CromoCen CND-C.....	41
2.6.2.6 Estudio de la equivalencia entre el recuento colonial con y sin fluorescencia .....	41
<b>2.7 Evaluación de la factibilidad de producción y empleo de los nuevos diagnosticadores..</b>	<b>41</b>
2.7.1 Evaluación comparativa de la funcionalidad biológica de CromoCen CND-C, con respecto a los medios agar dextrosa de Sabouraud, CHROMagar Candida y Candida ID.....	42
2.7.2 Comparación de los medios CromoCen CND-C, CromoCen CND-F, CHROMagar Candida y agar Nickerson para el diagnóstico diferencial de <i>Candida</i> spp. ....	42
2.7.3 Efecto económico y análisis de la sostenibilidad productiva de los nuevos diagnosticadores .....	42
<b>2.8 Procesamiento estadístico y cálculo de los parámetros de la validación .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Desarrollo de un extracto nutritivo de origen vegetal .....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Metodología para la obtención del extracto de batata.....	44
3.1.1.1 Influencia del pH en el proceso de hidrólisis sobre la calidad del extracto de batata .....	44
3.1.1.2 Efecto de la concentración de la enzima durante la hidrólisis del extracto de batata .....	44
3.1.1.3 Análisis de los métodos para la purificación del extracto de batata.....	45
3.1.2 Desarrollo de un extracto nutritivo a partir del tomate .....	45
3.1.3 Resultados de la evaluación funcional de los extractos nutritivos.....	46
3.1.4 Influencia de los extractos nutritivos en el desarrollo de características cromogénicas y fluorogénicas en composiciones especiales para la identificación de especies de <i>Candida</i> .	47
3.1.5 Obtención a escala industrial de la base nutritiva a partir de <i>Ipomoea batatas</i> .....	48
3.1.5.1 Resultados del análisis organoléptico y físico-químico .....	48
3.1.6.2 Resultados del análisis microbiológico .....	49
<b>3.2. Desarrollo a ciclo completo del medio cromogénico.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Funcionalidad microbiológica de composiciones cromogénicas.....	51

3.2.2 Resultados de la evaluación microbiológica de formulaciones que combinan los sustratos cromogénicos con el glicerol .....	51
3.2.3 Efecto inhibitorio de la combinación del desoxicolato de sodio y el ácido nalidíxico..	53
3.2.4 Resultados de la evaluación de la composición cromogénica enriquecida con una mayor concentración del extracto de batata.....	54
3.2.5 Resultados de la producción a escala industrial del medio cromogénico y su suplemento .....	55
3.2.6 Desempeño del medio de cultivo cromogénico y su suplemento en laboratorios externos.....	56
<b>3.3 Resultados de la modificación del método de auxonograma del carbono para la identificación de las especies de <i>Candida</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>3.4 Desarrollo a ciclo completo de un método cromogénico-fluorogénico.....</b>	<b>61</b>
3.4.1 Influencia del MU- $\alpha$ -glc para la diferenciación de <i>Candida</i> spp.....	61
3.4.2 Resultados de la obtención del medio cromogénico-fluorogénico en la industria .....	62
3.4.3 Desempeño del medio cromogénico-fluorogénico .....	63
<b>3.5 Validación intra- e inter-laboratorios y determinación de la incertidumbre de los métodos .....</b>	<b>65</b>
3.5.1 Validación del método cromogénico .....	65
3.5.1.1. Resultados de la evaluación de los parámetros de inclusividad y exclusividad ....	65
3.5.1.2 Límite de detección del método de referencia y del método alternativo .....	68
3.5.1.3 Nivel crítico y límite de cuantificación del método de referencia y el método alternativo.....	70
3.5.1.4 Límite de determinación de los métodos de referencia y alternativo .....	71
3.5.1.5 Robustez de los métodos a diferentes temperaturas de incubación.....	71
3.5.1.6 Resultados del estudio de la robustez de los métodos a diferentes períodos de incubación.....	72
3.5.1.7 Proporcionalidad del volumen de los métodos de referencia y alternativo.....	72
3.5.1.8 Evaluación de la capacidad diagnóstica del medio CromoCen CND-C a partir de cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes .....	72

3.5.1.9 Exactitud relativa del medio CromoCen CND-C con muestras de exudados vaginales .....	77
3.5.1.10 Recuperación relativa total del CromoCen CND-C y el agar dextrosa de Sabouraud .....	81
3.5.1.11 Equivalencia entre el método de referencia y el método alternativo .....	81
3.5.1.12 Resultados del estudio de la repetibilidad individual (intra-laboratorio) .....	81
3.5.1.13 Resultados de la repetibilidad inter-laboratorios.....	83
3.5.1.14 Dispersión de los recuentos de los métodos de referencia y alternativo.....	83
3.5.1.15 Sobredispersión de los recuentos paralelos de los métodos de ensayo.....	84
3.5.1.16 Criterio de la conformidad y la concordancia del método.....	84
3.5.2 Validación del método cromogénico-fluorogénico .....	85
3.5.2.1. Parámetros de inclusividad y exclusividad del CromoCen CND-F .....	85
3.5.2.2 Evaluación de la capacidad diagnóstica del medio CromoCen CND-F a partir de cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes .....	87
3.5.2.3 Exactitud relativa del medio CromoCen CND-F a partir de exudados vaginales....	90
3.5.2.4 Recuperación relativa total del CromoCen CND-F con respecto al agar dextrosa de Sabouraud y al CromoCen CND-C.....	91
3.5.2.5 Equivalencia de los recuentos del CromoCen CND-F con el medio agar dextrosa de Sabouraud y con el medio CromoCen CND-C.....	91
3.5.2.6 Equivalencia del recuento colonial de <i>Candida parapsilosis</i> con y sin fluorescencia en el medio CromoCen CND-F .....	92
<b>3.6. Factibilidad de producción y empleo de los nuevos diagnosticadores.....</b>	<b>92</b>
3.6.1 Funcionalidad biológica de CromoCen CND-C con respecto a los medios agar dextrosa de Sabouraud, CHROMagar Candida y Candida ID .....	92
3.6.2 Resultados de la evaluación de los medios CromoCen CND-C, CromoCen CND-F, CHROMagar Candida y agar Nickerson para el diagnóstico diferencial de especies de <i>Candida</i> .....	93
3.6.3 Valoración económica y análisis de la sostenibilidad productiva de los nuevos productos .....	94



<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>
<b>Anexo A. Principales constituyentes y propiedades físico-químicas de las materias primas seleccionadas para la obtención de extractos nutritivos .....</b>	
<b>Anexo B. Referencias y operaciones fundamentales para la evaluación económica de los productos desarrollados.....</b>	
<b>Anexo C. Compendio de las principales expresiones matemáticas para el cálculo de los parámetros seleccionados para la validación de los nuevos métodos microbiológicos .....</b>	
<b>Anexo D. Certificados de Autor de Invención concedidos a los productos desarrollados.....</b>	
<b>Anexo E. Documentos que certifican la liberación y aprobación del extracto de batata.....</b>	
<b>Anexo F. Estudio del período de validez de los nuevos diagnosticadores listos para el uso .....</b>	
<b>Anexo G. Documentos que certifican la liberación y aprobación de la base de medio CromoCen CND-C .....</b>	
<b>Anexo H. Certificados de los registros sanitarios de los nuevos productos.....</b>	
<b>Anexo I. Documentos que certifican la liberación y aprobación de la base de medio CromoCen CND-F .....</b>	
<b>Anexo J. Evaluación del desempeño del método cromogénico en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología y Parasitología del IPK.....</b>	

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas oportunistas se incrementaron considerablemente en los últimos decenios y constituyen un serio problema en el campo de la salud pública (Mesa *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2006; Benetucci *et al.*, 2008). Varios estudios concuerdan en que las complicaciones más frecuentes están asociadas a individuos con alteraciones del sistema inmunitario. Entre los principales factores de riesgo, que favorecen las infecciones micóticas, se registran las enfermedades asociadas al sida, la diabetes, el cáncer, el embarazo, los trasplantes, las quimioterapias antimicrobianas e inmunosupresoras, las intervenciones quirúrgicas, la estancia prolongada en unidades de cuidados intensivos (UCI), entre otros (Godoy *et al.*, 2001; Fosch *et al.*, 2006; Dicker *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2009). En este contexto se engloba una población no despreciable, sujeta a padecer una micosis de comportamiento oportunista, con historia natural atípica, evolución rápida y pronóstico grave.

Entre las micosis ocasionadas por *Candida*, las afectaciones clínicas más frecuentes son las cutáneo-mucosas, pero se presentan cuadros más serios al ingresar estas levaduras al torrente sanguíneo o colonizar órganos profundos, con manifestaciones invasoras en el paciente inmunodeprimido, incluyendo entidades como las candidemias y candidiasis sistémicas, asociadas a elevados índices de morbi-mortalidad; con un elevado costo social y económico (Larrondo *et al.*, 2001; Pardi y Cardozo, 2002; Pérez-Blázquez, 2006; Leroy *et al.*, 2009).

El perfil epidemiológico de las infecciones por *Candida* varía en las diferentes regiones del mundo (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001; Gatica *et al.*, 2002). De manera global, los reportes indican que la prevalencia de *Candida albicans* decrece con respecto a otras especies del género, tales como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis* y *Candida lusitanae*; algunas de ellas con una aparición riesgosa por su resistencia intrínseca o adquirida al tratamiento electivo con los antifúngicos disponibles (Gatica *et al.*, 2002; Cooke *et al.*, 2002; Land *et al.*, 2009; Baradkar *et al.*, 2010). Por esta razón, las situaciones clínicas exigen, en la actualidad, un diagnóstico preciso y rápido de la especie, para aplicar una terapia adecuada y eficiente.

Existen numerosos esquemas para la identificación de levaduras sobre la base de sus características culturales, morfológicas y fisiológicas, los cuales requieren de prolongados períodos para un diagnóstico certero (Mendoza, 2005; Quesada *et al.*, 2007).

Comúnmente, para el cultivo de levaduras se emplean medios que contienen extractos de origen vegetal, caracterizados por su elevado contenido nutricional (fuentes de carbono, aminoácidos, vitaminas, minerales) suficiente para garantizar un rápido crecimiento y desarrollo microbiano (Al-Mosaid *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2004; Zhurbenko *et al.*, 2006). Algunas de las aplicaciones microbiológicas más divulgadas de los extractos vegetales están encaminadas al diagnóstico diferencial entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, a partir de las características macro- o microscópicas de las colonias aisladas (Al-Mosaid *et al.*, 2001 y 2003; Lees y Barton, 2003; Adou-Bryn *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2007). No obstante, la búsqueda de nuevas fuentes vegetales, sobre todo de origen autóctono, constituye una alternativa altamente atractiva para el diseño de medios de cultivo destinados al diagnóstico rápido de levaduras de interés médico.

En los últimos años se han alcanzado importantes avances en este campo, gracias al desarrollo y la utilización de varios medios y sistemas enzimáticos, que emplean sustratos cromogénicos y fluorogénicos, y permiten, con mayor eficiencia, la identificación presuntiva de distintas especies del género *Candida* y especialmente la de mayor incidencia - *C. albicans*. Sin embargo, estos productos se ofrecen, actualmente, en el mercado por un estrecho grupo de empresas comerciales, generalmente listos para el uso, con un breve período de vida útil y a precios muy elevados (Sood *et al.*, 2000; Umabala *et al.*, 2002; Guelfand *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Orenga *et al.*, 2009). Estos elementos limitan su empleo en la rutina del laboratorio clínico, en especial en nuestro país, dadas las dificultades económicas actuales.

En el mercado se hallan nuevos métodos independientes del cultivo, utilizando técnicas de la Biología Molecular, los cuales constituyen herramientas de gran valor en el diagnóstico rápido de las micosis invasoras, pero su aplicación se ve restringida, fundamentalmente, a los laboratorios de investigación debido a los complejos requerimientos instrumentales, su elevado costo y la condición de contar con un personal especializado (Pontón *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005). Es por ello que, las técnicas de cultivo continúan siendo las de elección en un laboratorio de microbiología clínica.

Dada la necesidad de establecer métodos eficientes para el cultivo, aislamiento primario, identificación y discriminación de las especies en muestras con microbiota polifúngica, prevalece el diseño de medios diferenciales con sustratos que posibiliten la detección de actividades enzimáticas de especies del género *Candida*. Entre las ventajas de estas formulaciones se destacan las elevadas sensibilidad y especificidad diagnósticas; se consideran, además, muy eficaces al ser sencilla y rápida la interpretación de los resultados sobre la base de la morfología y el color de las colonias en el medio (Cooke *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el presente, resulta de gran utilidad el empleo del procedimiento de auxonograma para diferenciar las especies de levaduras. Nuevos diseños basados en formulaciones sólidas, con la finalidad de simplificar la técnica y obtener una mejor precisión en la lectura de la prueba, se difunden con mayor éxito (Araujo, 1997; Larone, 2002).

En Cuba, la fabricación en serie de productos destinados al diagnóstico microbiológico, con elevados estándares de calidad y que reúnen los requisitos del mercado, se realiza en el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), institución certificada con las normas internacionales ISO 9001:2000. Su sistema de gestión de la calidad incluye la fase de investigación de nuevos prototipos; por tanto, el desarrollo de productos, sustentado en las buenas prácticas de laboratorio y manufactura, con un balance adecuado del costo-beneficio, constituye una relevante oportunidad para la mejora continua del diagnóstico clínico nacional.

Con vistas de garantizar volúmenes productivos de manera sustentable, satisfacer las expectativas y cubrir las necesidades del diagnóstico micológico en el país, es preciso evaluar, mediante la adopción y adaptación de las guías y normas internacionales existentes, la fiabilidad, precisión, exactitud y la incertidumbre de las mediciones y proveer métodos microbiológicos alternativos de probada calidad, destinados a la detección y diferenciación de las especies de *Candida* de mayor incidencia en la clínica.

Teniendo en cuenta estas perspectivas, se propone como **hipótesis** de trabajo la siguiente:

La combinación de un extracto nutritivo de origen vegetal con sustratos cromogénicos y fluorogénicos posibilita aislar e identificar simultáneamente el mayor número de especies de *Candida* de relevancia clínica, con elevada exactitud y en menos de 48 h.

Se definió como **objetivo general**: desarrollar métodos cromogénicos y fluorogénicos sostenibles, de elevada exactitud y de menor tiempo de respuesta, con respecto a los métodos existentes, para el cultivo, aislamiento primario, detección, identificación simultánea y enumeración del mayor número de especies de *Candida* de relevancia clínica.

Para su cumplimiento se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Desarrollar a ciclo completo un extracto nutritivo de origen vegetal que posibilite el crecimiento de especies de *Candida* y la detección de reacciones cromogénicas y fluorogénicas.
2. Diseñar, hasta la fase de registro sanitario, un medio y un método cromogénico para el cultivo, aislamiento primario, diferenciación y enumeración de especies de *Candida*, con elevada exactitud diagnóstica y en menos de 48 h.
3. Desarrollar a ciclo completo un medio y método cromogénico-fluorogénico para el cultivo, aislamiento primario, detección, identificación y enumeración de un mayor número de especies de *Candida*.
4. Validar los métodos desarrollados y determinar la incertidumbre de las mediciones.
5. Demostrar la factibilidad de la aplicación en Cuba de los nuevos métodos.

#### **NOVEDAD CIENTÍFICA DEL RESULTADO**

Los productos y métodos fueron desarrollados a ciclo completo según las buenas prácticas de laboratorio, manufactura y la norma ISO 9001:2000; y los mismos constituyen elementos de innovación para la ciencia en este campo. A continuación se exponen los de mayor relevancia:

- se desarrolló, por primera vez a escala internacional, una base nutritiva de *Ipomoea batatas* con características distintivas entre las de origen vegetal, tales como la misma capacidad amortiguadora ante ácidos y álcalis, relación nitrógeno amínico/nitrógeno total del 100%, contenido de Ca, Na, K y P entre 2 y 19 veces mayor; y la de menor contenido de NaCl;
- se logró un nuevo método para la obtención de una base nutritiva deshidratada a partir del tomate, para ser empleada con diferentes propósitos en composiciones selectivas y diferenciales, capaz de promover el crecimiento de bacterias y hongos, preservando sus propiedades nutricionales durante el almacenamiento prolongado;

- se desarrollaron y patentaron dos nuevos medios cromogénicos y fluorogénicos y sus respectivos métodos, que permitieron el cultivo, aislamiento primario, detección, identificación simultánea y enumeración del mayor número de especies del género *Candida*, directamente de las muestras clínicas, con una excepcional recuperación relativa para medios selectivos, en 36 h;
- se describieron las combinaciones de los extractos nutritivos con los agentes inhibidores seleccionados y con la mezcla de sustratos cromogénicos y fluorogénicos no conocidas en la literatura científica mundial y se obtuvieron dos patentes en Cuba;
- se perfeccionó la prueba del auxonograma del carbono, con una singular composición de medio agarizado y una peculiar forma de aplicación de las sustancias carbonadas, con resultados en 24 h;
- se reportó, por primera vez en Cuba y a nivel internacional, el estudio de más de 30 parámetros de validación y de determinación de la incertidumbre de las mediciones de los métodos microbiológicos empleados en el diagnóstico clínico.

#### **IMPORTANCIA TEÓRICA DEL RESULTADO**

Como aporte al conocimiento en el campo del desarrollo de los medios de cultivo microbiológicos se puede considerar:

- haber concebido una base nutritiva que, además de aportar nutrientes al medio, permite detectar, simultáneamente, las reacciones sobre sustratos cromogénicos y fluorogénicos;
- haber combinado creativamente diferentes guías y normas internacionales para la validación y comparación de métodos microbiológicos, la determinación de la incertidumbre de las mediciones y su aplicación en el campo del diagnóstico microbiológico; las cuales sientan las bases metodológicas para la validación de otros diagnosticadores y constituyen temas esenciales de los cursos de postgrado en la temática de medios de cultivo.

#### **IMPORTANCIA PRÁCTICA DEL RESULTADO**

- Los productos (suplemento glicerol, extractos de batata y tomate, base de medio CromoCen CND-C y base de medio CromoCen CND-F) están introducidos en la producción en BioCen. Los medios se registraron en el Centro para el Control Estatal de los Medicamentos (CECMED).
- Los métodos diseñados les permiten a los laboratorios del Sistema Nacional de Salud contar con procedimientos sencillos, exactos, fiables, más rápidos y versátiles para el cultivo,

aislamiento primario, detección, identificación simultánea y enumeración de las especies de *Candida* de mayor circulación en el país.

- El empleo de materias primas autóctonas, la producción nacional de los diagnosticadores y los costos inferiores a los del mercado internacional brindan una solución sostenible al diagnóstico de las candidiasis en Cuba.

- La técnica de auxonograma modificada se emplea en BioCen para la caracterización de cepas de levaduras (colección o aisladas de ambientes productivos) hasta el nivel de especie.

#### **VALOR SOCIAL DEL RESULTADO**

- Los resultados de la investigación tienen un impacto potencial sobre la salud de grupos vulnerables de la población cubana, tales como los pacientes inmunodeprimidos, en especial, con VIH, los diabéticos, las embarazadas, entre otros, al disponer de nuevos métodos de diagnóstico de especies de *Candida*, cuyo pesquijaje, en la actualidad, se encuentra deprimido, entre otros factores, por la complejidad y el alto costo del método tradicional, así como los elevados precios de los medios cromogénicos existentes en el mercado internacional.

- Hasta el presente se han distribuido en el país los dos medios de cultivo en 46 instituciones hospitalarias y centros provinciales de higiene y epidemiología, estimando, de acuerdo al volumen entregado, el procesamiento de 3500 muestras clínicas.

#### **VALOR ECONÓMICO DEL RESULTADO**

- La producción nacional de la nueva base nutritiva, el suplemento glicerol y los medios de cultivo cromogénico y cromogénico-fluorogénico resultó factible en BioCen por su relación costo-beneficio, lo cual posibilita la sustitución de importaciones de productos de propósito similar. Todos ellos constituyen fondos exportables por su elevada calidad y fiabilidad funcional y porque sus precios resultan inferiores en al menos 75% con respecto al de los medios cromogénicos que se comercializan en el extranjero.

- Los métodos resultantes tienen un impacto económico favorable para los laboratorios, al implicar un menor gasto de reactivos y materiales en al menos un 43% con respecto al tradicional empleado y por la no utilización de las autoclaves para esterilizar los medios.

- La aplicación de los nuevos métodos puede coadyuvar la reducción de los gastos de la atención médica por una terapia antifúngica más eficaz.

# Capítulo 1. Revisión Bibliográfica

---



## **CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Generalidades de los hongos**

Se han identificado alrededor de dos millones de especies de hongos, de los cuales más de 400 son patógenos para los humanos, causando infecciones conocidas como micosis (Mesa *et al.*, 2006). Los hongos son organismos eucariotas, aerobios, aunque, en determinadas condiciones anaeróbicas, algunos pueden germinar y desarrollarse. Ellos carecen de clorofila, por lo que su forma de nutrición es lisotrófica, a partir de la secreción de enzimas digestivas degradan la materia orgánica del medio que los rodea en pequeñas moléculas y, luego, la absorben (Larone, 2002; Madigan *et al.*, 2003). Viven en condiciones saprófitas o parasitarias, con un gran poder de adaptación y pueden causar diferentes procesos infecciosos que van desde cuadros clínicos benignos o asintomáticos hasta graves y fatales (Madigan *et al.*, 2003).

Las levaduras se distinguen del resto de los hongos, debido a que son organismos unicelulares. Se conocen más de 300 especies y 39 géneros. Aquellas, a las que aún no se les ha descrito la fase sexual y sólo se conoce la anamorfa, se les denomina como “formas parecidas a levaduras” (*yeastlike*) y su forma de reproducción predominante es la gemación (Mendoza, 2005).

### **1.2 *Candida*: taxonomía, ecología y principales agentes etiológicos**

Existen cerca de 200 especies de *Candida* con características muy diversas. De acuerdo a la clasificación taxonómica actual las especies de *Candida* se ubican en el reino Hongo, división *Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales*, distribuidas en las familias *Saccharomycetaceae*, *Endomycetaceae*, *Metschnikowiaceae*, *Lipomycetaceae* y *Ascoideaceae* (De Hoog *et al.*, 2009).

El hombre es el principal reservorio de este tipo de hongos (*Candida*). Aparece, de forma habitual, en la piel, en los tejidos muertos del cabello, uñas, tracto gastrointestinal (60%), respiratorio y en la mucosa genital de individuos sanos (13%) (Gatica *et al.*, 2002).

*Candida*, en principio, no es patógena, ya que la microbiota bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio. Diversas observaciones clínicas indican que los cambios en el hospedero son,

usualmente, los responsables del desequilibrio ecológico, que pueden originar infecciones de distinta localización y gravedad denominadas candidiasis o candidosis, micosis oportunista aguda, subaguda o crónica y pueden ser superficiales o profundas (Mendoza, 2005). Tales infecciones tienen una alta incidencia en nuestro medio y a nivel mundial, y son frecuentes en individuos de cualquier edad, raza o sexo. El potencial patógeno de las especies varía de forma considerable, siendo, hasta el presente, *C. albicans* el principal agente causal de enfermedades mortales en seres humanos (López *et al.*, 2005).

En los últimos 30 años se elevó el número de casos de candidiasis y se observa un cambio en la distribución de especies. Alrededor del 50% de los episodios son ocasionados por *C. albicans* y el resto, con una frecuencia de aislamiento cada vez más elevada, por otras especies del género entre las que se destacan: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis* (Valencia y Torres, 2004; Rodero *et al.*, 2005; Land *et al.*, 2009).

*C. albicans* presenta dimorfismo, ya que en el estado saprófito suele ser una célula levaduriforme redondeada u ovalada, de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , con paredes finas y en estado parasitario, en tejidos infectados, forma filamentos de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  constituyendo las pseudohifas (Pardi y Cardozo, 2002). Ésta es la especie más patógena del género, capaz de invadir tejidos, evadir la fagocitosis, los mecanismos de defensa del hospedero y resistir el tratamiento antifúngico, lo que denota su amplio arsenal de factores de virulencia controlados por diferentes genes. Entre ellos están el gen de la hexosaminidasa (*HEX1*), varios de proteasas aspárticas secretoras (*SAP1*, *SAP2*, *SAP3* y *SAP4*), un gen que confiere la capacidad de adherencia a las células del hospedero y producir tubos germinales ( *$\alpha$ INT1*) y otros genes responsables de las actividades enzimáticas de las proteinasas, esterasas y fosfolipasas (Salas *et al.*, 2000; Ghannoum, 2000; Naglik *et al.*, 2003; Rouabhia *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2005).

### **1.3 Candidiasis y candidemias. Factores predisponentes**

*Candida* puede encontrarse desde un estado saprofítico simple, pasando por el comensalismo, hasta la situación de patógeno oportunista en casi cualquier localización del organismo. La principal causa de patogenicidad está relacionada con las alteraciones del sistema inmunológico del huésped, así como otros factores predisponentes, que puedan interferir en el equilibrio biológico que mantienen las levaduras en su estado de comensal. En conjunto, las

especies de *Candida* representan casi el 80% de todos los hongos patógenos que ocasionan micosis, cuyas afectaciones clínicas más frecuentes son las cutáneo-mucosas. La candidiasis superficial afecta la piel en todas aquellas regiones que retienen secreciones, espacios interdigitales, pliegues submamarios, infrabdominales, axilares e interglúteos, y aprovechando las condiciones cálidas y húmedas del medio ocurre la infección (Larrondo *et al.*, 2001).

La candidiasis orofaríngea se ha convertido en la infección oportunista más frecuente en pacientes VIH positivos y sida. La casi totalidad de los pacientes están colonizados por *Candida* y entre el 75 y 95% desarrollan, al menos, un episodio de candidiasis bucal en el curso de la evolución de la enfermedad (Martínez *et al.*, 1997; Lazarde y Pacheco, 2001; Pardi y Cardozo, 2002). La prevalencia de *C. albicans* (entre el 50 y 90%) según las poblaciones de estudio, va cediendo terreno a la aparición de otras especies menos sensibles; entre ellas, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*, las cuales se reportan continuamente (Prieto *et al.*, 2006). Entre las infecciones cérvico-vaginales, la candidiasis vaginal afecta la población femenina con una incidencia de hasta el 20% cada año, siendo la gestación un elemento predisponente para su aparición (Montes de Oca *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2005; Audisio *et al.*, 2005; Fowler, 2007). Esta infección suele ser de fácil contagio, por contacto sexual y por transmisión vertical durante el parto (Fosch *et al.*, 2006; Dicker *et al.*, 2007). Algunos profesionales consideran innecesario aislar e identificar a *Candida* spp. de pacientes con candidiasis vulvovaginal, ya que *C. albicans* constituiría la etiología en el 85-90% de los episodios. Sin embargo, Perurena y col. (2003) divulgaron, en exudados vaginales, aislamientos de *C. albicans* (51,1%), *C. glabrata* (22,2%), *C. tropicalis* (11,1%), *C. krusei* (4,4%) y *C. parapsilosis* (2,2%).

La infección del tracto urinario (candidiasis urinaria o candiduria) es la más común entre las infecciones nosocomiales y afecta la vejiga, la uretra y puede llegar al riñón. Los organismos más aislados son *C. albicans* (51,8%) y *C. glabrata* (15,6%) (Laupland *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 2006). Por otro lado, se presentan infecciones más graves, al penetrar el germen en la sangre u otros órganos profundos, manifestándose como: sepsis, neumonía, endocarditis, endoftalmitis, osteomielitis, peritonitis, meningitis, entre otras (Bennett, 1995; Pérez-Blázquez, 2006).

Los reportes indican un incremento de las candidiasis sistémicas entre un 219 y 500% en las UCI y *Candida* ocupa el cuarto lugar entre los microorganismos que causan infección en el torrente

sanguíneo (Alvarado *et al.*, 2002; Rodero *et al.*, 2005; Salavert *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2009). La mayoría de los procesos se considera de transmisión endógena acompañada de la administración de antimicrobianos de amplio espectro o puede ser el resultado de la contaminación con sondas o catéteres, así como derivadas de traumatismos gastrointestinales o, quizás, de una candidiasis ya establecida (Pérez-Blázquez, 2006; Rodero *et al.*, 2005).

El diagnóstico etiológico de estas infecciones, desde el punto de vista clínico, es muy difícil, debido, fundamentalmente, a la ausencia de síntomas característicos. Habitualmente no se sospecha y no se indica tratamiento o se orienta un tratamiento inadecuado. Por ello, los reportes de mortalidad alcanzan las dramáticas cifras de 66% contra un 17%, si se orienta un tratamiento adecuado (Benetucci *et al.*, 2008; Trofa *et al.*, 2008).

El perfil epidemiológico de las especies de *Candida*, que causan infecciones invasivas, varía en diferentes regiones del mundo. Éste puede hallarse afectado por la utilización de diversas técnicas o estrategias terapéuticas tales como: el uso de antimicrobianos, diferencias regionales en la demografía de los pacientes, el clima, las enfermedades subyacentes, el ambiente hospitalario, el tipo de hospital, el manejo del catéter venoso central (CVC) y los esquemas de profilaxis antifúngicas. *C. albicans* fue la especie más frecuentemente identificada en cuatro regiones geográficas: EEUU-Canadá, América Latina, Europa-Rusia y Asia-Australia. Sin embargo, ésta aportó menos de la mitad de los casos totales (45%) en todo el mundo. De ello se deriva la especial importancia la alta frecuencia causada por otras especies diferentes de *C. albicans*. En el grupo EEUU-Canadá, *C. glabrata* fue la segunda especie en frecuencia (18%); mientras que en América Latina, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, supusieron el 55% de los aislamientos. Precisamente, debido a la alta frecuencia de *C. parapsilosis* en América Latina, este patógeno fue el segundo en frecuencia en todo el mundo (Valencia y Torres, 2004; Rodero *et al.*, 2005; Trofa *et al.*, 2008).

La mayoría de las publicaciones científicas hacen referencia a candidemias debidas a una única especie de *Candida*, ya que las fungemias por múltiples especies son poco habituales y constituyen, aproximadamente, del 2 al 10% de los casos. Su frecuencia puede subestimarse si no se emplea una metodología para discriminar la existencia de más de una especie, como el

uso de medios cromogénicos que permiten, de una forma sencilla y económica, recuperar diferentes especies del mismo cultivo (Benetucci *et al.*, 2008; Orenga *et al.*, 2009).

#### **1.4 Aspectos epidemiológicos cambiantes, sus implicaciones clínico-terapéuticas y necesidad del diagnóstico a nivel de especie**

En las últimas décadas, la proporción de infecciones causadas por especies diferentes de *C. albicans* se ha incrementado exponencialmente. Entre las especies más frecuentes sobresalen *C. parapsilosis* (20-40% del total, estrechamente relacionada con los CVC y con la nutrición parenteral), *C. tropicalis* (10-30%), *C. krusei* (10-35%) y *C. glabrata* (5-40%); además, de otras dos especies con carácter emergente *C. lusitaniae* (2-8%) y *C. guilliermondii* (1-5%). *Candida rugosa*, *C. kefyr* y *Candida famata* son muy raras y causan menos del 1% de todas las fungemias (Arendrup *et al.*, 2005; Almirante *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2009). La aparición de baja o nula susceptibilidad a los antifúngicos disponibles, en algunas de estas especies, posee una especial relevancia clínica y terapéutica (Salavert *et al.*, 2006; Trofa *et al.*, 2008; Villanal *et al.*, 2010).

El número y la variedad de las especies de levaduras resistentes a los fármacos se incrementan paralelamente a la utilización de éstos, por lo que el desarrollo de tales mecanismos es la consecuencia inevitable de su uso. No obstante, el fracaso de una terapia antifúngica no sólo se debe a una posible resistencia microbiana, sino también a las condiciones clínicas del paciente en la evolución del proceso (Pemán *et al.*, 2005; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005).

La mayor parte de las especies de hongos, que causan infección en humanos, es sensible a la anfotericina B, por lo que este fármaco sigue teniendo el espectro de actividad más amplio entre todos los antifúngicos disponibles. Entre las excepciones, algunas especies de *Candida*, como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *Candida lipolytica* y *C. tropicalis*, presentan resistencia clínica o valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) elevados frente a la anfotericina B (Lumbreras *et al.*, 2003; Salavert *et al.*, 2006). No obstante, su utilización se ve lastrada ya que se acompaña de considerables efectos adversos. Ante los problemas de toxicidad del fármaco han surgido nuevas formulaciones liposomales (Ambisome®) y lipídicas (Abelcet®), cuyo objetivo es lograr una mayor eficacia y seguridad del tratamiento (Adler-Moore y Proffitt, 2002; Gómez *et al.*, 2004; Panchón *et al.*, 2006).

En líneas generales, se puede decir que *C. albicans* presenta una sensibilidad uniforme a todos los azoles, anfotericina B y caspofungina. Sin embargo, especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* muestran resistencia de diverso grado frente a fluconazol (Viudes *et al.*, 2002; Nelson y Cartwright, 2003; Gómez *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2007).

Varias son las razones que justifican la importancia de identificar estos organismos en cuanto a género y especie. En primer lugar, la orientación para el tratamiento antifúngico, debido a la resistencia innata y adquirida de algunas cepas de interés médico (Land *et al.*, 2009). En segundo lugar, por razones epidemiológicas, ya que permite ampliar el conocimiento de dichas especies desde el punto de vista clínico y micológico. Por último, en los estudios de biología molecular, la identificación de las especies constituye la base de toda investigación en el campo biológico y taxonómico, la cual no debe ser abordada aún de forma única, hasta que puedan ser estandarizadas y validadas las nuevas técnicas (Mendoza, 2005).

### **1.5 Principales fuentes nutricionales para el cultivo de levaduras**

De forma general, para el cultivo de levaduras y hongos filamentosos se han utilizado varios medios de cultivo que incluyen, en su composición, hidrolizados y extractos nutritivos, fundamentalmente de origen vegetal, obtenidos mediante la acción de diferentes agentes de naturaleza química o enzimática (Dave *et al.*, 1991; Zhurbenko, 2005; Zhurbenko *et al.*, 2006).

Entre las bases nutritivas más conocidas se encuentran los extractos de malta, arroz, harina de maíz, papa (Rezusta *et al.*, 2001; Merck, 2006), tabaco (Khan *et al.*, 2004), col, zanahoria (Buzoleva y Somov, 2001), extractos de semillas de niger (Lees y Barton, 2003), de semillas de girasol (Al-Mosaid *et al.*, 2003) y los hidrolizados de harina de soya (Zhurbenko *et al.*, 2006).

Las tecnologías para la fabricación de las bases nutritivas son complejas, debido a un conjunto de factores, tales como la diversidad de operaciones unitarias a emplear (métodos de hidrólisis, purificación, concentración, deshidratación), la variabilidad de los sustratos y de las enzimas, los requerimientos de calidad y regulatorios, así como la complejidad y diversidad de los medios de cultivo en que serán empleadas (Bridson, 1994; Zhurbenko y Rodríguez, 2009).

Al diseñar medios para el cultivo, aislamiento primario y diferenciación simultánea del agente causal, de acuerdo a las características cromósferas desarrolladas por las colonias, es fundamental tener en cuenta la composición de las bases nutritivas y su interacción con los

demás componentes. Cooke y col. (2002) encontraron que composiciones con extractos de arroz, maíz, papa y malta no beneficiaron la diferenciación de las especies de *Candida*, ya que la difusión del color de las colonias dentro del agar resultó la principal deficiencia.

Las bases nutritivas son ingredientes fundamentales que aportan sustancias de variada naturaleza, como proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento. Éstas se caracterizan por poseer elevadas concentraciones de glúcidos, lo que resulta muy conveniente durante el crecimiento y desarrollo del cultivo de las levaduras (Bridson, 1994).

Las raíces y los tubérculos tropicales son fuentes significativas de compuestos ricos en energía. El boniato (*Ipomoea batatas*) constituye uno de los cultivos más importantes y versátiles del mundo, con aportes representativos de provitamina A y ácido ascórbico (Walter *et al.*, 1984; Navas, 1999). A pesar de que la traducción literal de su nombre en inglés (*sweet-potatoes*) es papa dulce, el boniato pertenece a la familia de convolvuláceas (*Convolvulaceae*) y a diferencia de la papa, que es un tubérculo, el boniato es una raíz reservante (Walter *et al.*, 1984). Los glúcidos presentes en la raíz se encuentran en cantidades de 80 a 90% con respecto a su peso seco (Walter *et al.*, 1984; Maeshima *et al.*, 1985; Hagenimana *et al.*, 1996; Navas, 1999). En la bibliografía existente se describe el empleo de enzimas, específicamente las alfa amilasas, para obtener derivados del almidón, destinados a otras aplicaciones en la industria alimenticia (Nanmori y Shinke, 1993; Hagenimana *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1998; Millan *et al.*, 2002).

En los extractos de *I. batatas* se han evaluado variadas propiedades bioactivas y funcionales, como su actividad antioxidante, conveniente para el cultivo de tejidos y células superiores (Hou *et al.*, 2001 y 2002; Cook, 2006), el contenido de antocianinas y fenoles, sus cualidades antiproliferantes contra células de cáncer (Huang *et al.*, 2004) y su efecto antimicrobiano (Decker y Jaenicke, 2004; In-Chang *et al.*, 2004). Sin embargo, ninguna de las soluciones descritas en la literatura científica aborda la obtención de extractos de *I. batatas* para su uso como bases nutritivas destinadas al cultivo de microorganismos, ni tampoco describe la purificación de los productos derivados de esa raíz.

El tomate constituye otra fuente importante de glúcidos, azúcares simples, ácidos orgánicos, minerales (como el potasio y el magnesio), así como un elevado contenido de vitaminas, entre

las que se destacan la tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y el ácido ascórbico (Gebhardt y Thomas, 2002; Peralta y Spooner, 2007).

En el tomate maduro el licopeno (aproximadamente un 83%) resulta el carotenoide mayoritario. Este compuesto, junto con el  $\beta$ -caroteno (entre un 3-7%), poseen actividad provitamínica A y propiedades antioxidantes (Peralta y Spooner, 2007).

En la actualidad, no sólo se conoce la utilidad de los extractos de tomate para la alimentación y como un poderoso neutralizador de radicales libres, responsables de las enfermedades cardiovasculares, del cáncer y del envejecimiento, para proteger las células y tejidos humanos del daño oxidativo (Fraser *et al.*, 2002), sino también como base nutricional en determinadas composiciones microbiológicas para el cultivo de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y hongos (Barney *et al.*, 1990; Ronald, 2005; Iijima *et al.*, 2007).

En la mayoría de las composiciones que contienen el jugo de tomate, éste se incorpora en forma líquida o de pasta. Estos medios se comercializan listos para el uso, con el inconveniente de que los mismos no poseen una vida útil prolongada. En menor medida, también se ha divulgado la incorporación del extracto de tomate liofilizado (Lomelin y Vaquero, 1991), lo que hace el proceso más complejo técnicamente y con un elevado costo, al emplear equipos especiales.

Hasta el momento, no se han desarrollado métodos eficientes y económicos para la obtención de bases nutritivas deshidratadas, a partir del tomate, ricas en glúcidos, vitaminas y micronutrientes para la fabricación de medios de cultivo de prolongada estabilidad, destinados al cultivo de levaduras.

### **1.6 Identificación de especies de *Candida* empleando técnicas de cultivo convencionales**

La identificación taxonómica hasta el nivel de especie se puede llevar a cabo atendiendo a diferentes criterios que incluyen características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales (Linares y Solís, 2001; Larone, 2002).

El estudio de las características morfológicas está fundamentado en la evaluación macro- o microscópica de las colonias aisladas. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo de rutina en el laboratorio de microbiología. No obstante, el medio de cultivo por excelencia para el aislamiento de levaduras es el agar



dextrosa de Sabouraud (ADS) con o sin antibióticos, tales como cloranfenicol o gentamicina, suplementados en cantidad de 0,5 g/L con el objetivo de suprimir las bacterias acompañantes de las diferentes muestras clínicas (Linares y Solís, 2001). El estudio macromorfológico reúne un determinado grupo de características coloniales como son el color, la textura, la topografía de la superficie y bordes de la colonia. Por lo general, luego de una incubación entre 30 y 35°C durante 24 a 48 h, las colonias del género *Candida* no desarrollan micelio aéreo, características típicas de los géneros *Geotrichum*, *Trichosporon* o *Blastoschizomyces*, aunque pueden aparecer prolongaciones en la periferia de las colonias (Linares y Solís, 2001; Larone, 2002).

La evaluación microscópica de los organismos se puede realizar mediante el examen en fresco o tinciones, resultando todas las especies positivas a la tinción de Gram. La micro-apariencia de todas las especies de *Candida* es similar. En algunas ocasiones, la forma de las levaduras o blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. En esta evaluación se refiere que se está en presencia de estructuras compatibles con determinado género, por lo que es necesario aislar e identificar el microorganismo (Wansley *et al.*, 2003; Mendoza, 2005).

Las técnicas de microcultivo son de gran utilidad para la identificación de algunas especies de *Candida*, al observar sus características microscópicas, tales como el tubo germinal, la formación de hifas, blastoconidias y clamidosporas (Linares y Solís, 2001). La prueba del tubo germinativo o filamentación precoz, creada por Mackenzie (1962), es considerada como una técnica muy rentable y ampliamente divulgada, que orienta la identificación de *C. albicans*; pero *C. dubliniensis*, descubierta más recientemente, también produce dicha estructura (Linares y Solís, 2001; Quesada *et al.*, 2007). Otras especies, como *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales, por ello se requiere de una experiencia técnica para la realización de la lectura (Rippon, 1990; Wansley *et al.*, 2003). A pesar de ser ésta una prueba rápida y sencilla, se sugiere su uso de forma presuntiva, ya que se demostró que su sensibilidad es de 89,5% y su especificidad de 81,8%, al ser comparada con técnicas moleculares (Wong *et al.*, 2006).

La producción de clamidosporas es otra de las pruebas para diferenciar *C. albicans* de otras especies, pero esta propiedad también es compartida con *C. dubliniensis* (Quesada *et al.*, 2007). Puede observarse, además, la formación de grupos compactos de blastoconidias, a intervalos

regulares y el desarrollo de pseudohifas. Para inducir clamidosporas se utiliza la técnica de Dalmau y medios de cultivo, tales como agar harina de maíz, agar crema de arroz, suplementados con Tween 80 al 1%, agar TOC (Tween, bilis de buey, ácido caféico), entre otros. Aproximadamente el 90% de los aislamientos de *C. albicans* produce clamidosporas por este método (McGinnis, 1980; Linares y Solís, 2001; Larone, 2002).

Debido a que la identificación de especies sobre la base de las características macro- y micromorfológicas es presuntiva, es necesario complementar los esquemas con estudios fisiológicos, bioquímicos y enzimáticos. De las pruebas fisiológicas y bioquímicas se derivan los ensayos de asimilación (auxonograma-degradación aeróbica) y fermentación (zimograma - degradación anaeróbica) de glúcidos para la identificación de levaduras (Larone, 2002). Patrones de asimilación y fermentación de muchos géneros y especies se encuentran disponibles en la literatura. Sin embargo, se seleccionan con mayor fiabilidad las pruebas de auxonogramas debido a la existencia de ciertas sustancias carbonadas que forman parte de la estructura celular de estos microorganismos que podrían revelar resultados falsos positivos en la prueba de fermentación (De Hoog *et al.*, 1996, 2009). Con ella se evalúa la capacidad del microorganismo de utilizar diversos glúcidos como única fuente nutritiva para su crecimiento.

Entre los procedimientos descritos, la técnica de Wickerham es considerada como el método estándar, el cual utiliza un medio líquido sin agitación. Sin embargo, las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja; resultan mucho más laboriosas, costosas y de difícil interpretación. Otros procedimientos manuales, diseñados sobre la base de emplear formulaciones sólidas, se difunden con mayor éxito, como las técnicas de Beijerinck y la de Araujo, las cuales han sufrido múltiples modificaciones en el tiempo, con la finalidad de simplificar el procedimiento, mantener su efectividad y obtener una mejor precisión en la interpretación de los resultados (Araujo, 1997; Pérez *et al.*, 2002; Larone, 2002).

Otras pruebas complementarias para identificar el germen aislado son la sensibilidad frente a la cicloheximida o actidiona y su crecimiento luego de la incubación a temperaturas entre 42 y 45°C (Linares y Solís, 2001; Larone, 2002). Esta metodología, que involucra varios ensayos bioquímicos y fenotípicos de las colonias aisladas, puede requerir como mínimo 96 h para la identificación de la especie. La rapidez en el diagnóstico micológico es un aspecto fundamental

en la medicina actual, ya que posibilita la prescripción de un tratamiento antifúngico específico y oportuno con un uso racional que limitará el desarrollo de resistencias.

#### **1.6.1 Diagnóstico diferencial de *Candida dubliniensis***

*C. dubliniensis* constituye un patógeno emergente con manifestaciones principalmente en la cavidad bucal (Sullivan *et al.*, 1995; Pardi y Cardozo, 2002). Aunque la mayoría de las cepas aisladas son susceptibles a los antifúngicos más utilizados, algunas desarrollan rápidamente una resistencia estable al fluconazol (Al-Mosaid *et al.*, 2001; Nelson y Cartwright, 2003; Ahmad *et al.*, 2004; Pinjon *et al.*, 2005). Su diferenciación de *C. albicans* se hace difícil, ya que posee características fenotípicas y bioquímicas muy similares. De este modo, la evaluación de la producción de clamidosporas en los medios de cultivo, en cuanto a la cantidad y distribución de las mismas, es un criterio muy subjetivo que no proporciona una diferenciación definitiva entre ambas especies (Al-Mosaid *et al.*, 2001; Quesada *et al.*, 2007).

Se han desarrollado otras composiciones considerando, como criterios de consenso, las características morfológicas de las colonias y la producción de clamidosporas. Entre las más divulgadas aparecen el agar Staib's creatinina y semilla de niger (*Guizotia abyssinica*) (Staib y Morschhauser, 1999; Al-Mosaid *et al.*, 2001; Lees y Barton, 2003), agar ácido caféico-citrato férrico (Al-Mosaid *et al.*, 2001), agar caseína (Mosca *et al.*, 2003; Quesada *et al.*, 2007), agar Pal's semillas de girasol (*Helianthus annuus*) (Adou-Bryn *et al.*, 2003; Al-Mosaid *et al.*, 2003; Raut y Varaiya, 2009) y agar tabaco (Khan *et al.*, 2004). La identificación de *C. dubliniensis* se logra por el desarrollo de una pigmentación parda-amarilla de las colonias, mientras que *C. albicans* y otras especies del género muestran una coloración de blanca a crema. Además, al microscopio se observa que *C. dubliniensis* es capaz de producir clamidosporas abundantes y las demás especies de *Candida*, incluso *C. albicans*, no desarrollan estas estructuras. Los trabajos publicados refieren prestar una especial atención al empleo de cepas aisladas para el estudio y a la temperatura de incubación (28-30°C), al utilizar estos métodos, para alcanzar una eficacia del 97,7 al 100% en la identificación de *C. dubliniensis* (Al-Mosaid *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2004).

A su vez, se proponen otros esquemas que complementan estas pruebas fenotípicas con otros ensayos, como son el crecimiento a 45°C y la asimilación de  $\alpha$ -metil-D-glucósido, xilosa, trehalosa, los cuales son negativos para *C. dubliniensis* (Gales *et al.*, 1999; Tekeli *et al.*, 2006).

## **1.7 Sistemas comerciales basados en la asimilación de nutrientes, pruebas enzimáticas e inmunológicas para la identificación de levaduras**

En la actualidad existen en el mercado varios sistemas miniaturizados, estandarizados y algunos hasta automatizados, con la finalidad de simplificar y acelerar la identificación de las levaduras de una forma más precisa. Los métodos más difundidos son diseñados sobre la base de la asimilación de diferentes sustancias carbonadas y algunos sistemas combinan las pruebas nutricionales con otras de actividad enzimática y fisiológica (Tabla 1.1).

Avances importantes se han alcanzado en la automatización de algunos sistemas como es el caso del Vitek® y el Vitek 2® (bioMérieux, Francia), que logran la identificación de entre 36 y 51 especies del género *Candida*, incluso *C. dubliniensis* en 18 h. Varios autores declaran rendimientos entre el 68 y 90% en la identificación correcta de especies de levaduras al comparar este sistema con otros similares y con las técnicas tradicionales de identificación micológica (Graf *et al.*, 2000; Sood *et al.*, 2000; Guelfand *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006).

Otros sistemas automatizados, como EM-Ident C SENSIDENT (Merck, Alemania), Biolog YT Microplate (Biolog, EEUU), MicroScan Yeast Identification Panel (Dade Behring, EEUU) y BCCM™/Allev 2.00 (BCCM, Bélgica), brindan la posibilidad de identificar hasta 693 especies de 53 géneros de levaduras con rendimientos de 97,9% (St-Germain y Beauchesne, 1991; Robert *et al.*, 1997; Linares y Solís, 2001). Sin embargo, los elevados precios que poseen los mismos (Sader y Miranda, 1999) limitan su uso en la rutina del laboratorio clínico.

### **1.7.1 Identificación rápida de *Candida albicans***

Varios sistemas se comercializan en el mercado para la identificación rápida de *C. albicans*. Su principio se basa en la detección de una o dos enzimas, al utilizar sustratos cromogénicos y fluorogénicos, específicamente la  $\beta$ -galactosaminidasa y la L-prolina amidasa, ambas positivas para esta especie (Tabla 1.2). En todos los casos es posible identificar a *C. albicans* en un período de 5 a 90 min a 37°C (Freydiere y Guinet, 1997; Niimi *et al.*, 2001).

### **1.7.2 Identificación rápida de *Candida glabrata***

Para facilitar la instauración precoz de una terapia antifúngica adecuada se necesitan técnicas que permitan la identificación rápida de especies con sensibilidad disminuida a los azoles como es el caso de *C. glabrata*. La mayoría de las pruebas está diseñada sobre la base de la hidrólisis

**Tabla 1.1.** Sistemas comerciales basados en criterios bioquímicos para la identificación de levaduras

Período de incubación		48-72 h						4-6 h		
Sistema		API 20AUX C <sup>a</sup>	ATB ID 32C <sup>a</sup>	API Candida <sup>a</sup>	Auxacolor <sup>b</sup>	Fungichrom I <sup>c</sup>	Fungifast I Twin <sup>c</sup>	Uni-Yeast-Tek <sup>d</sup>	RapID Yeast Plus System <sup>d</sup>	Fungiscreen 4H <sup>b</sup>
Cantidad de glúcidos		17	29	5	13	8	7	7	5	5
Actividad enzimática	α-amilasa	-	-	x	-	-	-	-	-	x
	α-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	α-glucosidasa	x	x	-	-	-	-	-	x	-
	β-fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	β-galactosidasa	-	-	x	-	x	-	-	x	x
	β-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	β-glucuronidasa	-	-	x	-	-	-	-	-	x
	β-maltosidasa	-	-	x	-	-	-	-	-	x
	β-xilosidasa	-	-	x	-	-	-	-	-	x
	N-acetil-β-galactosaminidasa	-	-	-	-	x	x	-	x	-
	N-acetil-β-glucosaminidasa	x	x	x	-	-	-	-	-	x
	L-prolina-amidasa	-	-	-	-	x	x	-	x	-
	histidina-amidasa	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	leucil-glicina-amidasa	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	glicil-amidasa	-	-	-	-	x	-	-	-	-
	fosfolipasa	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	peptidasa	-	-	-	-	x	-	-	-	-
	ureasa	-	-	x	-	x	-	x	x	x
	fenol oxidasa	-	-	-	x	x	x	-	-	-
Sensibilidad a actidiona		-	x	-	x	x	-	-	-	-
Reducción del TTC		-	-	-	-	-	-	-	-	x
Reducción de nitrato		-	-	-	-	-	-	x	-	-
Producción de clamidosporas		x	-	-	-	-	-	x	-	-
Cantidad de especies a identificar		34	63	15	26	-	10	-	43	4
Exactitud (%)		87	98	83-91,8	91,2	81-95,6	91-97	-	84	-
Referencia		1	2, 3	2, 4, 5	2, 4, 5	1, 5, 6	2, 5, 7	3, 8	2,9	10

(<sup>a</sup>)-bioMérieux, Francia; (<sup>b</sup>)-Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia; (<sup>c</sup>)-International Microbio, Francia; (<sup>d</sup>)-Remel/Innovative Diagnostic Systems, EEUU; TTC: 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio

**Referencia:** 1-Gundes *et al.*, 2001; 2-Buchaille *et al.*, 1998; 3-Linares y Solís, 2001; 4-Campbell *et al.*, 1999; 5-Paugam *et al.*, 1999; 6-Umabala *et al.*, 2002; 7-Michel-Nguyen *et al.*, 1997; 8-Puerto *et al.*, 2001; 9-Freydiere y Guinet, 1997; 10-Quindós *et al.*, 1993

**Tabla 1.2.** Pruebas comerciales para la identificación rápida de *C. albicans*

Sistema	Actividad enzimática		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
	$\beta$ -galactosaminidasa*	L-prolina amidasa			
MUAG test <sup>a</sup>	x	-	97,6	100,0	1, 2
RapID Albicans <sup>a</sup>	x	x	95,0-97,0	100,0	3-8
BactiCard Candida <sup>b</sup>	x	x			
Albicans-Sure <sup>c</sup>	x	x			
Albistrip <sup>d</sup>	x	x			
RAPIDEC albicans <sup>e</sup>	x	x			
Candida albicans Screen <sup>b</sup>	x	x	-	100,0	6, 9
Candida albicans CA50 <sup>f</sup>	x	x			

(<sup>a</sup>)-Biolife, Italia; (<sup>b</sup>)-Remel; (<sup>c</sup>)-Clinical Standards Laboratories, EEUU; (<sup>d</sup>)-Lab M Ltd, Reino Unido; (<sup>e</sup>)-bioMérieux; (<sup>f</sup>)-Murex Diagnostic, EEUU; (\*)-los primeros sistemas utilizan el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidina y los dos últimos el sustrato cromógeno p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidina  
**Referencia:** 1-Dalton *et al.*, 1989; 2-Willinger *et al.*, 1994; 3-Perry *et al.*, 1990; 4-Dealler, 1991; 5-Crist *et al.*, 1996; 6-Freydiere y Guinet, 1997; 8-Carrillo-Muñoz *et al.*, 2003; 9-Lipperheide *et al.*, 1992

rápida de la trehalosa y, a pesar de que otras especies del género *Candida* son capaces de utilizar este compuesto, ninguna de ellas hidroliza tan rápido la trehalosa como *C. glabrata*.

La prueba GLABRATA RTT (Fumouze Diagnostic, Francia) resulta la más rápida (20 min) para la identificación de *C. glabrata*. Los estudios muestran valores de sensibilidad de 98,4%, especificidad de 97,3%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 94,2% (Freydiere *et al.*, 2003, 2004; Pemán *et al.*, 2004; Willinger *et al.*, 2005).

Otro método empleado para reconocer la especie es el ensayo con tiras reactivas Diabur-test 5000 (Boeringer, Alemania) (Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 1999; Willinger *et al.*, 2005). Una comparación entre los métodos GLABRATA RTT y Diabur-test demostró que la sensibilidad de las pruebas depende de la procedencia de las colonias aisladas, detectándose mayores resultados falsos positivos a partir de placas de agar sangre que, al utilizar otros medios de cultivo, tales como ADS, Candida ID y CHROMagar Candida. Con el método GLABRATA RTT se obtuvieron valores de sensibilidad entre el 91,1 y 96,7%, y de especificidad de 83,9 a 99,6%. Sin embargo, en el Diabur-test se encontraron valores de sensibilidad de 67,8 a 97,8% y una especificidad de 57,4 a 89,3%, siendo *C. tropicalis* y *C. albicans* las especies implicadas en los resultados falsos positivos (Willinger *et al.*, 2005).

López y col. (2001) publicaron otro método fundamentado en la asimilación de la trehalosa y la sacarosa, empleando Rosco *diagnostic tablets* (EUROBIO, Francia), registrando que el período de incubación para la interpretación de los resultados fue de 4 a 24 h en dependencia de la concentración del inóculo.

Entre otros métodos, se menciona Mayo Clin *trehalose assimilation*, descrito por Stockman y Roberts (1985), con valores de sensibilidad de 96,6% y especificidad de 74,1% luego de su incubación por 1 h a 35°C. En las composiciones de caldo para la fermentación de trehalosa (Hardy Diagnostic, EEUU) y caldo para la asimilación de trehalosa (Remel) se reportan valores de sensibilidad de 96,0 y 91,5% para cada uno, así como una especificidad de 100 y 96,3%, respectivamente, entre las 3 y 24 h de incubación. En los ensayos de fermentación se recomienda sellar la superficie con aceite mineral estéril e incubar a 42°C, durante 24 h. Las especies involucradas en la mayoría de las reacciones falsas positivas han sido *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. famata* y *C. lusitaniae* (Fenn *et al.*, 1999; López *et al.*, 2001).

### 1.7.3 Métodos inmunológicos

Nuevas pruebas serológicas, con el uso de anticuerpos monoclonales, por ensayos de inmunodifusión doble, inmunofluorescencia, aglutinación, ELISA e inmunoperoxidasa están disponibles en el mercado con la intención de ser utilizadas en el diagnóstico rápido de las micosis invasoras más importantes (Tabla 1.3).

En Japón se divulgan técnicas de cromatografía de gas-líquido para la detección de metabolitos como D-arabinitol, D-manosa y enolasa, producidos por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr*, pero su sensibilidad es muy baja (40%) (Wong y Brauer, 1988; Pontón *et al.*, 2001, 2002; White *et al.*, 2005).

La detección del antígeno de pared (1-3)  $\beta$ -D-glucano es otra posibilidad diagnóstica de las micosis profundas, pero este antígeno no es específico de *Candida* pues se encuentra también en *Aspergillus* y *Pneumocystis*; entre los principales sistemas comerciales se conocen Fungitec G test (Seikagaku Kogyo Corporation, Japón), Waco-WB003 test (Wako Pure Chemical Industries, Japón) y Fungitell o GlucateLL (Associates of Cape Cod Ind, EEUU) (Hossain *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2001). Estas pruebas pueden presentar falsos positivos en pacientes sometidos a hemodiálisis, en tratamientos con albúmina, inmunoglobulinas, algunos agentes antitumorales y sulfamidas (Odabasi *et al.*, 2004; Pickering *et al.*, 2005). A pesar del gran número de antígenos estudiados y la disponibilidad de pruebas estandarizadas, los resultados obtenidos hasta el momento en pacientes con candidiasis invasora es cuestionable y no existe una prueba aceptada de forma general (Pontón *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005).

### 1.7.4 Técnicas de biología molecular

Los procedimientos moleculares mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias conservadas en todos los hongos (PCR panfúngica) o de secuencias específicas de una especie definida (PCR específica) son, sin lugar a dudas, el mayor progreso tecnológico en el campo de la detección directa de hongos a partir de muestras clínicas (Chen *et al.*, 2000; Hendolin *et al.*, 2000; Luo y Mitchell, 2002). Las técnicas PCR cuantitativa en tiempo real, el método diagnóstico más extendido mediante el sistema LightCycler (Roche Diagnostics, Francia), *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) y *PCR fingerprinting* constituyen



**Tabla 1.3.** Técnicas serológicas para el diagnóstico rápido de *Candida* spp.

Prueba comercial	Técnica	Detección	Reacción cruzada	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
Platelia Candida Ag <sup>a</sup>	ELISA	antígeno manano en <i>Candida</i> spp.	géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Cryptococcus</i>	40,0	53,0	1-3
Platelia Candida Ab/Ac/Ak <sup>a</sup>		anticuerpos frente al antígeno manano		50,0	94,0	1, 2
Anticuerpo antimicelio de <i>C. albicans</i> <sup>b</sup>	inmuno-fluorescencia indirecta	anticuerpos frente al antígeno del micelio de <i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i>	94,0	84,0	1, 4
Cand-Tec <sup>c</sup>	látex	antígenos manano y mananoproteínas de <i>Candida</i>	-	25,0-100,0	-	5
Pastorex Candida <sup>d</sup>				53,0	94,0	5
Newvagin C-Kure <sup>e</sup>		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i>	80,0	90,0	6, 7
Bichrolatex albicans <sup>f</sup>		<i>C. albicans</i>				
Bichrolatex krusei <sup>f</sup>		<i>C. krusei</i>	-	-	-	8, 9
Bichro-dubli <sup>f</sup>		<i>C. dubliniensis</i>				

(<sup>a</sup>)-Biorad; (<sup>b</sup>)- Labs Vircell, España; (<sup>c</sup>)- Ramco Laboratories, INC, EEUU; (<sup>d</sup>)-Sanofi Diagnostic Pasteur; (<sup>e</sup>)-CENSA, Cuba; (<sup>f</sup>)-Fumouze Diagnostic

**Referencia:** 1-Sendid *et al.*, 1999, 2003; 2-Pontón *et al.*, 2002; 3-Rimek *et al.*, 2003; 4-Castro y Martín, 2004; 5-White *et al.*, 2005; 6-Fernández y Lantero, 2004; 7-Betancourt *et al.*, 2009; 8-Linares y Solís, 2001; 9-Quindós *et al.*, 1997

herramientas de alto valor potencial para el diagnóstico, la identificación y clasificación taxonómica de las levaduras (Selvarangan *et al.*, 2003; Boldo *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2004).

En estudios realizados por López y col. (2005), al comparar los métodos CHROMagar Candida, API 20C, pruebas fisiológicas convencionales y el PCR *fingerprinting*, para discriminar especies de *Candida*, se observó que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos por cualquiera de los métodos utilizados. Una comparación de métodos rápidos, utilizando la prueba del tubo germinal y la técnica PCR, publicada por Wong y col. (2006) para identificar *C. albicans* directamente del hisopado vaginal, mostró valores de sensibilidad de 89,5 y 94,7% para cada una, y la especificidad resultó 81,8 y 72,7%, respectivamente.

Una prueba comercializada, con la utilización de sondas de ADN para el diagnóstico de candidiasis vaginal, denominada Affirm VPIII® (Becton-Dickinson) permite un diagnóstico muy específico, pero relativamente poco sensible. La técnica detecta, además de *Candida*, la presencia de *Garnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* y presenta una concordancia con el CHROMagar Candida de 95% (Alonso-Vargas *et al.*, 2000; Flores-Paz *et al.*, 2008).

Las técnicas moleculares tienen la ventaja de ser sensibles, específicas y eficientes, para lograr diferenciar especies muy relacionadas entre sí desde el punto de vista taxonómico. Sin embargo, hay que tener en cuenta los inconvenientes que éstas aún reúnen, como son el elevado costo, la condición de contar con un personal especializado, los complejos requerimientos instrumentales y, por sobre todo, la ausencia actual de estudios que demuestren qué tipo de muestra y qué procedimiento es el más indicado.

### **1.8 Métodos para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de las levaduras**

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los agentes antifúngicos constituyen, en la actualidad, una de las principales líneas de investigación en muchos laboratorios de referencia. Esto se debe al incremento de las infecciones fúngicas, la disponibilidad de nuevos fármacos, la emergencia de nuevas especies patógenas y los frecuentes reportes de resistencia, asociados a fallos terapéuticos en las infecciones por *Candida* (Arikan y Rex, 2000, 2001; Denning, 2002; Gavalda y Ruiz, 2003; Rodero *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007).

Entre los métodos comerciales más generalizados se resaltan las técnicas de difusión en agar, con discos de varios antifúngicos y los métodos cuantitativos, que emplean gradientes de

concentraciones del antifúngico (Tabla 1.4). En general la utilidad de estos métodos resulta limitada por los problemas de difusión de la mayoría de los agentes antifúngicos y por la falta de correlación de los halos de inhibición con la evidencia clínica (Espinel-Ingroff *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2001-a; 2003; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005).

Otros enfoques novedosos van hasta el empleo de la citometría de flujo (Ramani y Chaturvedi, 2000; Alvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Chaturvedi *et al.*, 2004; Page y Kurtzman, 2005; Mitchell *et al.*, 2005), la medición directa del efecto del agente azólico mediante la cuantificación de la síntesis del ergosterol (Arthington-Skaggs *et al.*, 2000) y métodos que incorporan el fluconazol a una concentración específica en el medio cromogénico CHROMagar *Candida*, el cual resulta muy atractivo por su simplicidad (Patterson *et al.*, 1996; Linares *et al.*, 2003; Tan y Peterson, 2005).

### **1.9 Diagnóstico a partir del cultivo primario utilizando métodos cromogénicos**

El agar dextrosa de Sabouraud, con o sin antibióticos, es el medio de cultivo más utilizado para el aislamiento primario de hongos filamentosos y levaduras a partir de muestras clínicas (Merck, 2006). Sin embargo, éste no permite la detección de infecciones mixtas, ni una identificación presuntiva de los aislamientos, pues la morfología de las colonias de las diferentes especies de *Candida*, generalmente, es igual en este medio, el cual no fue diseñado con esta finalidad. Esta limitación, junto con la necesidad de establecer diferencias de fácil observación, incentivó el diseño de medios de cultivo diferenciales con sustratos que posibiliten identificar y detectar las principales especies del género sobre la base del color de las colonias.

Los medios cromogénicos para levaduras tuvieron sus precursores en los medios de Nickerson o agar BIIGGY, con sulfito de bismuto (Nickerson, 1953), el ADS suplementado con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (Pagano *et al.*, 1958) y el agar fosfomolibdato (Costa y de Lourdes Branco, 1964). A pesar de que varios estudios confirman el valor de estos medios para la identificación de especies de levaduras, ellos no logran la aceptación para su uso en la rutina del laboratorio. El medio ADS con TTC, en la práctica, no resulta útil y no se recomienda para el aislamiento inicial, ya que muestra una elevada proporción de resultados falsos positivos y falsos negativos e inhibe el crecimiento de *C. glabrata* (Odds y Bernaerts, 1994; Martínez *et al.*, 1997; Perurena

**Tabla 1.4.** Pruebas para el estudio de la susceptibilidad antifúngica de las levaduras

Soporte	Fundamento	Correlación con el método de referencia CLSI M27-A2* (%)	Referencia
Neo-Sensitabs <sup>a</sup>	discos de antifúngicos	40,0	1-4
E-test <sup>b</sup>	gradiente de concentración del	100,0	5-11
Diff Test <sup>c</sup>	antifúngico	80,9	12
Mycototal <sup>d</sup>	evaluación de los azoles	90,3	13, 14
Mycostandard <sup>e</sup>		90,2	14
ATB Fungus 2 <sup>f</sup>		75,3	12, 15
Sensititre <sup>g</sup> Yeast One		-	16-20
Colorimetric Antifungal Panel <sup>g</sup>		-	3, 12, 16, 21-23
Fungitest <sup>h</sup>	dos concentraciones de seis agentes antifúngicos	-	24
ASTY Colorimetric Panel <sup>i</sup>		-	
Integral System Yeasts <sup>j</sup>		-	
CandiFAST <sup>k</sup>	combina el antifungigrama con reacciones bioquímicas	51,6	14, 25

(<sup>a</sup>)-Rosco Diagnostica, Dinamarca; (<sup>b</sup>)-AB Biodisk, Suecia; (<sup>c</sup>) Diagnostic Pasteur, Francia; (<sup>d</sup>)-Behring Diagnostic, Francia; (<sup>e</sup>)-Institut Pasteur, Francia; (<sup>f</sup>)-bioMérieux; (<sup>g</sup>)- TREK Diagnostic Systems Ltd., Reino Unido; (<sup>h</sup>)-Biorad; (<sup>i</sup>)-Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Japón; (<sup>j</sup>)-Liofilchem Diagnostics, Italia; (<sup>k</sup>)-International Microbio; \*CLSI M27-A2, 2002

**Referencia:** 1-Canton *et al.*, 1999; 2-Soni *et al.*, 1999; 3-Swinne *et al.*, 1999; 4-Pfaller *et al.*, 2001-a; 5-Wanger *et al.*, 1995; 6-Espinel-Ingroff *et al.*, 1996; 7-Favel *et al.*, 1997; 8-Clancy y Nguyen, 1999; 9-Posterano *et al.*, 2000; 10-Pfaller *et al.*, 2000, 2001-b, 2003; 11-Barry *et al.*, 2002; 12-Schmalreck *et al.*, 1995; 13-Guinet *et al.*, 1988; 14-Druetta *et al.*, 1993; 15-Quindós *et al.*, 1994; 16-Davey *et al.*, 1998-b; 17-Pfaller *et al.*, 1998-b; 18-Espinel-Ingroff *et al.*, 1999; 19-Qian *et al.*, 1999; 20-Posterano *et al.*, 2000; 21-Davey *et al.*, 1998-a; 22-Witthuhn *et al.*, 1999; 23-Willinger *et al.*, 2000; 24-Pfaller *et al.*, 1998-a; 25-Gundes *et al.*, 2001

*et al.*, 2003). Además, las formulaciones de Pagano-Levin y el agar fosfomolibdato no se encuentran disponibles en las diferentes casas comerciales.

El concepto de lograr un medio de aislamiento de rutina, que permita diferenciar al menos *C. albicans* del resto de las especies, continúa siendo una idea atractiva. Así, en los últimos años se han desarrollado varios métodos para la identificación de levaduras, diseñados sobre la base de la detección de actividades enzimáticas.

Existen formulaciones a las cuales se les ha adicionado sustratos cromogénicos y fluorogénicos que ponen de manifiesto la presencia de un grupo de enzimas específicas de diferentes especies de *Candida*, entre ellas:  $\beta$ -D-galactosaminidasa,  $\beta$ -D-glucosaminidasa, L-prolina-aminopeptidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa, además de la pirofosfato diestearasa y la fosfatasa ácida (Bobey y Ederer, 1981; Polachek *et al.*, 1987; Smitka y Jackson, 1989; Orena *et al.*, 2009). En presencia de sustratos fluorogénicos, la reacción enzimática da lugar a compuestos fluorescentes, que pueden ser observados bajo luz ultravioleta (UV) a 366 nm, mientras que un sustrato cromogénico da lugar a una colonia pigmentada que puede ser detectada a simple vista.

Los medios cromogénicos diferenciales, además de las ventajas que ofrecen de poder aislar e identificar presuntivamente a partir del cultivo primario el agente patógeno y discriminar las levaduras de una muestra con microbiota polifúngica, con una elevada sensibilidad y especificidad, resultan muy atractivos por la sencillez y rapidez con que establecen el diagnóstico mediante el desarrollo diferencial de colonias pigmentadas (Cooke *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Ghufrana *et al.*, 2010; Baradkar *et al.*, 2010).

#### **1.10 Medios cromogénicos y fluorogénicos para el diagnóstico diferencial de las especies de *Candida* de importancia clínica**

Odds y Bernaerts (1994) fueron los primeros que describieron la utilidad del medio CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Francia) para identificar las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, en función de los colores que desarrollan las colonias. *C. albicans* muestra color verde, *C. tropicalis* se identifica por un color azul oscuro con un halo púrpura-marrón a su alrededor y *C. krusei* posee colonias rugosas con el centro rosado y bordes claros. El medio posee una elevada sensibilidad y especificidad para la identificación de estas especies (Li-Ung *et al.*, 2001; Horvath *et al.*, 2003; Ballesté *et al.*, 2005).

A pesar de que también se ha descrito su utilidad para la identificación de *C. glabrata*, definiendo el color de las colonias como rosa-rojizo o púrpura, varios estudios han confirmado que otras nueve especies de *Candida*, entre las que se destacan por su frecuencia en aislamientos *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. famata* y *C. lusitanae*, dan origen a colonias de similar color, causando ambigüedad y confusión en la identificación (Gatica *et al.*, 2002; Ruiz-Aragón *et al.*, 2003). Por ello, Murray y col. (2005) proponen el empleo de pruebas rápidas adicionales, por ejemplo, *Rapid-Assimilation of Trehalose Test* (RAT) para confirmar la presencia de *C. glabrata*, encontrando valores de sensibilidad y especificidad de 100%.

El medio CHROMagar Candida se reformuló con nuevas bases nutritivas, buscando un mayor nivel de diferenciación, especialmente para *C. dubliniensis*. La nueva composición vigente se considera poco apropiada para dicha especie por mostrar igual coloración verde que *C. albicans* y diferenciarla sólo por la intensidad del color (Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Ruiz-Aragón *et al.*, 2003).

La inoculación de este medio de cultivo, generalmente, se realiza en placas de Petri preparadas, pero también hay estudios utilizando tubos con agar inclinado (*Chromogenic Tube Test*) como un método rápido para la identificación de *C. albicans* (Merlino *et al.*, 1998). A pesar de ser una prueba simple y rápida para la identificación de este germen, los valores de sensibilidad y especificidad dependen de los períodos de incubación, siendo para el primero de los parámetros entre 78,4-91,9% y el segundo 69,2-76,9% a las 8 y 24 h (Yucesoy *et al.*, 2001).

La composición Inray Colorex Yeast (Biomedics Diagnostic, EEUU) permite la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, al desarrollar las colonias colores similares a los descritos en CHROMagar Candida. Se ha publicado que los resultados alcanzados, al utilizar este producto, son confiables en un plazo de 48 a 72 h de incubación (Torres *et al.*, 2005).

El medio Albicans ID (bioMérieux) se diseñó para la identificación de *C. albicans* por el desarrollo de un color azul y la apariencia lisa de sus colonias. Las demás especies del género se muestran de color blanco. El sustrato cromogénico, que emplea esta composición, es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida (X-gal) (Rouselle *et al.*, 1994). Los estudios publicados acerca de la evaluación del medio reflejaron valores de sensibilidad y especificidad de 96 y 87%, respectivamente, dados por la detección de falsos positivos en aislamientos de *C. tropicalis*,

*C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii* y resultados falsos negativos con cepas de *C. albicans* (De Champs *et al.*, 1995; Godoy *et al.*, 2001).

Estas deficiencias instaron a los investigadores a reformular el medio de cultivo, surgiendo con ello, Albicans ID2 (bioMérieux), una composición más enriquecida que facilita el aislamiento y la identificación de *C. albicans*, al desarrollar un color azul más intenso, y de *C. tropicalis*, al manifestar una tonalidad verdosa en el medio, lo que dio lugar a índices de sensibilidad y especificidad superiores al 97%, cada uno (Freydiere *et al.*, 2000).

Con el propósito de ampliar la gama de especies a identificar a partir del aislamiento primario, surgen los medios de cultivo agar Candida ID y más adelante su versión optimizada agar Candida ID2 (bioMérieux) que mejoraron la intensidad del color de las colonias y la selectividad (inhibición de bacterias). Las colonias de *C. albicans* manifiestan un color azul por la hidrólisis específica de un sustrato cromógeno (indol-glucosaminida) y la hidrólisis de un segundo sustrato sugiere la identificación de otras especies, tales como *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *Candida humicola* y *C. neoformans*, que manifiestan un color rosa con mayor o menor intensidad. El resto de las especies desarrollan un color blanco crema y su identificación requiere de otras pruebas bioquímicas (Freydiere *et al.*, 2000; Fricker-Hidalgo *et al.*, 2001).

Los valores de sensibilidad, en un estudio comparativo del medio Candida ID con el CHROMagar Candida, mostraron variabilidad de los resultados en correspondencia con el tiempo de incubación. A las 24 h la sensibilidad en Candida ID fue de 96,8%, mientras que en CHROMagar resultó de 49,6%; luego de 48 h la sensibilidad resultó de 99,7 y 98,9%, respectivamente y después de las 72 h, en ambos medios, se alcanzó una sensibilidad del 100% (Willingner *et al.*, 2001; Quindós *et al.*, 2001; Letscher-Bru *et al.*, 2002).

Otro grupo de medios de cultivo, con diseños similares, destinados a la identificación presuntiva de *C. albicans*, se encuentra en el mercado con porcentajes de sensibilidad y especificidad satisfactorios. Dentro de las formulaciones cromogénicas se hallan Chromoalbicans agar (Biolife, Italia) (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001), Cromogen Albicans (Biomedics) (Castro y Martín, 2004; Ieven *et al.*, 2007), CandiSelect medium (Biorad) (Letscher-Bru *et al.*, 2002), Chromosense

*Candida albicans* agar (Microtrade Ltd, Reino Unido) (Ghelardi *et al.*, 2007). En todos los casos se detecta la presencia de esta especie por el desarrollo de colonias de color azul.

Fuera de este grupo, el medio Candida Diagnóstico agar, CDA (Oxoid, Reino Unido) posee una composición basada en la incorporación en el medio ADS del sustrato cromogénico: amonio-4-{2-[4-(2-acetamida-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)-3-metoxifenil]-vinil}-1-(propan-3-il-oato)-quinoliumbromuro, a 0,32 g/L de concentración, para revelar la actividad glucosaminidasa. Este sustrato es hidrolizado por *C. albicans* y *C. dubliniensis*, las cuales son identificadas por producir colonias blancas con un halo rojo profundo sobre el fondo amarillo y transparente del medio. Las colonias de *C. tropicalis* y *C. kefyr* son completamente rosadas, y las de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* son blancas (Cooke *et al.*, 2002).

El medio Oxoid Chromogenic Candida agar, OCCA (OXOID) utiliza dos sustratos cromogénicos para diferenciar las colonias de *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul oscuro) y *C. krusei* (rosa beige) de otras especies de *Candida* (beige, amarillo y marrón) en 48 h, con una sensibilidad y especificidad del 99,4%, respectivamente (Ieven *et al.*, 2007; Ghelardi *et al.*, 2007).

Entre las formulaciones fluorogénicas cabe mencionar el Fluoroplate Candida (Merck, Alemania) con valores de sensibilidad y especificidad de 98,8 y 97,9%, respectivamente (Manafi y Willinger, 1991; Rouselle *et al.*, 1994) y el agar SDCA-MUAG ó agar Sabouraud MUAG (Biolife, Italia) que muestra una sensibilidad de 98,4% y especificidad de 98,9%, (Willinger *et al.*, 1994). Estos productos permiten la identificación de *C. albicans* por su capacidad de hidrolizar el sustrato MU-gal presente, originando una fluorescencia, al iluminar la placa con una lámpara UV de 366 nm.

Por último, el Candichrom (International Microbio, Francia) se presenta como una placa con tres compartimientos: uno de ellos posee un medio con TTC, el segundo contiene, además de actidiona para evaluar sensibilidad, un sustrato cromogénico para revelar la actividad L-prolina amidasa y el tercer medio incorpora el sustrato X-gal (Waller *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2004).

En resumen, la mayoría de los medios de cultivo cromogénicos-fluorogénicos, diseñados para el género *Candida*, logran la identificación presuntiva de la especie *C. albicans*, y sólo tres de las composiciones detectan entre 3 y 4 especies de este género, con la posibilidad de diferenciarlas en cultivos mixtos. Sin embargo, especies de relevancia clínica, tales como *C. parapsilosis* y



*C. glabrata*, no se logran identificar en ninguno de los medios cromogénicos disponibles en el mercado. La siembra de estos medios de cultivo se realiza de forma convencional, estriando las muestras sospechosas de infecciones micóticas por levaduras sobre la superficie del agar, hasta alcanzar el aislamiento de las colonias. El período de incubación y la lectura están en dependencia de las recomendaciones del fabricante, en un intervalo de temperatura entre 30-37°C, por lo general por 48 h. Es importante considerar que en el diagnóstico micológico es imprescindible contar con medios de demostrada calidad. Es por ello que, al utilizar diagnosticadores comerciales, se debe tener en cuenta la garantía del proveedor y la calidad de la distribución, fundamentalmente para los medios listos para el uso.

Hasta el momento, no se han encontrado fuentes bibliográficas que demuestren el poder de recobrado de los medios de cultivo y su capacidad para el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Candida* spp., al procesar muestras donde es indispensable detectar el agente patógeno a bajos niveles de infección tales como líquidos estériles: orina, líquido cefaloraquídeo (LCR), sangre, entre otros.

Por último, las necesidades actuales vinculadas al aumento en frecuencia y gravedad de las infecciones sistémicas graves y la emergencia de nuevos patógenos oportunistas con manifestaciones de resistencias (natural o adquirida) a los antifúngicos disponibles, requieren de la búsqueda de métodos más simples y precisos, que aseguren la identificación del mayor número de especies de *Candida* de relevancia clínica.

## **Capítulo 2. Materiales y Métodos**

---

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materiales**

#### **2.1.1 Materias primas de origen vegetal**

Para la obtención de extractos nutritivos de origen vegetal se seleccionaron, en calidad de materias primas, la raíz reservante de *Ipomoea batatas* (boniato o batata) y el fruto maduro de *Solanum lycopersicum* (tomate). Las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo), se ajustaron de modo que cada sustrato preservara sus propiedades para el uso; siendo para la batata de 25-30°C durante dos meses y para el tomate de 2-8°C hasta cinco días.

La composición química de ambos sustratos de origen vegetal se muestra en el anexo A.

#### **2.1.2 Agente enzimático**

Como agente hidrolizante se utilizó ALSAK 403 (Alsak, S.A. de C.V., México), una alfa-amilasa bacteriana obtenida a partir de la fermentación controlada de *Bacillus lincheniformis*. La enzima se caracteriza por su acción dextrinizante sobre el almidón presente en la raíz de *I. batatas*, con una excepcional estabilidad térmica. Los parámetros óptimos para la hidrólisis con esta enzima son: la temperatura de 90°C y el pH entre 5,0 y 8,0. ALSAK 403, esencialmente, está libre de actividad proteolítica y posee una prolongada estabilidad durante su almacenamiento. En el anexo A se provee información adicional declarada por los fabricantes.

#### **2.1.3 Material biológico**

Para el control microbiológico de los diferentes ensayos se utilizaron microorganismos de referencia del cepario de BioCen, entre ellos, cepas de levaduras y bacterias. Un resumen de las especies empleadas en los diferentes experimentos (acápites que se describen a continuación), se muestra en la tabla 2.1. Para la inoculación de todas las variantes de estudio, se prepararon suspensiones microbianas de aproximadamente  $6,0 \times 10^8$  UFC/mL, en 9 mL de una disolución salina estéril al 0,85% (p/p), a partir de cultivos puros, incubados entre 24 y 48 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### **2.1.4 Sustratos cromogénicos y fluorogénicos**

Para el diseño y evaluación de las composiciones se utilizaron sustratos con propiedades cromogénicas y fluorogénicas. Los sustratos cromogénicos adicionados a los ensayos fueron:

**Tabla 2.1.** Microorganismos utilizados en los ensayos relativos a los acápite correspondientes

Especie	Referencia	Acápite					
		2.2.4	2.3.1	2.3.2	2.3.3	2.3.4	2.4
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	x	x	x	x	x	x
<i>Candida albicans</i>	ATCC 17111	x	-	-	-	-	x
<i>Candida tropicalis</i>	C1-UH/Ct	x	x	x	x	x	x
<i>Candida glabrata</i>	C1-UH/Cgl	x	x	x	x	x	x
<i>Candida parapsilosis</i>	C1-UH/Cp	x	x	x	x	x	x
<i>Candida kefyr</i>	C1-UH/Ckf	x	x	x	x	x	x
<i>Candida krusei</i>	C1-UH/Ckr	x	-	x	-	x	x
<i>Candida guilliermondii</i>	I-1	-	-	-	-	x	x
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	-	-	-	-	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>	ATCC 6258	-	-	-	x	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-	-	x	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-	-	-	x	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-	x	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	-	-	-	x	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315	-	-	-	x	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	-	-	x	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-	-	-	x	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-	-	-	x	-	-

Cepas certificadas: ATCC- American Type Culture Collection, C-UH- Colección de la Universidad de la Habana. Cepa aislada: I-Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido (X-glc), 6-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido (Ros-glc), 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida (X-gal), 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (X-glu) (INALCO, Italia) y L-prolina paranitroanilida (L-Pro) (Biosynth, Suiza) y los fluorogénicos: 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida (MU-gal) (Biosynth) y 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (MU- $\alpha$ -glc) (INALCO).

## **2.2 Desarrollo de un extracto nutritivo de origen vegetal**

Las principales especificaciones del diseño del nuevo prototipo consistieron en la obtención de un extracto nutritivo capaz de garantizar el rápido desarrollo de las especies de *Candida* y de facilitar su diferenciación en medios de cultivo cromogénicos. La etapa de investigación-desarrollo (I+D) siguió el esquema de trabajo recomendado por Zhurbenko (2005), sobre la base del sistema de calidad vigente en BioCen.

### **2.2.1 Metodología para la obtención del extracto de batata**

La batata molida, se mezcló con agua desionizada en proporción de 1:3 (kg de sustrato:L de agua). A la mezcla, cocida durante 30 min, se le restituyó el agua evaporada hasta alcanzar una relación de 1:5 y se estabilizó la temperatura a 70°C. Se adicionó la enzima ALSAK 403, manteniendo la agitación a 800-1000 rpm hasta la ausencia del almidón. Como parámetros del proceso se estudiaron el pH de hidrólisis, la concentración de la enzima y las operaciones fundamentales para la purificación del extracto.

#### **2.2.1.1 Estudio de la influencia del pH en el proceso de hidrólisis enzimática sobre la calidad del extracto de batata**

Se diseñaron cinco variantes, en cuatro de ellas (variantes 1-4) se ajustó el pH para la hidrólisis del sustrato a 6,0- 6,5- 7,0-7,5; respectivamente, y en la última (variante 5), tomada como referencia con pH de 6,69, el valor del mismo no se modificó. A partir del material soluble y purificado (extracto), obtenido en cada variante, se prepararon disoluciones acuosas al 2% (p/p) y se estudió la presencia de almidón, las características organolépticas, el porcentaje de carbohidratos totales en base seca (CT) y los sólidos totales (ST).

#### **2.2.1.2 Evaluación de la influencia de la concentración de la enzima durante la hidrólisis**

Se ensayaron tres variantes: en la primera se adicionó la alfa-amilasa en cantidad de 0,22 mL/kg de sustrato; en la segunda se añadió igual cantidad (0,22 mL/kg) en dos partes (0,11 mL al inicio

del proceso y el resto 2 h después); en la tercera variante se incorporaron 0,11 mL/kg de sustrato. Como variables de salida se evaluaron, en los extractos experimentales, las características organolépticas de la disolución acuosa al 2% (p/p) y se determinó el contenido de CT y nitrógeno amínico (Nam).

#### **2.2.1.3. Métodos para la purificación del extracto de batata**

Al concluir la hidrólisis se ajustó el pH final a 5,2 y se estudiaron dos métodos para la purificación del extracto. En el primero se empleó la centrifugación del hidrolizado (4100 rpm durante 15 min) y en el segundo se combinaron la extracción por sifón y la clarificación del líquido por tamices. A continuación, los extractos obtenidos por cada método se filtraron por placas de celulosa, se concentraron y se deshidrataron por aspersión (NIRO ATOMIZER, Dinamarca) con temperatura del aire en la entrada a la cámara de 180°C y en la salida de 70°C. Como requisito de calidad final se evaluaron, en el extracto de batata, las propiedades organolépticas de la disolución acuosa al 2% (p/p).

#### **2.2.2 Procedimiento para la obtención del extracto de tomate**

El proceso de obtención del extracto de tomate consistió en una extracción acuosa de sus componentes nutricionales, considerando que la mayor parte de su peso es agua. Los tomates maduros se molieron y se mezclaron con agua desionizada en una proporción de 2:1. La mezcla sustrato:agua fue cocida durante 1 h, manteniendo una agitación constante a 1000 rpm. El material soluble se separó por centrifugación (6000 rpm durante 15 min). La pasta (sólido resultante) se mezcló con agua desionizada (1:1), se hirvió por 30 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones. La fracción líquida procedente de cada etapa de separación se mezcló y se filtró por placas clarificantes. Antes de someter el producto a la etapa de deshidratación el mismo se concentró hasta un índice de refracción de 1,390-1,400 (30-40% de sólidos totales). Se evaluaron como indicadores de calidad del extracto el pH y la organoléptica de la disolución acuosa al 2% (p/p). Como indicador de la eficiencia de la tecnología de obtención se determinó el rendimiento final (%) del producto, con respecto a la masa inicial del sustrato.

#### **2.2.3 Funcionalidad microbiológica de los extractos nutritivos**

Se formularon composiciones simples según lo recomendado por SIGMA (2000), utilizando NaCl al 0,5%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,1% (Applichem, Alemania) y el extracto nutritivo al 2% de concentración.

Se seleccionaron para el ensayo: el extracto de batata, el extracto de tomate y el extracto de malta (como referencia). Se ajustó el pH final de los medios a 6,9; los mismos se distribuyeron en tubos y se esterilizaron a 121°C durante 15 min. Los caldos se inocularon con 0,1 mL de una suspensión de *C. albicans* ATCC 10231 y se incubaron a 30°C. El incremento de la biomasa de la cepa de referencia utilizada se determinó al medir el valor de la absorbancia cada 1 h en un espectrofotómetro (PU 8620, Philips, Japón) a 640 nm durante el período de cultivo.

#### **2.2.4 Evaluación de la influencia de los extractos nutritivos en el desarrollo de características cromogénicas y fluorogénicas en composiciones para la identificación de especies de *Candida***

Se formularon tres variantes de medios sólidos (Tabla 2.2). A todas las formulaciones se les ajustó el pH a 6,5; se esterilizaron en autoclave y, en condiciones asépticas, se les adicionaron los sustratos X-glc y MU-gal. Homogeneizadas las mezclas, éstas se distribuyeron en placas de Petri estériles. Se evaluaron siete cepas de *Candida* (Tabla 2.1), utilizando suspensiones microbianas y el método de estriado hasta el agotamiento del inóculo. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h. Se realizó la evaluación del crecimiento y desarrollo de las características culturales de las especies, así como se observó su coloración (bajo luz visible) y fluorescencia (bajo luz UV de 366 nm), propias de la degradación de los sustratos empleados.

#### **2.2.5 Fabricación a nivel industrial del extracto de batata**

El extracto nutritivo se fabricó a nivel industrial en las instalaciones de la planta de producción de medios de cultivo de BioCen, aplicando las buenas prácticas de manufactura (BPM), los procedimientos normalizativos de operación (PNO) y la experiencia tecnológica acumulada para la elaboración de bases nutritivas, según lo recomendado por Zhurbenko y Rodríguez (2008).

##### **2.2.5.1 Análisis organoléptico y físico-químico**

Para la caracterización del extracto se determinó un conjunto de indicadores que rigen la calidad de las bases nutritivas (Tabla 2.3), según lo descrito por Zhurbenko (2005) y Zhurbenko y Rodríguez (2009).

##### **2.2.5.2 Análisis microbiológicos**

Con vistas a la evaluación microbiológica del extracto de origen vegetal se abordaron dos elementos fundamentales: (i) el ensayo de la reactividad biológica consistente en la detección de sulfuro de hidrógeno, la producción de indol, la presencia de carbohidratos fermentables y la

**Tabla 2.2.** Variantes de medios de cultivo formulados con diferentes extractos nutritivos para evaluar su influencia sobre las reacciones cromogénicas y fluorogénicas

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>	<b>Medio I</b>	<b>Medio II</b>	<b>Medio III</b>
Extracto de batata (BioCen)	10,0	x	x	-
Extracto de tomate (BioCen)	10,0	x	-	-
Extracto de levadura (BioCen)	10,0	-	x	-
Extracto de malta (Merck)	20,0	-	-	x
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	1,0	x	x	x
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Merck)	0,5	x	x	x
X-glc (INALCO)	0,04	x	x	x
MU-gal (Biosynth)	0,04	x	x	x
Agar (AgarMex, México)	15,0	x	x	x



**Tabla 2.3.** Indicadores y métodos de ensayo para determinar la calidad final de las bases nutritivas

Indicador	Método de ensayo	Referencia
pH de la solución acuosa al 2% (p/p) de la base nutritiva	método potenciométrico	USP XXXI, 2008
Pérdida por desecación	método gravimétrico	
Contenido de carbohidratos totales	método espectrofotométrico a 490 nm	
Detección cualitativa del almidón	evaluación visual	técnica con solución hidro-alcohólica de yodo al 1% (p/p)
Contenido de triptófano libre	método espectrofotométrico a 620 nm	Runova <i>et al.</i> , 1977
Contenido de cloruros (como NaCl) en presencia de proteínas	método de Volhard	
Contenido de nitrógeno amínico	método de valoración potenciométrica en presencia de formaldehído	Morris <i>et al.</i> , 2002
Contenido de nitrógeno total	método de Kjeldahl con ayuda del Kjeltec System	Tecator, Suecia, 1987
Capacidad amortiguadora ante los ácidos y las bases	método potenciométrico en presencia de HCl (1 mol/L) ó NaOH (1 mol/L)	Bridson, 1994
Contenido de macro- y micro-minerales	método con un espectrofotómetro de absorción atómica (para la determinación de K, Na, Ca, Mg, Zn, Mn, Cu, Co, Pb, Cd)	ISO 6490/1, 1983; ISO 6490/2, 1983
	método colorimétrico vanadato-molibdato (contenido de P)	AOAC, 1995

producción de acetilmetilcarbinol (prueba de Voges-Proskauer), realizados por los métodos recomendados en la USP XXXI (2008); (ii) la prueba de promoción de crecimiento microbiano: en la cual se determinó el incremento de la biomasa microbiana en el tiempo, utilizando suspensiones de dos cepas de *C. albicans* (ATCC 10231 y 17111) y un método espectrofotométrico a 640 nm (SIGMA, 2000). La evaluación se realizó comparando el extracto de batata con otras bases nutritivas, tales como la peptona de soya (Biotécnica Internacional, México), el extracto de levadura, la peptona micológica y la triptona (BioCen).

### **2.3 Desarrollo a ciclo completo del medio cromogénico**

El requisito principal en las especificaciones de diseño del nuevo diagnosticador con propiedades cromogénicas se definió como la capacidad de permitir el cultivo y la diferenciación de las especies de *Candida* más frecuentes en muestras clínicas, en un período máximo de 48 h.

#### **2.3.1 Evaluación funcional de composiciones cromogénicas**

A partir de una formulación básica agarizada, que combina el extracto de batata (10 g/L), extracto de levadura (10 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L), desoxicolato de sodio (0,5 g/L) y agar (15 g/L), se prepararon dos variantes experimentales, ajustando su pH a 6,8. En la primera se incorporó el sustrato L-Pro (0,1 g/L) y en la segunda el Ros-glc (0,1 g/L). Los medios se calentaron hasta la ebullición, no se esterilizaron en autoclave y se distribuyeron en placas de Petri estériles. Las placas preparadas se inocularon con suspensiones de cinco especies de *Candida* (Tabla 2.1) y se incubaron a 30°C durante 48 h. Se determinó la capacidad de las composiciones para lograr la diferenciación de las especies de *Candida* de acuerdo a las características cromáticas (bajo luz visible) que desarrollaron las colonias.

#### **2.3.2 Evaluación microbiológica de formulaciones que combinan los sustratos con el glicerol**

Se ensayaron tres variantes empleando la composición basal descrita en el acápite 2.3.1, incorporándoles el glicerol (10 mL/L de medio). En la primera se combinaron el X-gal y el Ros-glc; en la segunda se adicionó el X-glc y en la tercera no se adicionó ningún sustrato. Se ajustó el pH a 6,8; se calentaron los medios hasta la fusión completa del agar y se distribuyeron en placas de Petri. Se realizó la evaluación funcional utilizando suspensiones de seis especies de *Candida* (Tabla 2.1). Se incubaron las placas a 30°C por 48 h y se observaron las características morfológicas y cromáticas de las colonias aisladas en las formulaciones.

### **2.3.3 Evaluación del efecto inhibitorio del desoxicolato de sodio y el ácido nalidíxico**

Se estudiaron tres formulaciones de medios a partir de la composición basal descrita en el acápite 2.3.1, incorporándoles el ácido nalidíxico (0,01; 0,03 y 0,05 g/L, respectivamente), como agente antibacteriano, en combinación con el desoxicolato de sodio. Se ajustó el pH de los medios a 6,8 y se calentaron hasta la fusión del agar. La actividad inhibitoria se evaluó frente a un grupo de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como levaduras pertenecientes al género *Candida* (Tabla 2.1). La inoculación se realizó por estriado hasta el agotamiento del inóculo. Se incubaron las placas a 30°C por 48 h.

### **2.3.4 Evaluación funcional de la composición cromogénica con una mayor concentración del extracto de batata**

La composición descrita en el acápite 2.3.1 se enriqueció con 20 g/L de extracto de batata y se adicionaron el X-glu y el Ros-glc (0,1 g/L, respectivamente), ácido nalidíxico (0,03 g/L) y glicerol (10 mL/L). Se restituyó en agua desionizada, se ajustó el pH a 6,6 y se calentó hasta la fusión completa del agar. Se evaluó la capacidad de la composición para la recuperación, detección y diferenciación simultánea de siete especies de *Candida* (Tabla 2.1), utilizando 0,2 mL de la dilución microbiana (30-300 UFC/mL), distribuido sobre la superficie del medio. En el ensayo se utilizaron placas con ADS (medio control). La capacidad de recuperación (%) se calculó relacionando los recuentos entre ambos medios y se valoró el color y la morfología colonial.

### **2.3.5 Introducción en la industria del medio de cultivo cromogénico y del Suplemento Glicerol**

Teniendo en cuenta las BPM y las normas establecidas por el Sistema de Calidad de la institución, ISO 9001:2000, se fabricaron, a escala industrial, tres lotes de 3 kg del medio de cultivo y tres lotes de 600 bulbos cada uno del suplemento glicerol. La introducción a la producción se realizó por la metodología establecida en la Planta de Producción de Medios de Cultivo del BioCen “PNO 15.005: Diseño y desarrollo de prototipos” (Rodríguez y Zhurbenko, 2002). Como parte de la verificación del diseño, los laboratorios de Control de la Calidad del BioCen realizaron el análisis de la consistencia entre los lotes, evaluando sus indicadores de calidad. Los ensayos correspondientes al estudio de estabilidad en anaquel, del producto introducido se ejecutaron durante el período de almacenamiento, conservando los frascos herméticamente cerrados en lugar seco, protegido de la luz, a temperatura de 15 a 30°C.

Además, se determinó el período de validez del medio listo para el uso (MLPU) conservando las placas preparadas a temperatura de 2 a 8°C durante 30 días.

### **2.3.6 Evaluación externa del desempeño del medio cromogénico**

De acuerdo al Sistema de Calidad de BioCen esta etapa, que abarcó un período de hasta tres meses, se denomina “Validación por los clientes” y debe contar con, al menos, el criterio de tres laboratorios externos sin señalar la cantidad mínima de muestras a procesar.

Se realizó la evaluación funcional de los tres lotes industriales del medio y de su suplemento, en los servicios de microbiología de diferentes hospitales de la capital, siguiendo las indicaciones recomendadas en el prospecto que acompaña el producto para la preparación, inoculación e interpretación de los resultados. Se evaluaron, entre los principales parámetros de calidad, la organoléptica del polvo, del medio restituido y del preparado; el pH y las características culturales (color y morfología) que desarrollaron las colonias de las especies de *Candida* aisladas de los diferentes especímenes clínicos, que se identificaron directamente. Para las cepas aisladas, que no fueron identificadas en un primer paso (48 h) se aplicaron pruebas bioquímicas adicionales previstas en el método de referencia para determinar la especie en cuestión.

Las evaluaciones externas constituyen requisitos obligatorios para la confección y presentación del expediente de registro del nuevo diagnosticador en el CECMED (Regulación No. 8, 2001; Regulación No. 20, 2004).

### **2.4 Modificación del método de auxonograma para la identificación de *Candida* spp.**

Se evaluó una composición sintética, libre de sustancias carbonadas, compuesta por:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5,0 g/L);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,45 g/L);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,31 g/L);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,92 g/L);  $\text{NaCl}$  (0,1 g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L);  $\text{CaCl}_2$  (0,05 g/L); L-histidina HCl (0,005 g/L); L-triptófano (0,02 g/L) y L-metionina (0,02 g/L). Como elementos novedosos se incorporaron azul de bromotimol y agar. La composición se ajustó a pH 6,6, se distribuyó en tubos o matraces de Erlenmeyer un volumen de 20 ó 60 mL, en dependencia del tamaño de la placa de Petri a utilizar, y se esterilizó en autoclave (GETINGE, Francia) a temperatura de 121°C durante 15 min.

La prueba se realizó utilizando sustancias carbonadas, a partir de las cuales se prepararon soluciones acuosas con una concentración al 20% (p/p): glucosa, xilosa, adonitol, inositol, maltosa, trehalosa y rafinosa (Merck); galactosa, celobiosa, lactosa y ácido láctico (Applichem);

sorbitol, metil-alfa-D-glucopiranosido y melecitosa (Fluka, Suiza). Cada sustancia fue disuelta en agua desionizada, filtrada por cartuchos (0,45  $\mu\text{m}$ ) (Nalge Co., Rochester, N.Y.) y almacenada en tubos a temperatura de 4 a 8°C hasta su empleo.

Para evaluar el procedimiento del auxonograma, utilizando la composición agarizada, se mezcló 1 mL de la suspensión de la cepa microbiana a identificar con 20 mL del medio a temperatura entre 45-50°C. Sobre la mezcla solidificada se insertó 0,1  $\mu\text{L}$  de la disolución del compuesto carbonado en diferentes puntos, distribuidos a una distancia mínima uno de otro de 2 cm. Las placas se colocaron invertidas, en una estufa a 35°C y cada 24 h se observaron las mismas hasta un máximo de 72 h, informando la asimilación positiva al aparecer una zona circular de mayor densidad de crecimiento alrededor del sitio donde se aplicó la sustancia en el agar. Se evaluó la concordancia con respecto al método estándar de Wickerham (Adams y Cooper, 1974). El estudio se realizó, en un inicio, con ocho cepas de referencia (Tabla 2.1) y se amplió con 156 cepas de *Candida* aisladas de muestras clínicas.

## **2.5 Desarrollo a ciclo completo de un método cromogénico-fluorogénico**

El requisito principal de diseño para el nuevo método de identificación de especies de *Candida* de relevancia clínica consistió en que debía identificar, con elevada exactitud y en un máximo de 48 h, el mayor número de especies frecuentes en candidiasis superficiales y sistémicas, con elevada exactitud diagnóstica.

### **2.5.1 Estudio de la influencia del sustrato MU- $\alpha$ -glc para la diferenciación de *Candida* spp.**

Se evaluó la influencia del MU- $\alpha$ -glc, al incorporarlo en la composición definida en el acápite 2.3.4, para estudiar la posibilidad de aumentar el número de especies de *Candida* a identificar. Se evaluó un total de 66 cepas de *Candida* (Tabla 2.4). Las suspensiones microbianas se inocularon sobre la superficie del medio utilizando una asa microbiológica de 10  $\mu\text{L}$ . Las placas se incubaron a 35°C y se examinaron a las 48 h. Se determinó la presencia de fluorescencia en las colonias bajo luz UV a 366 nm, así como la coloración y morfología colonial.

### **2.5.2 Introducción del medio de cultivo cromogénico-fluorogénico en la industria**

Se fabricaron tres lotes industriales de 3 kg del medio con el objeto de comprobar su consistencia, verificar las especificaciones del diseño del prototipo y comenzar los estudios de

**Tabla 2.4.** Microorganismos control para el estudio de la influencia del MU- $\alpha$ -glc en la identificación de *Candida* spp.

Especie	Cantidad	Código de identificación de las cepas
<i>C. albicans</i>	10	ATCC 10231, ATCC 17111, AMJ2, AMJ6, HLP5, HLP43, HLP93, HLP111, JMM4, JMM8
<i>C. tropicalis</i>	9	AMJ10, AMJ13, B2, HLP10, HLP135, HN5, JMM1, JMM15, MX582
<i>C. parapsilosis</i>	9	AMJ15, AMJ20, HLP38, HLP141, HLP142, HLP145, HN1, HN8, MX571
<i>C. glabrata</i>	9	B3, HLP16, HLP116, HLP120, HLP126, HN4, HN6, HN7, MX573
<i>C. guilliermondii</i>	8	AMJ1, AMJ24, AMJ35, AMJ40, HLP90, HLP147, HLP148, MX579
<i>C. krusei</i>	7	HLP127, HLP128, HLP129, HLP130, HLP131, HLP132, C1-UH/Ckr
<i>Candida lusitaniae</i>	7	HLP138, HLP139, HLP140, HN3, MX575, MX576, MX577
<i>C. kefyr</i>	4	MX568, MX569, B7, C1-UH/Ckf
<i>Candida famata</i>	1	MX584
<i>Candida dubliniensis</i>	1	MX580
<i>Candida rugosa</i>	1	MX583
<b>Total</b>	<b>66</b>	

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*; MX- Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, México; C-UH- Colección de la Universidad de la Habana.

Cepas aisladas: AMJ- Hospital Clínico-Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”, HLP- Hospital Pediátrico “Leonor Pérez”, JMM- Hospital Pediátrico “Juan Manuel Márquez”,

HN- Hospital Militar “Dr. Luís Díaz Soto”, B- Centro Nacional de Biopreparados

estabilidad en anaquel. La introducción a la producción se efectuó siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.3.5, según las BPM y las normas ISO 9001:2000.

### **2.5.3 Evaluación externa del desempeño del medio cromogénico-fluorogénico**

Se realizó la evaluación externa del desempeño del medio cromogénico-fluorogénico, según lo descrito en el acápite 2.3.6. El estudio se llevó a cabo en varios laboratorios de microbiología de hospitales especializados (clínico-quirúrgicos, pediátricos, maternos) y, además, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional de México (ENCB, IPN).

## **2.6 Validación intra- e inter-laboratorios y determinación de la incertidumbre de los métodos**

Se determinaron la precisión, exactitud, fiabilidad y equivalencia de los métodos microbiológicos alternativos (método cromogénico y cromogénico-fluorogénico), respecto al método de referencia (utilizando el ADS), con el objetivo de demostrar su capacidad para el cultivo, aislamiento, detección, identificación y enumeración de *Candida*.

### **2.6.1 Validación del método cromogénico**

#### **2.6.1.1. Evaluación de los parámetros de inclusividad y exclusividad**

Para el estudio de inclusividad se seleccionaron 50 cepas de *Candida* (microorganismos “diana”) (Tabla 2.5) y para la exclusividad un total de 20 cepas (microorganismos “no diana”) (Tabla 2.6). Se realizó un estudio comparativo de los resultados cualitativos obtenidos entre la metodología de referencia para la identificación de especies de *Candida* (Larone, 2002; De Hoog *et al.*, 2009) y el método cromogénico alternativo con el empleo del CromoCen CND-C (ISO 16140, 2003).

#### **2.6.1.2 Determinación del límite de detección**

Se calculó el límite de detección de los medios CromoCen CND-C y ADS, al analizar cualitativamente el crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 a siete concentraciones diferentes, expresadas en UFC/mL: 0,004 (valor asignado al nivel<sub>1</sub> ante la ausencia de los microorganismos para ejecutar el procesamiento estadístico); 0,1 (nivel<sub>2</sub>); 1 (nivel<sub>3</sub>); 1,5 (nivel<sub>4</sub>); 2 (nivel<sub>5</sub>); 4 (nivel<sub>6</sub>) y 10 (nivel<sub>7</sub>). Se inocularon 0,5 mL de las diluciones microbianas correspondientes en la superficie de 10 placas de Petri con CromoCen CND-C y la misma cantidad de placas con ADS. Las placas se incubaron por 48 h a 35°C. El valor del límite se calculó mediante un análisis de regresión considerando el número de placas con crecimiento respecto al total de placas inoculadas en cada nivel (ISO 16140, 2003). Se aplicó, además, la prueba de hipótesis para

**Tabla 2.5.** Microorganismos “diana” utilizados en la evaluación del parámetro de la inclusividad

Especie	Cantidad	Código de identificación de las cepas
<i>C. albicans</i>	10	ATCC 10231, ATCC 17111, C1-UH/Ca, C3-UH/Ca, C4-UH/Ca, W1, W2, W5, W7, W8
<i>C. glabrata</i>	9	C1-UH/Cgl, C2-UH/Cgl, MX573, MX574, W1-1, W3, W12, W13, W14
<i>C. parapsilosis</i>	9	C1-UH/Cp, MX570, MX571, H12, H13, W4, W10, W11, W15
<i>C. tropicalis</i>	6	C1-UH/Ct, MX567, MX582, M14A, W6, W9
<i>C. kefyr</i>	5	C1-UH/Ckf, MX568, MX569, W16, W17
<i>C. lusitaniae</i>	3	MX575, MX576, MX577
<i>C. guilliermondii</i>	3	MX578, MX579, I-1
<i>C. krusei</i>	1	C1-UH/Ckr
<i>C. famata</i>	1	MX584
<i>C. dubliniensis</i>	1	MX580
<i>C. rugosa</i>	1	MX583
<i>Candida inconspicua</i>	1	M6B
<b>Total</b>	<b>50</b>	

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*; MX- ENCB, IPN; C-UH- Colección de la Universidad de la Habana. Cepas aisladas: W- Hospital Pediátrico “William Soler”, H- Hogar materno del municipio de Boyeros, I- Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, M- Hospital Ginecobstétrico “Eusebio Hernández”

**Tabla 2.6.** Microorganismos “no diana” seleccionados para el estudio de la exclusividad

Levadura	Cantidad	Código	Bacterias	Cantidad	Código
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	HTL3	<i>E. aerogenes</i>	1	ATCC 13048
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	B8, B12	<i>E. faecalis</i>	1	ATCC 19433
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	ATCC 9763, P15	<i>E. coli</i>	2	ATCC 25922, P14
<i>Saccharomyces uvarum</i>	1	ATCC 9080	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	ATCC 13883
<i>Trichosporon asahii</i>	1	HLP3401	<i>P. vulgaris</i>	1	ATCC 13315
<i>Trichosporon inkin</i>	1	CQ1	<i>P. aeruginosa</i>	1	ATCC 27853
<i>Cryptococcus humicolus</i>	1	P4	<i>S. Typhimurium</i>	1	ATCC 14028
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	HTL1	<i>S. flexneri</i>	1	ATCC 12022
			<i>S. aureus</i>	1	ATCC 25923
<b>Total</b>	<b>10</b>			<b>10</b>	

Cepas aisladas: HTL- Oficina del Historiador de la Ciudad, B- Centro Nacional de Biopreparados, P- Hogar materno del municipio de Bejucal, HLP- Hospital Pediátrico “Leonor Pérez”, CQ- Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas



determinar la igualdad de los niveles de detección aplicando las tablas de contingencias que representan la probabilidad de determinar el total de resultados positivos y negativos entre ambos métodos.

#### **2.6.1.3 Determinación del nivel crítico y el límite de cuantificación**

El nivel crítico (LC) y el límite de cuantificación (LOQ) se determinaron a partir de los recuentos obtenidos al inocular 0,5 mL de las diluciones correspondientes de *C. albicans* ATCC 10231, en 10 placas preparadas con ADS y con CromoCen CND-C, en un intervalo de ocho niveles de contaminación: 0,004 (valor asignado); 0,1; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 4,0 y 10,0 UFC/mL. Las placas se incubaron a 35°C por 48 h. Los recuentos obtenidos se procesaron considerando el nivel mínimo en el cual se obtuvo desarrollo colonial por ambos procedimientos. Se calculó LC y LOQ, para  $\alpha=5\%$  y  $(1-\beta)=50\%$  según la ISO 16140 (2003).

#### **2.6.1.4 Cálculo del límite de determinación**

Utilizando una suspensión de  $5 \times 10^2$  UFC/mL de *C. albicans* ATCC 10231, se inocularon 0,2 mL en 10 placas con los medios ADS y CromoCen CND-C, se incubaron a 35°C por 48 h, y se realizó el recuento de las UFC/placa. Se calculó el límite de determinación por la ISO/TR 13843 (2000).

#### **2.6.1.5 Estudio de la robustez a diferentes temperaturas de incubación**

Utilizando el procedimiento descrito en el acápite 2.6.1.4 y seleccionando las temperaturas de incubación: 28, 35 y 42°C por 48 h, se tomaron los recuentos de las UFC/placa de dos especialistas. El análisis se ejecutó mediante el cálculo de la *t* de Student para cada par de temperaturas. Se comparó la  $t_{\text{calculada}}$  con la  $t_{\text{teórica}}$  (con  $NC=0,05$  y  $gL=18$ ) y si resulta inferior se concluye que hay robustez entre las temperaturas estudiadas (Rodríguez y Mayo, 2009).

#### **2.6.1.6 Estudio de la robustez del tiempo de incubación**

Según lo descrito en el acápite 2.6.1.4, se seleccionaron los períodos de incubación 36, 48 y 72 h a 35°C. El análisis se realizó según la norma ISO/TR 13843 (2000), que establece que si el coeficiente de variación (CV)  $CV \leq 3-4\%$  en todas las placas, el método es robusto en el intervalo de tiempo estudiado.

#### **2.6.1.7 Evaluación de la proporcionalidad o linealidad (robustez del volumen a inocular)**

Se inocularon volúmenes de 0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 mL de una suspensión diluida de *C. albicans* ATCC 10231 ( $5 \times 10^2$  UFC/mL) sobre la superficie de tres placas de ADS y tres placas de

CromoCen CND-C. Las placas se incubaron por 48 h a 35°C y se ejecutó el recuento de las colonias para cada volumen inoculado. El ensayo se realizó por triplicado. Se determinó el índice de proporcionalidad ( $G_{n-1}^2$ ) y se comparó con el valor de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para  $\alpha=1\%$  y si  $G_{n-1}^2 > \chi^2$ , la linealidad general del método es extremadamente pobre (ISO/TR 13843, 2000).

#### **2.6.1.8 Determinación de la exactitud relativa y selectividad del medio CromoCen CND-C utilizando cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes**

Se estudiaron 505 cepas microbianas: de ellas, 471 de procedencia clínica, aisladas de especímenes biológicos (exudados vaginales y óticos, hemocultivos, entre otros) en los laboratorios de microbiología de hospitales de la capital; 30 cepas de colección del cepario central de BioCen y de la ENCB, IPN (Tabla 2.7) y, además, se incluyeron cepas de otros géneros de levaduras, de aislamientos ambientales, tales como *Rhodotorula* spp. (3) y *Cryptococcus* spp. (1). En la superficie de las placas preparadas con ADS y CromoCen CND-C se inocularon suspensiones de los microorganismos para evaluar las características de las colonias aisladas.

Se calcularon la sensibilidad (SR), especificidad (EsR) y exactitud (ExR) relativas, además de la eficiencia (E) y la selectividad (F), para un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se determinó el estadígrafo Kappa para evaluar la concordancia entre los métodos (ISO 16140, 2003).

#### **2.6.1.9 Estudio de la exactitud relativa del medio CromoCen CND-C en exudados vaginales**

Se realizó un estudio multicéntrico prospectivo en laboratorios de microbiología de hospitales de Ciudad de la Habana, en el período comprendido del 1 de abril al 30 de junio del 2009. Se evaluaron un total de 2208 mujeres, de las cuales a 1391 se les realizaron exámenes directos, por presentar síntomas clínicos característicos de vaginosis. De acuerdo a la positividad de infección vaginal mediante la valoración microscópica y siguiendo los criterios de Nugent (Nugent *et al.*, 1991), se realizó el cultivo a 509 muestras clínicas, y se seleccionaron 410 para el estudio de los parámetros diagnósticos del método cromogénico como técnica de cultivo de aislamiento primario (ISO 16140, 2003) (se excluyeron aquellas muestras que por motivos organizativos, su período de incubación fue superior a las 48 h).

Las muestras se inocularon directamente con el hisopo utilizado en el exudado vaginal, simultáneamente en una placa preparada de ADS, suplementado con cloranfenicol, y en otra con el medio CromoCen CND-C. Los cultivos fueron incubados a 30-35°C hasta 48 h.

**Tabla 2.7.** Microorganismos de referencia utilizados para el cálculo de los parámetros de diagnóstico

Especie	Cantidad	Referencia				
<i>C. albicans</i>	5	ATCC 10231	ATCC 17111	C1-UH/Ca	C3-UH/Ca	C4-UH/Ca
<i>C. glabrata</i>	4	C1-UH/Cgl	C2-UH/Cgl	MX573	MX574	-
<i>C. tropicalis</i>	3	C1-UH/Ct	MX567	MX582	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	3	C1-UH/Cp	MX570	MX571	-	-
<i>C. kefyr</i>	3	C1-UH/Ckf	MX568	MX569	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	3	MX575	MX576	MX577	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	2	MX578	MX579	-	-	-
<i>C. krusei</i>	1	C1-UH/Ckr	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	1	MX584	-	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	1	MX580	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	1	MX583	-	-	-	-
<i>I. orientalis</i>	1	ATCC 6258	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	1	ATCC 9763	-	-	-	-
<i>S. uvarum</i>	1	ATCC 9080	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>30</b>					

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*; MX- ENCB, IPN; C-UH- Colección de la Universidad de la Habana

#### **2.6.1.10 Cálculo de la recuperación relativa total**

Este parámetro se evaluó con 52 muestras de diversas especies de *Candida*, a varias concentraciones (diferentes diluciones y volúmenes de inóculo) e incubadas a distintas temperaturas (Tabla 2.8) y se inocularon en ADS (referencia) y CromoCen CND-C, ejecutando de tres a cinco réplicas por ensayo. Las placas se incubaron por 48 h a 35°C y se realizó el recuento, cuyos valores se clasificaron como: nivel<sub>1</sub> ( $> 30$  UFC/placa) y nivel<sub>2</sub> ( $\leq 30$  UFC/placa). Se determinó la recuperación relativa (%) por nivel y la total según la ISO 11133-2, 2003.

#### **2.6.1.11 Estudio de la equivalencia del método alternativo con respecto al de referencia**

Utilizando los datos del ensayo anterior (acápite 2.6.1.10) y seleccionando los recuentos agrupados en el nivel<sub>1</sub> (30-300 UFC/placa), se evaluó la equivalencia entre los métodos microbiológicos. El análisis se realizó en dos sentidos y con un 10% de desviación máxima aceptable (ISO 17994, 2004).

#### **2.6.1.12 Evaluación de la repetibilidad individual (intra-laboratorio)**

Se realizó según lo descrito en el acápite 2.6.1.4, y tres analistas del mismo laboratorio efectuaron el recuento de las UFC/placa en dos intervalos de tiempo (5-10 min de diferencia). Se procedió al cálculo de la desviación estándar individual (RSD<sub>i</sub>) y se comparó con el valor 0,03, comúnmente recomendado, según la ISO 16140 (2003). Se realizó un análisis de varianza a partir de la determinación de los logaritmos de los recuentos calculando la varianza entre placas (V<sub>SE</sub>) y la varianza dentro de las placas (V<sub>SD</sub>), para la comprobación de la hipótesis que asume que la repetibilidad individual no supera la repetibilidad intra-laboratorio.

#### **2.6.1.13 Estudio de la repetibilidad inter-laboratorios (reproducibilidad media del método)**

Se realizó según lo descrito en el acápite 2.6.1.4, y se efectuó el recuento de las UFC/placa por tres analistas de dos laboratorios. Se calculó la desviación estándar entre los laboratorios (RSD<sub>L</sub>) y se comparó con 0,1, valor comúnmente recomendado, según la ISO 16140 (2003).

#### **2.6.1.14 Determinación de la dispersión de los recuentos según la distribución de Poisson**

Varios analistas, en diferentes momentos, ejecutaron el procedimiento descrito en el acápite 2.6.1.4, generándose un total de ocho corridas experimentales bajo las mismas condiciones. Los recuentos obtenidos por ambos métodos, en cada corrida, fueron procesados para el

**Tabla 2.8.** Muestras utilizadas en el ensayo de recuperación relativa total de CromoCen CND-C

Código de la muestra	Cantidad	Especie	Referencia	Variable
CGL1, CGL1-1, CGL2, CGL2-1	4	<i>C. glabrata</i>	C1-UH/Cgl	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CGU1, CGU2, CGU2-1	3	<i>C. guilliermondii</i>	MX578	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CKF1, CKF2, CKF2-1	3	<i>C. kefyr</i>	C1-UH/Ckf	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CKR1, CKR2, CKR2-1	3	<i>C. krusei</i>	C1-UH/Ckr	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CP1, CP1-1	2	<i>C. parapsilosis</i>	C1-UH/Cp	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CT1, CT1-1, CT2, CT2-1	4	<i>C. tropicalis</i>	C1-UH/Ct	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CA17, CA17-1	2	<i>C. albicans</i>	ATCC 17111	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CA2, CA2-1, ND1, ND2, ND3, ND4	6			Dilución ( $10^{-5}$ y $10^{-6}$ )
RTT1, RTT1-1, RTT2, RTT2-1, RTT3, RTT3-1 RTT4, RTT5, RTT6	9	<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Temperatura de incubación
RV1, RV1-1, RV1-2, RV1-3, RV2, RV2-1, RV3, RV3-1, RV4, RV4-1, RV5, RV6, RV7, RV8, RV9, RV10	16			Volumen de inoculación
<b>Total</b>	<b>52</b>			

Cepas certificadas: ATCC- American Type Culture Collection; MX- ENCB, IPN; C-UH- Colección de la Universidad de la Habana

cálculo de  $\chi^2$  de cada muestra y la total ( $\chi^2_{n-1}$ ). Si  $\chi^2_{n-1} < \chi^2$  teórica (para  $p=0,1\%$ ) el método no provoca una dispersión de los datos superior a la distribución de Poisson (ISO/TR 13843, 2000).

#### **2.6.1.15 Estudio de la sobredispersión de los recuentos paralelos**

A partir de un estudio multi-laboratorios se realizaron 16 evaluaciones independientes empleando *C. albicans* ATCC 10231. Cada laboratorio preparó su propio inóculo definiendo la dilución y el volumen para lograr recuentos entre 30-300 UFC/placa. Se realizaron cinco réplicas utilizando los medios ADS y CromoCen CND-C y posteriormente a la incubación, se efectuó el recuento microbiano de las placas para cada medio de cultivo. Los datos fueron procesados para determinar la sobredispersión, según ISO/TR 13843 (2000).

#### **2.6.1.16 Análisis de la conformidad y la concordancia**

En los medios de cultivo ADS y CromoCen CND-C se inocularon, utilizando el método de estriado hasta el agotamiento del inóculo, 10 réplicas de una suspensión de *C. albicans* procedente de un exudado vaginal. La evaluación se realizó en dos laboratorios diferentes. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 h y se evaluó la recuperación del microorganismo cualitativamente. Se calcularon la conformidad y la concordancia según las recomendaciones de la norma ISO 16140 (2003).

### **2.6.2 Validación del método cromogénico-fluorogénico**

#### **2.6.2.1. Evaluación de los parámetros de inclusividad y exclusividad**

El estudio se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 2.6.1.1, evaluando como parte del método alternativo el empleo del medio de cultivo CromoCen CND-F.

#### **2.6.2.2 Determinación de la exactitud relativa del medio CromoCen CND-F a partir de cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes**

El estudio se realizó con un total de 460 cepas aisladas, entre ellas 30 microorganismos de referencia (Tabla 2.7), y 430 cepas de procedencia clínica y ambiental. Se calculó la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas; eficiencia, selectividad e índice Kappa (ISO 16140, 2003).

#### **2.6.2.3 Estudio de la exactitud relativa del CromoCen CND-F utilizando exudados vaginales**

Se utilizó el esquema expuesto en el acápite 2.6.1.9.

#### **2.6.2.4 Cálculo de la recuperación relativa total del medio CromoCen CND-F**

La recuperación relativa (RR) total del CromoCen CND-F se determinó con respecto a los medios ADS y CromoCen CND-C (expresada en %), utilizando 14 muestras de diferentes especies de *Candida* a varias concentraciones (Tabla 2.9).

Se inoculó un volumen de 0,2 mL en la superficie de las placas y se realizó el ensayo por triplicado. Las placas se incubaron a 35°C durante 48 h, y se efectuó el recuento de las UFC/placa, para cada método. El parámetro se calculó al relacionar la media de los recuentos entre los métodos evaluados según la ISO 11133-2 (2003).

#### **2.6.2.5 Estudio de la equivalencia de los recuentos del CromoCen CND-F con los medios agar dextrosa de Sabouraud y CromoCen CND-C**

Seleccionando los recuentos entre 20 y 200 UFC/placa del ensayo (acápite 2.6.2.4), se determinó la equivalencia entre los métodos: (i) cromogénico-fluorogénico y referencia; utilizando CromoCen CND-F/ADS y (ii) cromogénico-fluorogénico y cromogénico con CromoCen CND-F/CromoCen CND-C. Se ejecutaron los cálculos con 10% de desviación máxima aceptable, según la ISO 17994 (2004).

#### **2.6.2.6 Estudio de la equivalencia entre el recuento colonial con y sin fluorescencia**

Se inocularon 0,2 mL de la suspensión de *C. parapsilosis* ( $5 \times 10^2$  UFC/mL) en la superficie de tres placas del medio CromoCen CND-F. A las 48 h de incubación a 35°C se realizó el recuento de las UFC/placa por tres analistas, a intervalos de 15 min entre lecturas, bajo la luz visible y bajo la luz UV de 366 nm. La equivalencia se determinó utilizando un 1% de desviación máxima aceptable (ISO 17994, 2004).

### **2.7 Evaluación de la factibilidad de producción y empleo de los nuevos diagnosticadores**

La introducción de los nuevos medios en la práctica social y en general en el mercado, se evaluó por sus características funcionales y por un conjunto de criterios técnico-económicos y sociales, tales como: cantidad de especies a identificar o detectar, sencillez y duración del método, costos por concepto de materiales directos, disponibilidad de componentes nacionales, posibilidad de sustitución de importaciones, propósitos y tipos de muestras a ensayar.

### **2.7.1 Evaluación comparativa de la funcionalidad biológica de CromoCen CND-C, con respecto a los medios agar dextrosa de Sabouraud, CHROMagar Candida y Candida ID**

La evaluación microbiológica se realizó con 9 cepas de referencia (Tabla 2.10). Se comparó la capacidad diferencial del CromoCen CND-C (Lote: BAN107/BioCen), con los medios agar dextrosa de Sabouraud (Lote: 2500004/BioCen) y los cromogénicos CHROMagar Candida (Lote: 421/CHROMagar Company) y Candida ID (Lote: CAN2/B01195 201 bioMérieux). La preparación, inoculación e interpretación de los resultados se realizó según las instrucciones de cada fabricante.

### **2.7.2 Comparación de los medios CromoCen CND-C, CromoCen CND-F, CHROMagar Candida y agar Nickerson para el diagnóstico diferencial de *Candida* spp.**

Se seleccionó para el estudio un total de 52 cepas microbianas (Tabla 2.11). La interpretación de los resultados se realizó según las instrucciones de cada fabricante.

### **2.7.3 Efecto económico y análisis de la sostenibilidad productiva de los nuevos diagnosticadores**

Para el estudio se revisaron las fichas de costo-plan de las producciones, elaboradas en el Departamento de Costos y Precios de la Dirección de Economía de BioCen. El cálculo del costo de producción comprende un conjunto de indicadores tales como: materias primas, material de envase, materiales de producción, suministros de operación, facilidades auxiliares, salarios, depreciación, mantenimiento y gastos de administración. A partir de los valores del costo de producción, se establecen los precios de venta de los productos, considerando un margen de ganancia para la institución. Estos últimos datos (precio de venta) son los utilizados para la evaluación económica de los nuevos métodos.

Con vistas al análisis de la factibilidad económica y su impacto para la sustitución de importaciones se compararon los precios de venta de los nuevos diagnosticadores nacionales con los que se ofrecen en el mercado internacional (Anexo B).

Además, se determinó la viabilidad del empleo de los nuevos métodos, al calcular y comparar con el de referencia, los gastos (placas preparadas de medios de cultivo, reactivos, energía, fuerza laboral y tiempo de incubación) para una determinación, siguiendo los pasos establecidos para cada metodología. El costo de una placa preparada se calculó asumiendo que cada una de



**Tabla 2.9.** Muestras utilizadas en el ensayo de recuperación relativa total de CromoCen CND-F

Código de la muestra	Cantidad	Especie	Referencia	Variable
CGL	1	<i>C. glabrata</i>	C1-UH/Cgl	Dilución $10^{-4}$
CD1, CD2	2	<i>C. dubliniensis</i>	MX580	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ )
CA	1	<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Dilución $10^{-5}$
CRR1, CRR1-1, CRT1, CRT1-1	4	<i>C. rugosa</i>	MX583	Dilución ( $10^{-4}$ y $10^{-5}$ ) 2 ensayos
CL	1	<i>C. lusitaniae</i>	MX576	Dilución $10^{-5}$
CKF	1	<i>C. kefyr</i>	MX569	Dilución $10^{-5}$
CT	1	<i>C. tropicalis</i>	ATCC 17111	Dilución $10^{-5}$
CP	1	<i>C. parapsilosis</i>	MX570	Dilución $10^{-4}$
CIR, CIT	2	<i>C. inconspicua</i>	M6B	Dilución $10^{-4}$ , 2 ensayos
<b>Total</b>	<b>14</b>			

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*; MX- ENCB, IPN; C-UH- Colección de la Universidad de la Habana. Cepas aisladas: M- Hospital Ginecobstétrico “Eusebio Hernández”

**Tabla 2.10.** Microorganismos de referencia para la evaluación comparativa de la funcionalidad biológica del CromoCen CND-C con respecto a otros medios de cultivo

Especie	Cantidad	Referencia
<i>C. albicans</i>	2	ATCC 10231 ATCC 17111
<i>C. glabrata</i>	1	C1-UH/Cgl
<i>C. tropicalis</i>	1	C1-UH/Ct
<i>C. parapsilosis</i>	1	C1-UH/Cp
<i>C. kefyr</i>	1	C1-UH/Ckf
<i>C. guilliermondii</i>	1	I-1
<i>C. krusei</i>	1	C1-UH/Ckr
<i>S. cerevisiae</i>	1	ATCC 9763
<b>Total</b>	<b>9</b>	

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*, C-UH- Colección de la Universidad de la Habana. Cepa aislada: I- Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

**Tabla 2.11.** Microorganismos de referencia para la evaluación funcional de cuatro medios cromogénicos

<b>Especie</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Referencia</b>
<i>C. albicans</i>	17	ATCC 10231, ATCC 17111, HLP1, HLP2 HLP3, HLP5, HLP6, HLP7, HLP9, HLP18, HLP25, HLP26, HLP27, HLP31, HLP33, HLP41 HLP3402
<i>C. parapsilosis</i>	10	HLP12, HLP15, HLP11, HLP19, HLP20, HLP23, HLP38, HLP39, HLP24, HLP21
<i>C. lusitaniae</i>	4	M9b, MX575, MX576, MX577
<i>C. tropicalis</i>	3	HLP10, HLP30, HLP36
<i>C. kefyr</i>	2	W16, W17
<i>C. krusei</i>	2	C1-UH/Ckr, P5
<i>C. glabrata</i>	2	M12, HLP16
<i>C. inconspicua</i>	1	M6b
<i>C. guilliermondii</i>	1	H20
<i>C. dubliniensis</i>	1	MX580
<i>R. mucilaginosa</i>	2	B8, B12
<i>S. cerevisiae</i>	2	P15, HLP40
<i>T. asahii</i>	1	HLP3401
<i>T. inkin</i>	1	CQ1
<i>E. coli</i>	2	P14, P17
<i>P. aeruginosa</i>	1	ATCC 27853
<b>Total</b>	<b>52</b>	

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*; MX- ENCB, IPN; C-UH- Colección de la Universidad de la Habana. Cepas aisladas: B- Centro Nacional de Biopreparados, H- Hogar materno del municipio de Boyeros; M- Hospital Ginecobstétrico “Eusebio Hernández”, P- Hogar materno del municipio de Bejucal, W- Hospital Pediátrico “William Soler”, HLP- Hospital Pediátrico “Leonor Pérez”, CQ- Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas

ellas contiene un volumen de 20 mL de medio de cultivo listo para el uso. El costo de la fuerza laboral, en pesos cubanos (CUP), se determinó evaluando el tiempo de trabajo real consumido en el ensayo por el analista del laboratorio con un salario de 2,76 CUP/h). El costo de la energía se estimó sólo para el proceso de esterilización en autoclave (Getinge, Francia), considerando el tiempo de trabajo del equipo (h), el consumo (3,375 kW-h) y el importe unitario de la electricidad para empresas estatales (0,09 CUP/kW-h).

## **2.8 Procesamiento estadístico y cálculo de los parámetros de la validación**

Todos los datos de los resultados experimentales obtenidos en la validación intra- e interlaboratorios del método cromogénico y del método cromogénico-fluorogénico, así como la comparación entre los métodos microbiológicos fueron procesados utilizando el libro de hojas de cálculo en Excel, denominado SmartVal, versión 1.0. (Rodríguez y Mayo, 2009).

En el libro todos los cálculos están automatizados y vinculados con las hojas de los datos primarios. Los indicadores o parámetros a calcular incluyeron los propios de la validación de muestras, los parámetros de calidad "diagnóstica", los calculados a partir de cepas aisladas de muestras, así como los atributos característicos de la incertidumbre de los métodos (Anexo C). El programa toma en cuenta las guías y recomendaciones de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), *Nordic System For Validation of Alternative Methods* (NordVal), *Association Francaise de Normalisation* (AFNOR), ISO 16140, ISO 17994, ISO/TR 13843, otros documentos técnicos de la *International Standards Organization* (ISO), de Eurachem, la *United State Pharmacopeia* (USP), *Food and Drug Agency* (FDA), entre otros.

## **Capítulo 3. Resultados y Discusión**

---

## **CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 Desarrollo de un extracto nutritivo de origen vegetal**

#### **3.1.1 Metodología para la obtención del extracto de batata**

##### **3.1.1.1 Influencia del pH en el proceso de hidrólisis sobre la calidad del extracto de batata**

La evaluación cualitativa de los indicadores de la calidad estudiados para los extractos de batata obtenidos utilizando diferentes valores de pH mostró que las variantes de la 1 a la 4 revelaron la ausencia del almidón y por el contrario, en la variante 5 (control) se detectó su presencia. Entre las características organolépticas se destacó la apariencia de la disolución acuosa del extracto, siendo en las primeras variantes (1-4) ligeramente opalescentes y en la variante 5 muy opalescente, aspecto considerado inaceptable para su empleo en los medios de cultivo. Estos resultados se deben a la acción de la alfa-amilasa, que hidroliza el almidón del sustrato, produciendo dextrinas solubles y oligosacáridos (Hagenimana *et al.*, 1996; Navas, 1999).

En la figura 3.1 se representan los valores obtenidos del contenido de CT y ST de los extractos. Se evidenció la relación directa entre ambos indicadores y la influencia del pH de hidrólisis sobre los mismos, siendo éstos mayores en la variante 1, con un pH de hidrólisis de 6,0.

Teniendo en cuenta que en las variantes 1-4 no hay presencia de almidón, se infiere que los valores registrados de CT están dados a las sustancias solubles (glucosa, maltosa, entre otros oligosacáridos), generadas a partir de la degradación del mismo, aspecto corroborado, a su vez, por la organoléptica de las disoluciones preparadas. Por tanto, se puede predecir que a pH 6,0 se garantiza una mayor disponibilidad de glúcidos solubles para la nutrición microbiana.

Estos hallazgos permitieron establecer, como parámetros del proceso, el pH 6,0 y mantener la temperatura de hidrólisis a 70°C. Sin embargo, era necesario determinar los niveles del agente hidrolizante a utilizar, ya que la concentración de la enzima es un factor fundamental para lograr la eficacia del proceso hidrolítico (Zhurbenko, 2005).

##### **3.1.1.2 Efecto de la concentración de la enzima durante la hidrólisis del extracto de batata**

Al evaluar las características organolépticas en los extractos obtenidos, las más convenientes se lograron en la variante con 0,11 mL de enzima/kg de sustrato, resultando transparente la

disolución del extracto al 2% (p/p), comprobando con ello la solubilidad y, por tanto, la disponibilidad de todos sus componentes nutricionales. Al utilizar concentraciones superiores de la enzima (0,22 mL/kg) la organoléptica del extracto mostró una opalescencia evidente.

Al determinar el contenido de CT en los extractos, se encontraron valores muy similares y superiores al 80%, lo que demuestra que la concentración de la enzima de 0,11 mL/kg de sustrato es suficiente para lograr la degradación del almidón presente en el material vegetal, resultando, a su vez, el proceso hidrolítico más eficiente. En cuanto al cálculo del Nam, se apreció que los valores encontrados resultaron análogos, alcanzando aproximadamente el 0,3%; característicos de productos de origen vegetal, los cuales poseen un bajo contenido de proteínas (Figura 3.2) (Bridson, 1994; Oxoid, 1995). Es válido señalar que la alfa-amilasa no tiene una acción proteolítica sobre las proteínas presentes en el sustrato.

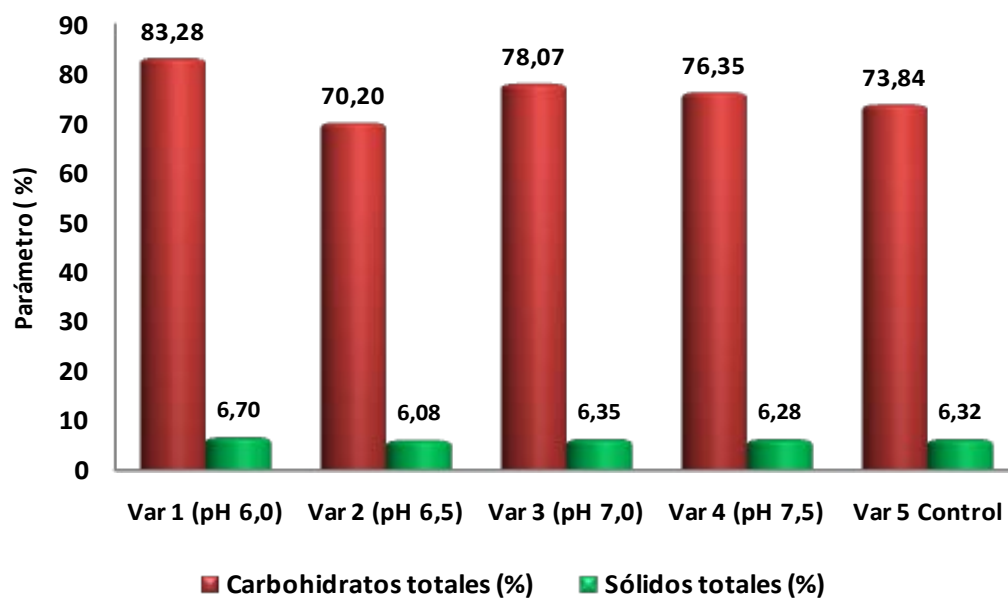
#### **3.1.1.3 Análisis de los métodos para la purificación del extracto de batata**

El proceso de centrifugación no resultó idóneo para la obtención de la base nutritiva con la calidad organoléptica requerida. La disolución del extracto se mostró opalescente, debido a la presencia de partículas insolubles, que no se eliminaron durante la centrifugación, y que obstruyeron significativamente el proceso de filtración, repercutiendo en un gasto excesivo de placas filtrantes y en un mayor costo de producción. En cambio, la combinación de los procesos de separación con el tamizaje en húmedo y la filtración por placas de celulosa posibilitó la eliminación total de los residuos de la cáscara y de las fibras del tejido, logrando una disolución transparente del extracto de batata, obtenido por este procedimiento.

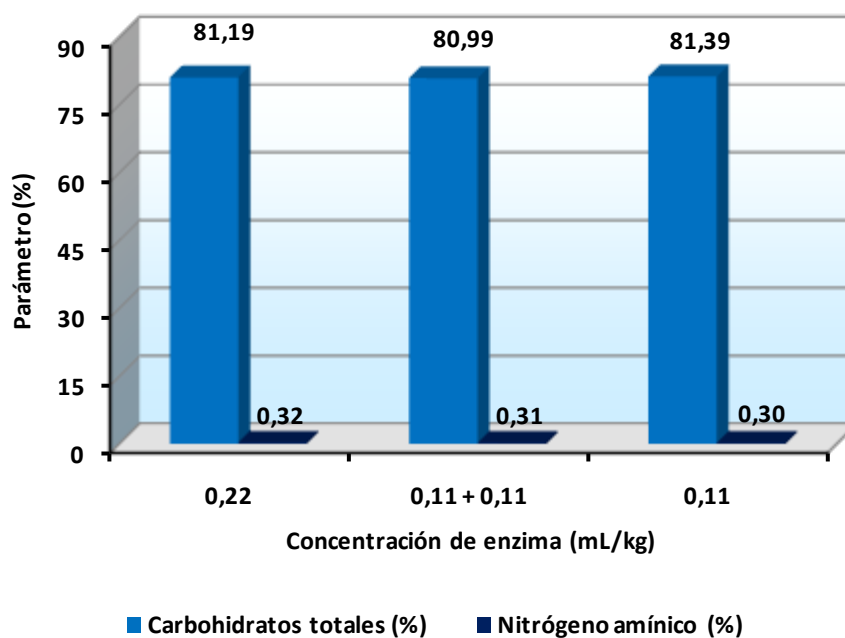
La evaluación organoléptica de los extractos obtenidos, al utilizar diferentes esquemas de purificación, reflejó que el tratamiento por sifón y la clarificación por tamices resultaron más efectivos que la centrifugación.

#### **3.1.2 Desarrollo de un extracto nutritivo a partir del tomate**

La metodología de obtención del extracto de tomate resultó simple hasta alcanzar la etapa de concentración, logrando un producto con un 42,9% de sólidos totales. La disolución acuosa del extracto al 2% (p/p) resultó de color ambár claro, con una apariencia totalmente transparente y brillante, con ausencia de precipitados. El pH de la disolución del extracto mostró un valor de 5,1. Estos indicadores resultaron muy apropiados para la utilización del extracto en calidad de



**Figura 3.1.** Influencia del pH sobre la concentración de sólidos y carbohidratos totales del extracto de batata



**Figura 3.2.** Influencia de la concentración de la enzima sobre los indicadores de calidad evaluados en el extracto de batata

base nutritiva para el cultivo de las levaduras, las cuales se desarrollan favorablemente a pH ácido (Bridson, 1998).

Es necesario señalar algunas dificultades encontradas en la etapa de deshidratación del extracto por aspersión, pues se detectó que el concentrado no facilitó este proceso, lo cual pudiera originarse por la propia naturaleza ácida del material vegetal que facilita la concentración de los glúcidos presentes en forma de mieles.

Es conocido de la bibliografía que para el procesamiento de las mieles (caña de azúcar, remolacha, entre otras) se utilizan operaciones de secado mecánico, posteriores a la extracción de los azúcares. Este procedimiento puede ocasionar la pérdida de nutrientes básicos (vitaminas, sustancias nitrogenadas y minerales) para el cultivo de microorganismos, debido a la eliminación de los solutos en las operaciones de separación y las altas temperaturas utilizadas en el proceso (Bostock, 2009).

El rendimiento final del producto alcanzó un valor de 2,5% con respecto al peso inicial del sustrato vegetal y, a pesar de que está muy relacionado con el elevado contenido de agua en el sustrato, constituye un indicador de la baja eficiencia del proceso.

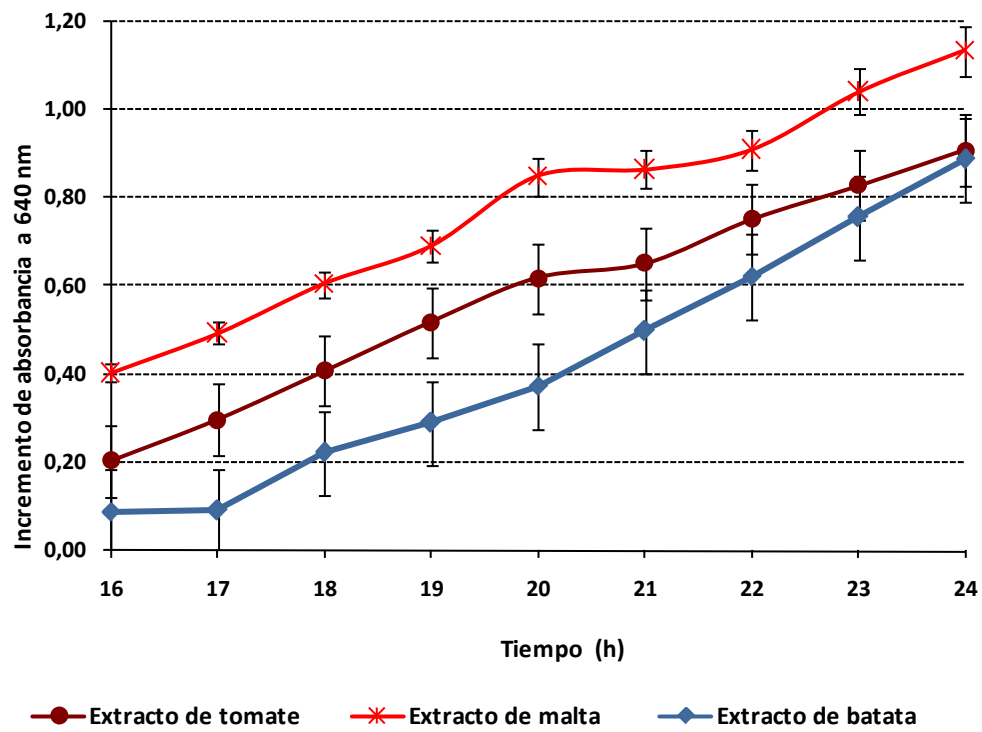
Como resultado de la investigación, se otorgó la patente por la OCPI (No. 23308) al método de obtención y al producto extracto de tomate (Anexo D).

### **3.1.3 Resultados de la evaluación funcional de los extractos nutritivos**

Se encontró que todos los caldos formulados con los extractos de origen vegetal promovieron el crecimiento satisfactorio de la cepa de referencia *C. albicans* (Figura 3.3). Al cabo de las 24 h de cultivo se registró un incremento de la biomasa entre 20 y 35 veces del valor inicial, encontrando las mayores cifras para la formulación que contenía el extracto de malta.

Varios investigadores coinciden en que los extractos de origen vegetal (malta, arroz, harina de maíz, papa, entre otros), empleados para formular medios para el cultivo, aislamiento y mantenimiento de hongos, poseen, entre sus indicadores de calidad, sustancias carbonadas en cantidades superiores al 50% respecto a la masa seca del producto, capaces de proporcionar condiciones de crecimiento precoz y exuberante (Bridson, 1998; Zhurbenko y Rodríguez, 2009).





**Figura 3.3.** Crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 durante el tiempo de incubación utilizando diferentes extractos nutritivos

### 3.1.4 Influencia de los extractos nutritivos en el desarrollo de características cromogénicas y fluorogénicas en composiciones especiales para la identificación de especies de *Candida*

En la tabla 3.1 se aprecia que las especies de *Candida* pueden ser identificadas de acuerdo a sus características culturales. Las tres composiciones formuladas permitieron, a las 48 h de incubación, el crecimiento exuberante de las colonias y el desarrollo de características morfológicas propias de algunas especies evaluadas, como *C. krusei* y *C. parapsilosis*, favorecido por los nutrientes que aportaron los diferentes extractos nutritivos (I-extracto de batata y de tomate, II- extracto de batata y de levadura y III-extracto de malta).

En todos los medios formulados fue posible la identificación de *C. albicans* por su fluorescencia bajo luz UV, indicativa de la actividad galactosaminidasa utilizada en formulaciones comerciales con una sensibilidad superior al 96% (Willinger *et al.*, 1994; Freydiere y Guinet, 1997; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2003). Sin embargo, las especies *C. tropicalis* y *C. kefyr*, que poseen la enzima  $\beta$ -glucosidasa, sólo mostraron coloración azul en las formulaciones I y II. La composición diseñada con extracto de malta (III) inhibió la aparición de reacciones fluorogénicas para *C. tropicalis* a las 48 h y la cromogénica resultó muy débil para *C. kefyr*.

Cooke y col. (2002) intentaron incorporar sustratos cromogénicos en otros medios de cultivo ricos en glúcidos, tales como agar harina de maíz, agar papa y dextrosa, agar extracto de arroz, con el propósito de lograr la diferenciación de especies de *Candida*; sin embargo, los autores encontraron que las formulaciones preparadas no favorecieron el propósito de diseño.

Se logró demostrar que las combinaciones de los extractos de batata, tomate y levadura evaluados no sólo benefician el crecimiento intenso de las especies estudiadas, sino que favorecen la aparición de reacciones cromogénicas y fluorogénicas, confirmando la plena compatibilidad entre dichos extractos y los sustratos estudiados.

Los resultados de este ensayo mostraron la posibilidad de considerar dos alternativas posibles para el desarrollo de una nueva composición especial para la identificación de especies de *Candida*. Es por ello que al tener en cuenta que el tomate es un cultivo que no se cosecha durante todo el año, que requiere de condiciones especiales (temperaturas de refrigeración) para su almacenamiento, además de las dificultades encontradas durante el proceso de

**Tabla 3.1.** Identificación de las especies de *Candida* ensayadas en los medios formulados con diferentes extractos nutritivos

Especie	Medio	Características de las colonias		
		Color		Fluorescencia a 366 nm
		Azul	Blanco	
<i>C. albicans</i> <sup>a</sup>	I	-	+	+
	II	-	+	+
	III	-	+	+
<i>C. tropicalis</i>	I	+	-	+
	II	+	-	+
	III	-	+	-
<i>C. glabrata</i>	I	-	+	-
	II	-	+	-
	III	-	+	-
<i>C. kefyr</i>	I	+	-	-
	II	+	-	-
	III	+/-	-	-
<i>C. krusei</i>	I	-	+	-
	II	-	+	-
	III	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	I	-	+	-
	II	-	+	-
	III	-	+	-

(<sup>a</sup>): se evaluaron las cepas ATCC 10231 y ATCC 17111, (+): respuesta positiva, (-): respuesta negativa, (+/-): débil intensidad, (I): extracto de batata y extracto de tomate, (II): extracto de batata y extracto de levadura, (III): extracto de malta

deshidratación del extracto de tomate, se decide seleccionar la combinación del extracto de batata y de levadura para las nuevas composiciones cromogénicas y fluorogénicas.

### **3.1.5 Obtención a escala industrial de la base nutritiva a partir de *Ipomoea batatas***

Se logró la fabricación consistente de tres lotes industriales del extracto de batata (5020000, 5030000 y 5040000), y se definieron los parámetros del proceso de hidrólisis y purificación en el esquema tecnológico (Figura 3.4). El rendimiento del producto fue adecuado y estable entre los lotes y resultó como promedio  $50,34 \pm 7,96\%$  con respecto al peso seco de la raíz reservante.

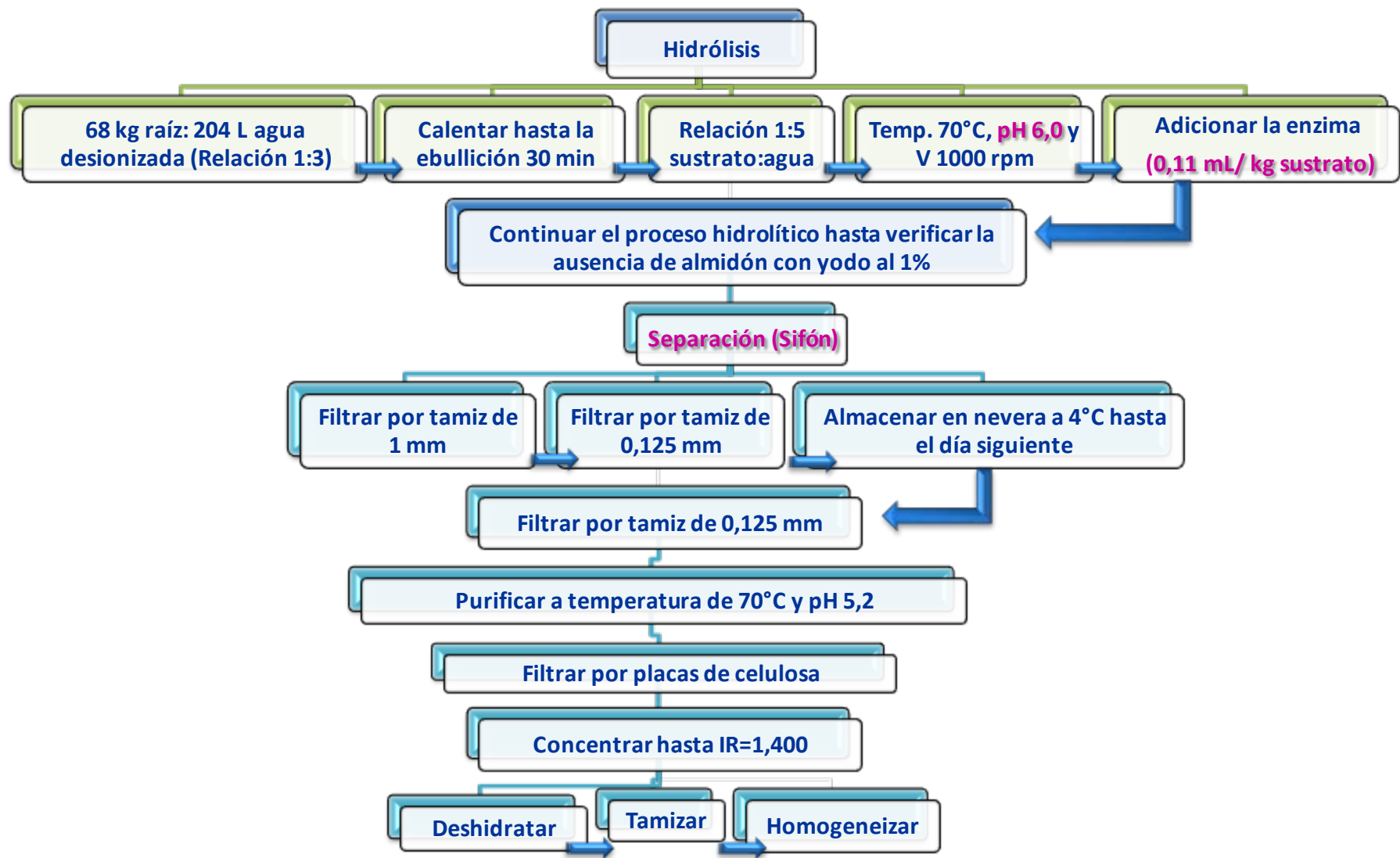
La introducción del nuevo producto se acompañó con la ejecución de toda la documentación que exige el Sistema de Calidad, ISO 9001:2000. Los lotes fueron liberados al verificar que cumplieron satisfactoriamente con todos los indicadores de calidad establecidos en la especificación (Anexo E).

#### **3.1.5.1 Resultados del análisis organoléptico y físico-químico**

La evaluación de los tres lotes industriales de extracto de batata, obtenidos según el esquema tecnológico definido, permitió afirmar que se obtuvo un polvo fino, altamente higroscópico, homogéneo, fluido, sin grumos y sin partículas extrañas, fácilmente soluble en agua y su disolución al 2% (p/p) resultó de color amarillo, transparente y brillante, evidenciándose con ello las características organolépticas propias de las bases nutritivas (Zhurbenko, 2005; Zhurbenko y Rodríguez, 2009).

La elevada solubilidad y la transparencia de la disolución acuosa del extracto nutritivo son aspectos favorables para una base nutritiva. La primera garantiza la disponibilidad de todos sus nutrientes disueltos en el medio de cultivo para ser asimilados por los microorganismos mediante los procesos de difusión celular y la segunda es muy conveniente para la formulación de caldos, donde la aparición de turbiedad es un indicador del crecimiento microbiano.

El valor medio de los indicadores físico-químicos de calidad que caracterizan los lotes industriales del extracto de batata se presentan en la tabla 3.2. La pérdida por desecación resultó  $3,03 \pm 0,24\%$ , inferior al 7%, requisito de calidad para este tipo de productos altamente higroscópicos, lo que propicia una mayor estabilidad durante su conservación. Se destaca el elevado contenido de carbohidratos totales de  $58,06 \pm 2,76\%$  y la ausencia de almidón, demostrando la eficiencia del proceso de hidrólisis con la alfa amilasa. Se distinguió el elevado



**Figura 3.4.** Tecnología industrial para la producción del extracto de *Ipomoea batatas*

V: velocidad de agitación, IR: índice de refracción

contenido de triptófano libre de 0,14%, esencial para determinadas funciones metabólicas en el desarrollo microbiano. El contenido de cloruros (como NaCl) ( $1,53 \pm 0,08\%$ ), inferior al 9% (límite máximo), no ejerce efecto inhibitorio sobre el crecimiento microbiano y resulta beneficioso como regulador del equilibrio osmótico en el medio. Aunque el contenido de nitrógeno total (Nt) es bajo, propio de los extractos vegetales, el porcentaje de nitrógeno amínico (Nam) coincidió con el del Nt ( $0,23 \pm 0,01\%$ ), para un 100% de su relación, no alcanzada en otras bases de origen vegetal conocidas (Bridson, 1998; Millan *et al.* 2002; Rodríguez *et al.*, 2004; Zhurbenko, 2005).

Se logró obtener, por primera vez, un extracto con una capacidad amortiguadora idéntica frente a ácidos y álcalis e igual a  $0,37 \pm 0,01$ , muy apropiada para los medios que contienen sustancias que, al ser utilizadas por los microorganismos, generan metabolitos que alteran el pH del medio. El análisis del contenido de macro- y micro-nutrientes (Tabla 3.3) mostró que el extracto de batata contiene (en 100 g) K, Na, P y fosfato ( $P_2O_5$ ) en porcentajes entre 1,17 y 1,93. Las concentraciones de Ca, Mg y Zn fueron de 301, 227 y  $3,33 \mu\text{g/g}$ , respectivamente; y el resto de los elementos (Mn, Cu, Co, Pb y Cd) se mantuvo por debajo de  $0,1 \mu\text{g/g}$  del producto.

Los minerales encontrados en el extracto contribuyen al crecimiento de diversas especies microbianas, por su acción como cofactores enzimáticos, entre otras funciones biológicas que los mismos desempeñan dentro del medio de cultivo. Se destacan las elevadas concentraciones de Ca, Na, K y P, entre 2 y 19 veces superiores a las reportadas para otros extractos de origen vegetal como, por ejemplo, para el extracto de malta (Bridson, 1994 y 1998).

#### **3.1.6.2 Resultados del análisis microbiológico**

Los indicadores de la reactividad biológica resultaron adecuados, corroborándose la presencia de carbohidratos fermentables y de los aminoácidos esenciales: triptófano, cistina y cisteína (Tabla 3.4). La existencia de triptófano libre coincide con los datos cuantitativos (Tabla 3.2), y se evidenció por la producción de indol por *E. coli*, como control positivo de la prueba, como resultado de su actividad triptofanasa y no se observó en el caso de *E. aerogenes* ensayado como control negativo.

**Tabla 3.2.** Indicadores de calidad del extracto de *Ipomoea batatas*

Indicador	Valor medio $\pm$ DE
Pérdida por desecación, %	3,03 $\pm$ 0,24
Contenido carbohidratos totales, %	58,06 $\pm$ 2,76
Presencia de almidón	No
Contenido de triptófano, %	0,14
Contenido de cloruros (NaCl), %	1,53 $\pm$ 0,08
Contenido de nitrógeno amínico, %	0,23 $\pm$ 0,01
Contenido de nitrógeno total, %	0,23 $\pm$ 0,01
Relación nitrógeno amínico/nitrógeno total, %	100
pH de la disolución acuosa al 2% (p/p)	5,14 $\pm$ 0,11
Capacidad buferante frente a los ácidos	0,37 $\pm$ 0,01
Capacidad buferante frente a los álcalis	0,37 $\pm$ 0,01
Color de la disolución al 2% (p/p)	Amarillo
Rendimiento industrial, %	50,34 $\pm$ 7,96

Valor medio de los resultados obtenidos en los tres lotes industriales, DE: desviación estándar

**Tabla 3.3.** Composición de macro- y micro- elementos en el extracto de batata

Elemento	K	Na	P	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ca	Mg	Zn	Mn	Cu	Co	Pb	Cd
Unidad	(%)				(μg/g)							
Media	1,90	1,93	0,37	1,17	301	227	3,33	menor de 0,1				
Desviación estándar	0,20	0,15	0,02	0,06	2	30	1,04					

**Tabla 3.4.** Reactividad biológica del extracto de *Ipomoea batatas*

Microorganismo	Prueba funcional			
	Producción de indol	Producción de H <sub>2</sub> S	Producción de AMC	Carbohidratos fermentables
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Positivo (CP)	Negativo (CN)	Negativo (CN)	Positivo (CP)
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	Negativo (CN)	-	Positivo (CP)	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	-	Positivo (CP)	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	-	-	-	Negativo (CN)

CP: control positivo, CN: control negativo, (-): no procede el ensayo, AMC: acetilmetilcarbinol, H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrógeno

Se detectó la presencia de aminoácidos sulfurados (cistina y cisteína), considerados indispensables para soportar las funciones que desempeñan en el crecimiento microbiano, mediante la prueba de producción de sulfuro de hidrógeno con *S. Typhimurium*.

La valoración cualitativa de carbohidratos fermentables coincidió con los resultados encontrados en la tabla 3.2 (contenido de CT) y resultó positiva para *E. coli*, microorganismo utilizado como control positivo. La presencia de glúcidos en el extracto de batata resulta muy conveniente, pues éstos actúan como fuentes nutritivas que aportan energía al cultivo microbiano, característica muy generalizada en otros extractos vegetales (Bridson, 1994).

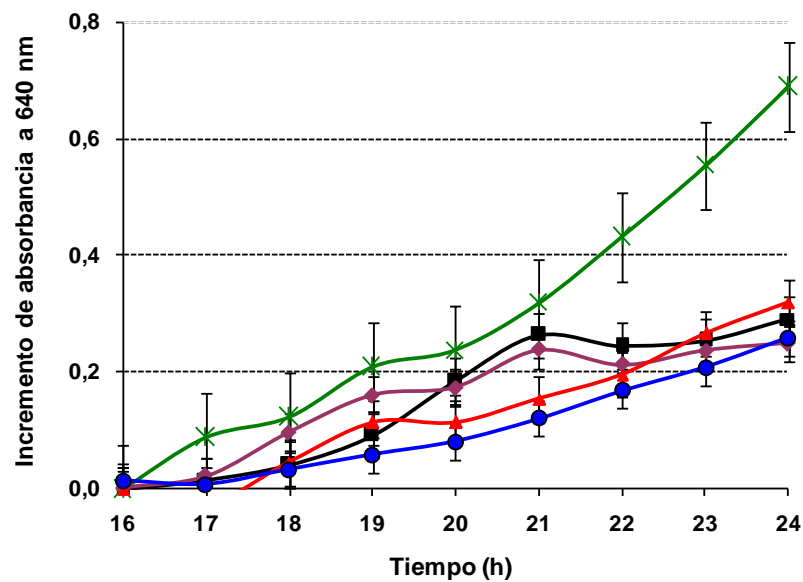
Se manifestó un elevado grado de hidrólisis de las proteínas presentes en la raíz reservante, según la prueba de acetilmetilcarbinol, que resultó positiva para *E. aerogenes*. Estos hallazgos, indican una muy favorable calidad nutricional del extracto para el cultivo microbiano.

Al comparar la funcionalidad biológica del extracto de batata con la de otras bases nutritivas comerciales de distintos orígenes proteicos, tales como caseína, soya, músculo animal y levadura; el nuevo extracto proporcionó un incremento de biomasa significativamente superior para las cepas de colección *C. albicans* ATCC 17111 y ATCC 10231 (Figura 3.5), alcanzando ambas especies valores de biomasa que duplicaron la concentración inicial de inóculo microbiano durante un período de 24 h de cultivo. Este resultado está asociado a la presencia, en el extracto de batata, de sustancias carbonadas y a la variedad de elementos minerales, que actúan como cofactores enzimáticos en la degradación de los glúcidos, los cuales favorecen los requerimientos nutricionales de las levaduras (Bridson, 1998; Zhurbenko y Rodríguez, 2009).

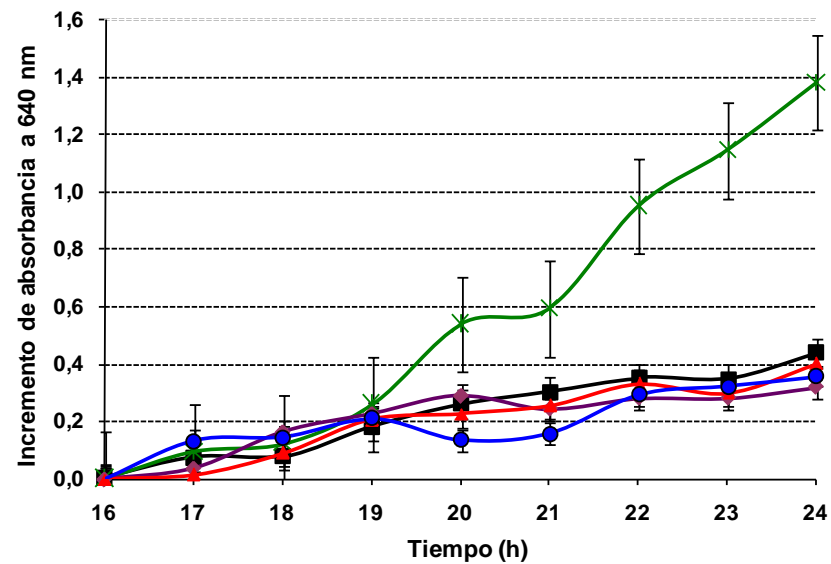
En publicaciones anteriores se ha divulgado el uso de extractos vegetales con el fin de inhibir bacterias y hongos, por el contenido de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles, taninos y flavonoides) en diversos órganos, en especial en las raíces, como en el caso de *I. batatas* (Hernández *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Este resultado pone de manifiesto que el proceso de obtención del extracto de batata elimina los inhibidores microbianos presentes en la raíz, reportados por In-Chang y col. (2004) y Decker y Jaenicke (2004).

El extracto obtenido posee indicadores de calidad que lo convierten en una excelente base nutritiva capaz de garantizar el crecimiento de *Candida*. Su novedad fue reconocida por el certificado de autor de patente No. 23507, otorgado por la OCPI (Anexo D).





(a)



(b)

—■— Triptona    —◆— Peptona de soja    —●— Peptona micológica    —×— Extracto de batata    —▲— Extracto de levadura

**Figura 3.5.** Crecimiento de dos cepas de *Candida albicans* (a) ATCC 10231 y (b) ATCC 17111 en medios simples formulados con la nueva base nutritiva y con otras existentes en el mercado

### 3.2. Desarrollo a ciclo completo del medio cromogénico

#### 3.2.1 Funcionalidad microbiológica de composiciones cromogénicas

Se encontró que los medios ensayados permitieron el crecimiento satisfactorio de las especies de *Candida*, incluso a las 36 h de incubación, y posibilitaron su diferenciación al considerar las características cromogénicas y la morfología desarrolladas por las colonias (Tabla 3.5).

La primera variante posibilitó detectar *C. albicans* y *C. parapsilosis* por el color amarillo de las colonias que difunde a su alrededor, debido a la acción de la enzima aminopeptidasa que actúa sobre la L-prolina del sustrato cromogénico. Varios sistemas para la identificación rápida de *C. albicans*, diseñados con el fin de detectar esta actividad enzimática, muestran valores de sensibilidad por encima del 80% (Gundes *et al.*, 2001; Umabala *et al.*, 2002). La segunda formulación permitió identificar *C. tropicalis* y *C. kefyr* por la coloración rosada de las colonias, destacando en esta última, una mayor intensidad del color.

Al considerar los demás ingredientes se resalta la presencia ventajosa del desoxicolato de sodio (agente bacteriostático), ya que se evita la esterilización del medio en el autoclave y, con ello, se previene la descomposición de los sustratos cromogénicos termolábiles, garantizando una mayor estabilidad al medio de cultivo preparado. Así mismo, se reconoce la incorporación de las sales  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  que, además de su efecto amortiguador reconocido en varias composiciones, son fuentes de macro- y micro- elementos, tales como: el potasio, conocido activador de varias enzimas que interviene en el proceso de formación de proteínas, el fósforo, elemento esencial en el metabolismo energético por su presencia en las moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) y el magnesio que, al combinarse con el ATP, participa en numerosas reacciones metabólicas (Merchant y Packer, 1975; Konemam, 1997).

Se corroboró, una vez más, que los extractos que componen el medio nutritivo (extracto de batata y de levadura) son compatibles con los sustratos cromogénicos y favorecen su acción, logrando visualizar su efecto, tanto en la colonia, como alrededor de ésta.

#### 3.2.2 Resultados de la evaluación microbiológica de formulaciones que combinan los sustratos cromogénicos con el glicerol

En la tabla 3.6 se muestran los resultados de la evaluación microbiológica de las formulaciones con glicerol frente a diferentes especies de *Candida*. La identificación de *C. albicans* fue posible

**Tabla 3.5.** Características de diferentes especies de *Candida* ensayadas en dos composiciones preliminares cromogénicas y fluorogénicas

Especie	Medio	Color de la colonia			Morfología
		Amarillo	Rosado	Blanco	
<i>C. albicans</i>	V1	-	-	+	redonda, lisa y con brillo
	V2	+	-	-	
<i>C. tropicalis</i>	V1	-	-	-	redonda, lisa y opaca
	V2	-	-	+	
<i>C. glabrata</i>	V1	-	-	+	redonda, lisa y con brillo
	V2	-	-	+	
<i>C. kefyr</i>	V1	-	-	-	redonda, lisa y con brillo
	V2	-	-	+	
<i>C. parapsilosis</i>	V1	-	-	+	redonda, bordes regulares y superficie rugosa
	V2	+	-	-	

V1: contiene L-Pro, V2: contiene Ros-glc, (+): respuesta positiva, (-): respuesta negativa

**Tabla 3.6.** Resultados de la evaluación microbiológica de las formulaciones con glicerol

Especie	Medio	Color de la colonia			Morfología
		Azul	Rosado	Blanco	
<i>C. albicans</i>	V3	+/-	-	-	redonda, lisa y con brillo
	V4	+	-	-	
	V5	-	-	+	
<i>C. tropicalis</i>	V3	-	+	-	redonda, lisa y opaca
	V4	+	-	-	
	V5	-	-	+	
<i>C. glabrata</i>	V3	-	-	+	redonda, lisa y con brillo
	V4	-	-	+	
	V5	-	-	+	
<i>C. kefyr</i>	V3	-	+	-	redonda, lisa y con brillo
	V4	-	-	+	
	V5	-	-	+	
<i>C. krusei</i>	V3	-	-	+	bordes irregulares, plana y opaca
	V4	-	-	+	
	V5	-	-	+	
<i>C. parapsilosis</i>	V3	-	-	+	redonda, bordes regulares y superficie rugosa
	V4	-	-	+	
	V5	-	-	+	

V3: contiene X-gal y Ros-glc, V4: contiene X-glu, V5: medio control, no contiene sustratos, (+): respuesta positiva, (-): respuesta negativa, (+/-): débil intensidad

en las variantes V3 y V4, sobre la base de las actividades galactosaminidasa y glucosaminidasa presentes en dicha especie. No obstante, se observó que la composición (V3), que contiene el sustrato de galactosaminidina (X-gal), mostró una coloración azul pálida de las colonias, lo cual no refleja con facilidad la propiedad enzimática de la especie de interés. Es por ello que, actualmente, varias de las composiciones comerciales para la identificación de *C. albicans*, sobre la base de detectar la actividad galactosaminidasa, emplean el sustrato fluorogénico MU-gal que resulta más eficiente que el cromogénico X-gal (Manafi y Willinger, 1991; Freydiere y Guinet, 1997; Paugan *et al.*, 1999; Umabala *et al.*, 2002; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2003).

La respuesta enzimática de *C. albicans* frente al sustrato cromogénico glucosaminidina (X-glu) en V4 fue positiva y superior en cuanto a la intensidad del color (azul intenso). Por esta razón, dicho sustrato se utiliza con mayor éxito en las composiciones de Candida ID y Candida ID2 (bioMérieux), superando la respuesta del medio Albicans ID en la identificación de *C. albicans* (Campbell *et al.*, 1999; Paugam *et al.*, 1999; Freydiere *et al.*, 2000; Fricker-Hidalgo *et al.*, 2001).

Las colonias de *C. tropicalis* y *C. kefyr* mostraron una coloración rosada en la V3, relacionada con el radical Ros (color rosado), del sustrato glucopiranosido, utilizado por ambas especies. Al mismo tiempo, se apreció que las colonias de *C. tropicalis* en V4 manifestaron un color azul claro, lo que indica que la composición facilitó la actividad hexosaminidasa de dicha especie.

Otras especies evaluadas, tales como *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata*, a pesar de que no respondieron frente a ninguno de los sustratos incorporados (todas de color blanco), fueron identificadas por sus características morfológicas, resultando las colonias de *C. krusei* planas, algodonosas y de bordes irregulares, mientras que las colonias de *C. parapsilosis* mostraron superficie rugosa y estrellada con bordes redondos definidos.

La acción del glicerol como suplemento nutricional en las composiciones cromogénicas reveló una influencia favorable en las características morfológicas y provocó una mayor intensidad del color de las colonias, facilitando la diferenciación de las especies de *Candida*. Esta sustancia constituye una fuente de carbono y energía disponible y beneficiosa para el adecuado desarrollo de las levaduras. Además, su efecto sobre la acentuación del color de las colonias ha sido valorado, al considerar su utilidad en determinados medios de cultivo, tales como agar cetrimida, agar Wort, entre otros, específicamente para la producción de pigmentos por

microorganismos no fermentadores, como es el caso de la piocianina en *P. aeruginosa* y en organismos productores de esporas, como *Aspergillus*, *Bacillus*, entre otros géneros (Kiska y Gilligan, 2003; Ronald, 2005).

Por último, del glicerol se ha divulgado su propiedad osmoprotectora, no sólo aprovechada para la crioconservación de las cepas microbianas, sino también en procesos de fermentación a gran escala de levaduras con propósitos industriales, actuando como un regulador del estrés fisiológico de la célula levaduriforme y posibilitando con ello una mayor recuperación del microorganismo durante el cultivo (Kiska y Gilligan, 2003; Galvagno y Cerrutti, 2004).

### **3.2.3 Efecto inhibitorio de la combinación del desoxicolato de sodio y el ácido nalidíxico**

El estudio reflejó que la combinación del desoxicolato de sodio (0,5 g/L) con el ácido nalidíxico, en las concentraciones ensayadas (0,01; 0,03 y 0,05 g/L), lejos de provocar la inhibición del crecimiento de las cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* e *I. orientalis*) benefició el desarrollo colonial, resultando las mismas de mayor tamaño (1-3 mm) y consistencia. Específicamente, las colonias de *I. orientalis* (teleomorfo de *C. krusei*), a pesar de ser aplanadas, manifestaron un color blanco opaco, con una apariencia algodonosa en su superficie y periferia.

Por otro lado, las sustancias adicionadas al medio, en las cantidades analizadas, inhibieron totalmente el crecimiento de las bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y Gram-negativas (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. flexneri*, *P. vulgaris* y *S. Typhimurium*), excepto *P. aeruginosa*, hallazgo que resulta favorable, si se tiene en cuenta la posible concomitancia con algunas especies de *Candida* en diferentes localizaciones. Por ejemplo, se estima que las otitis externas constituyen entre el 5 y el 20% de las consultas otológicas; la mayoría de las de etiología bacteriana son ocasionadas principalmente por *Pseudomonas* y otras son atribuidas a hongos (15-20%) (Al-Asaaf y Farhan, 2000; García-Martos *et al.*, 2001).

Comúnmente en varios medios de cultivo, incluso en composiciones cromogénicas, se emplean antibióticos individuales o combinados, tales como la gentamicina, cloranfenicol, estreptomycin, penicilina, entre otros (Ronald, 2005; Nagano *et al.*, 2008, 2010), con el objetivo de crear condiciones selectivas, específicamente para suprimir la microbiota bacteriana durante el cultivo. Las placas preparadas con estos medios cromogénicos con antibióticos, muestran

períodos de vida útil que no exceden las 2 semanas. El empleo de otros agentes bacteriostáticos, divulgado con éxito en composiciones diseñadas para *Candida* spp., como es el caso del sulfito de sodio, el citrato de amonio y bismuto, la rosa de bengala y el TTC; provoca la aparición de colores en las colonias durante el cultivo, lo que pudiera interferir con las reacciones cromogénicas.

Recientemente, Moore y col. (2009) demostraron la posibilidad de incorporar en el ADS el nitrato de galio (III) con el objetivo de lograr el aislamiento selectivo de hongos de importancia clínica. Los inconvenientes de este proceder se relacionan con la sensibilidad al calor del agente químico, que debe ser adicionado después de la esterilización del medio de cultivo, y que, además, el medio no logra inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* y *Burkholderia cenocepacia*.

#### **3.2.4 Resultados de la evaluación de la composición cromogénica enriquecida con una mayor concentración del extracto de batata**

La composición del medio cromogénico con una mayor concentración del extracto de batata (20 g/L), junto a los demás ingredientes, y el valor del pH seleccionado (6,6), favorecieron la identificación de las especies de *Candida*, al incrementar la intensidad de las reacciones cromogénicas (Tabla 3.7).

En particular, *C. albicans* mostró un color verde o verde-azul, muy bien diferenciable del resto de las especies; *C. tropicalis* resultó de color azul y *C. kefyr* se caracterizó por una coloración rosada violácea; mientras que *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* resultaron blancas, logrando sólo la diferenciación de esta última por su típica morfología colonial.

Al determinar la relación de los recuentos obtenidos entre el medio cromogénico con respecto al medio de referencia, se encontró una recuperación del 91,9%, valor superior al establecido (> 70%) en la norma ISO/TR 11133-02 (2003) para medios de cultivo selectivos y diferenciales. Estos resultados confirmaron que el medio cromogénico garantiza con éxito la recuperación y el desarrollo de todas las especies evaluadas.

La composición cromogénica, que cumplió con los requisitos previstos del diseño, resultó: extracto de batata 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, desoxicolato de sodio 0,5 g/L, ácido nalidíxico 0,03 g/L, X-glu 0,1 g/L, Ros-glc 0,1 g/L, glicerol 10 mL/L y agar 15 g/L. Para esta composición se otorgó el certificado de autor de patente por la

OCPI No. 23499, logrando una formulación selectiva para el cultivo y la diferenciación de las especies de *Candida* de mayor importancia clínica (Anexo D).

### **3.2.5 Resultados de la producción a escala industrial del medio cromogénico y su suplemento**

Se logró la fabricación a escala industrial de tres lotes de la Base de Medio CromoCen CND-C (8010000, 8020000 y 8030000), en la Planta de Producción de Medios de Cultivo de BioCen, cuyas evaluaciones de calidad posibilitaron comprobar los parámetros de fabricación y demostrar la consistencia entre los lotes. Los resultados de los indicadores del pH y la pérdida por desecación, que se muestran en la figura 3.6, evidencian la reproducibilidad de los lotes fabricados con resultados satisfactorios.

El valor del pH coincidió en los tres lotes (6,7) y se encontró dentro del intervalo de 6,4 a 6,8, establecido en la especificación. Según Zhurbenko (2005), el valor de pérdida por desecación inferior al 7% resulta un requisito de calidad fundamental para este tipo de producto altamente higroscópico. Los bajos valores de humedad permiten una mayor estabilidad del producto durante su conservación, evitando la interacción química y la degradación de sus componentes. Tales indicadores son considerados como elementos críticos al realizar la evaluación preliminar físico-química de los medios de cultivo y, a su vez, determinan la vida útil de los mismos.

Por otro lado, se logró la fabricación industrial de tres lotes del Suplemento Glicerol (9010000, 9020000 y 9030000), siendo su presentación final en bulbos de 5 mL, que contienen el producto no estéril para ser añadido a 500 mL de la base del medio de cultivo restituida.

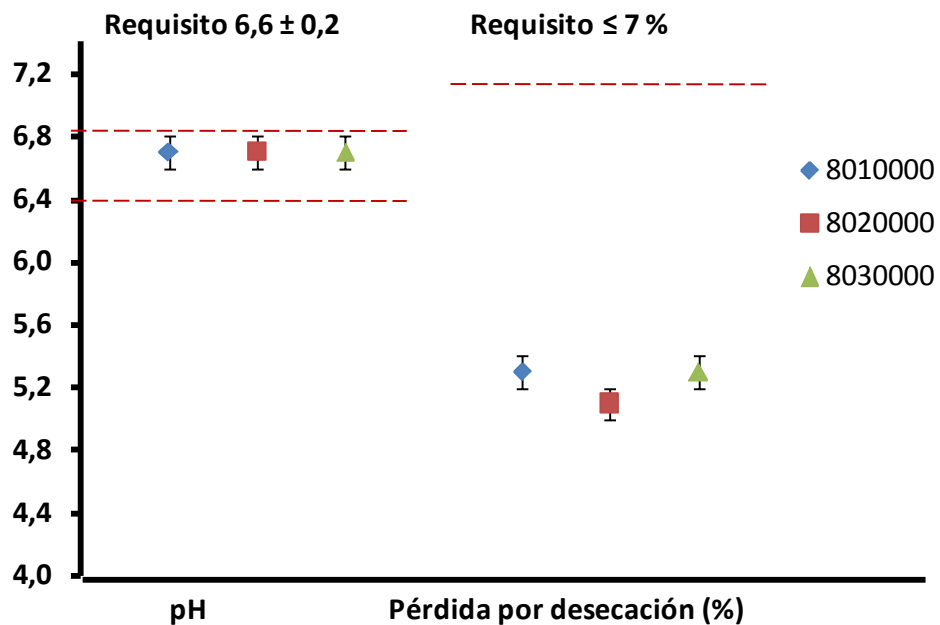
La evaluación de los principales indicadores de calidad de los tres lotes fabricados resultó conforme con lo establecido en la especificación del producto, siendo la apariencia, el color del producto y el volumen contenido los elementos críticos del ensayo. Los resultados de la evaluación revelaron características de un líquido ligeramente viscoso, incoloro y transparente, manteniendo el volumen de 5 mL por bulbo. Con ello se demostró la consistencia entre los lotes obtenidos y su valoración satisfactoria facilitó la liberación del producto y la aprobación de su introducción en la industria.

El estudio de estabilidad en anaquel de los tres lotes del medio de cultivo y su suplemento mostraron resultados satisfactorios al evaluar los indicadores de calidad organolépticos, físicos, químicos y microbiológicos, por lo que las evaluaciones continuarán según el cronograma

**Tabla 3.7.** Recuperación relativa del crecimiento de las especies de *Candida* en la composición cromogénica

Especie	Recuperación (%)	Características culturales de las colonias	
		Color	Morfología
<i>C. albicans</i>	81,8	verde	abultada, redonda y lisa
<i>C. tropicalis</i>	97,1	azul	abultada, redonda y lisa
<i>C. glabrata</i>	87,0	blanco crema	abultada, redonda, lisa y brillante
<i>C. kefyr</i>	90,8	rosado violáceo	abultada, redonda, lisa y brillante
<i>C. krusei</i>	79,7	blanco opaco	aplastada, bordes irregulares
<i>C. parapsilosis</i>	101,6	blanco	rugosa, bordes regulares
<i>C. guilliermondii</i>	105,4	rosado pálido	abultada, redonda y lisa
<b>Media <math>\pm</math> S<sub>0</sub></b>	<b>91,9 <math>\pm</math> 9,83</b>		

S<sub>0</sub>: desviación estándar



**Figura 3.6.** Evaluación del pH y la pérdida por desecación de tres lotes industriales de la Base de Medio CromoCen CND-C



propuesto. Hasta el momento queda aprobado un período de validez de 24 meses para el medio de cultivo y 48 meses para el suplemento.

La evaluación de las placas preparadas con CromoCen CND-C, durante 30 días, resultó conforme, lo que garantiza a los laboratorios conservar pequeños lotes de MLPU con el propósito de facilitar el análisis continuo de las muestras clínicas (Anexo F).

Los informes de análisis (AC 0160), la notificación de la liberación de los tres lotes fabricados del medio de cultivo (AC 0291) y su acta de aprobación de la introducción (AC 2842) se encuentran en el anexo G. Estos documentos acreditan la posibilidad de realizar producciones en serie de los prototipos y ubicarlos en la línea de productos especiales de la marca CromoCen® para el diagnóstico microbiológico.

### **3.2.6 Desempeño del medio de cultivo cromogénico y su suplemento en laboratorios externos**

La información recopilada de la evaluación externa del desempeño y la funcionalidad biológica del medio CromoCen CND-C, en los hospitales de la capital, abarcó un total de 180 especímenes clínicos, aislados de diferentes orígenes en pacientes con infecciones fúngicas (Tabla 3.8).

La distribución de colores y las características morfológicas que exhibieron las colonias aisladas en CromoCen CND-C permitieron realizar, en un período máximo de 48 h, la detección y diferenciación de las especies de *Candida* causales de la infección. El medio logró la identificación de todos los aislamientos de *C. albicans* (la más frecuente) n=66 (37%), *C. tropicalis* n=17 (9%), *C. krusei* n=11 (6%) y *C. kefyr* n=4 (2%) (Tabla 3.9). Cabe aclarar que las colonias que desarrollaron color verde a verde azul fueron identificadas presuntivamente como *C. albicans*, ya que *C. dubliniensis*, a pesar de no encontrarse en ninguna de las muestras evaluadas, debe manifestar igual coloración.

Por demás, el medio cromogénico mostró, para otras cepas aisladas, la presencia de una gama de colores, entre blanco, crema y rosado pálido, que no permitió llegar a un resultado concluyente en cuanto a la identificación del agente causal. No obstante, las características de aspecto y textura, desarrolladas por ciertas colonias aportaron la información adicional necesaria para la correcta identificación de algunas cepas de *C. parapsilosis*, resultando éstas de color blanco, pero con superficie rugosa y estrellada. Para esta especie se indica, en varias publicaciones, la evidencia de su polimorfismo, por lo cual se han realizado investigaciones

**Tabla 3.8.** Muestras clínicas procesadas por diferentes laboratorios evaluadores

Muestra procesada	H. Pediátrico "Leonor Pérez"	Hospital C-Q "Hermanos Ameijeiras"	H. Militar "Dr. Luis Díaz Soto"	H. Pediátrico "William Soler"	H. Pediátrico "Juan Manuel Márquez"	H. Ginecobstétrico "Ramón González Coro"	Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas	Total
Vaginal	37	-	24	3	2	8	3	77
Hemocultivo	-	30	-	-	-	-	-	30
Ótico	13	-	11	3	1	-	1	29
Coprocultivo	-	-	-	13	-	-	-	13
Catéter arterial	-	4	-	-	-	1	1	6
Fibrosis quística	-	-	-	-	6	-	-	6
Lesión piel, herida	-	1	1	2	1	-	-	5
Espujo	-	-	1	1	3	-	-	5
Secreción gástrica	-	3	-	-	1	-	-	4
Secreción bronquial	-	2	1	-	-	-	-	3
Uretral	-	-	1	-	-	-	1	2
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>40</b>	<b>39</b>	<b>22</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>180</b>

**Tabla 3.9.** Principales especies de *Candida* aisladas a partir de las muestras clínicas evaluadas con el CromoCen CND-C

Muestra procesada	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. glabrata</i>	Otras levaduras	Total
Vaginal	36	6	2	2	12	2	15	2	77
Hemocultivo	3	-	-	1	7	19	-	-	30
Ótico	6	3	-	2	17	-	-	1	29
Coprocultivo	5	1	2	5	-	-	-	-	13
Catéter arterial	1	1	-	-	2	2	-	-	6
Fibrosis quística	6	-	-	-	-	-	-	-	6
Lesión piel, herida	3	-	-	1	-	-	1	-	5
Espujo	3	2	-	-	-	-	-	-	5
Secreción gástrica	1	2	-	-	-	1	-	-	4
Secreción bronquial	1	1	-	-	-	1	-	-	3
Uretral	1	1	-	-	-	-	-	-	2
<b>Total (Porcentaje)</b>	<b>66 (37%)</b>	<b>17 (9%)</b>	<b>4 (2%)</b>	<b>11 (6%)</b>	<b>38 (21%)</b>	<b>25 (14%)</b>	<b>16 (9%)</b>	<b>3 (2%)</b>	<b>180 (100%)</b>

genéticas que han revelado que el taxón *C. parapsilosis* incluye otras especies representadas por *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* (Gacser *et al.*, 2007; Trofa *et al.*, 2008).

En general, este grupo de especies, que crecen y son detectadas en el medio cromogénico con características similares, se identificaron al utilizar otras pruebas bioquímicas de la metodología tradicional, logrando la confirmación de *C. parapsilosis* n=38 (21%), *C. guilliermondii* n=25 (14%), *C. glabrata* n=6 (9%) y otras especies de los géneros *Trichosporon* y *Saccharomyces* n=3 (2%), así como una cepa de *P. aeruginosa* aislada a partir de un exudado ótico.

El ADS permitió el aislamiento y cultivo de las especies ensayadas, sin embargo, la detección de infecciones mixtas o la identificación presuntiva, sobre la base de las características culturales que exhiben las colonias, resultó difícil en este medio que no ha sido diseñado con este fin.

El empleo de CromoCen CND-C permite revelar, de forma eficaz y rápida, la actividad glucosaminidasa y glucosidasa mediante la apreciación de los diferentes colores que desarrollan las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. kefyr*, y ha supuesto un avance en el laboratorio de microbiología clínica, mostrando una utilidad mayor que los medios tradicionales para el aislamiento e identificación de especies de *Candida*. A su vez, ofreció como ventaja el poder aislar y detectar las colonias de levaduras de una muestra con microbiota polifúngica.

Por otra parte, la posibilidad de lograr la diferenciación precisa entre las especies de *C. parapsilosis* y *C. glabrata* en un medio de aislamiento primario se consideró, por los evaluadores, como una solución atractiva para el estudio de pacientes con candidiasis sistémicas. En estas infecciones se señala que *C. parapsilosis* presenta una elevada prevalencia seguida de *C. glabrata* y ambas especies manifiestan, a su vez, serios problemas terapéuticos por su menor sensibilidad a los antifúngicos más comúnmente empleados (Lumbreras *et al.*, 2003; Salavert *et al.*, 2006; Trofa *et al.*, 2008).

De modo general, los resultados de la evaluación externa enfatizaron algunos aspectos a tener presentes cuando se emplea el medio CromoCen CND-C, entre ellos:

- es confiable para el diagnóstico rápido de las principales especies de *Candida* en muestras clínicas;
- es conveniente emplearlo en la técnica de aislamiento primario a partir de especímenes biológicos en los que se sospecha la presencia de células levaduriformes;

- permite el reconocimiento de distintas especies que pueden coexistir en la misma muestra;
- optimiza el trabajo en el laboratorio dado por la facilidad de su preparación, la conservación de las placas preparadas, así como la sencilla lectura e interpretación de los resultados.

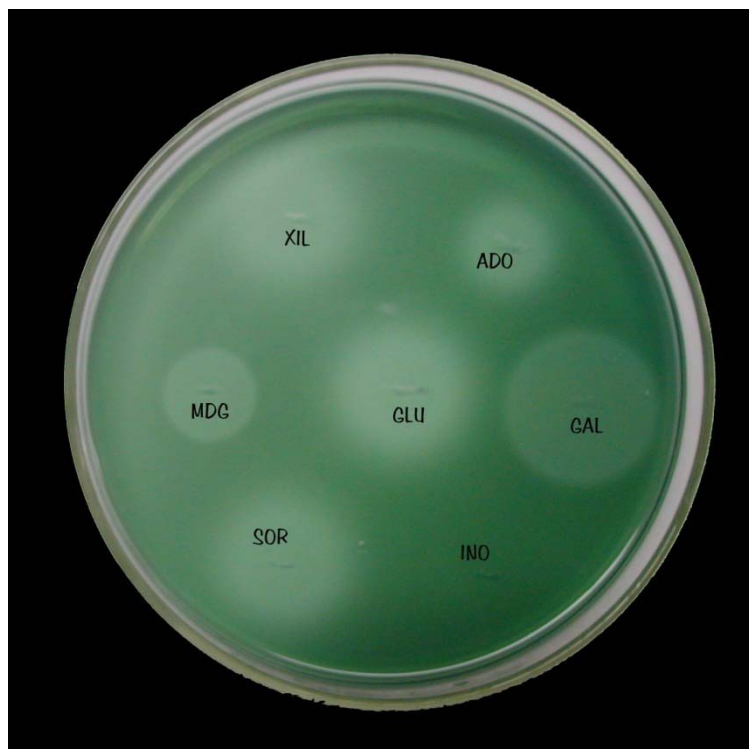
En resumen, el medio CromoCen CND-C mostró una utilidad práctica en la identificación rápida de las especies de *Candida* de mayor importancia clínica. No obstante, éste debe utilizarse con reservas para el reconocimiento de algunas especies que muestran características culturales similares. En este caso, resulta imprescindible el estudio morfológico y eventualmente de otras pruebas complementarias para lograr la diferenciación precisa de la especie, lo que tiene implicaciones significativas y puede modificar la conducta terapéutica sobre el paciente.

Los resultados y criterios emitidos por los especialistas de los diferentes laboratorios externos constituyeron elementos fundamentales para los expedientes de registro sanitario, que junto con toda la información relacionada con el desarrollo a ciclo completo de los nuevos productos, se presentaron al CECMED y como resultado se concedieron los Registros Sanitarios a la Base de Medio CromoCen CND-C (No. D0712-14/8) y al Suplemento Glicerol (No. D1007-32/3) cumpliendo con los requisitos del CECMED (Resolución 8, 2001; Resolución 20, 2004) (Anexo H).

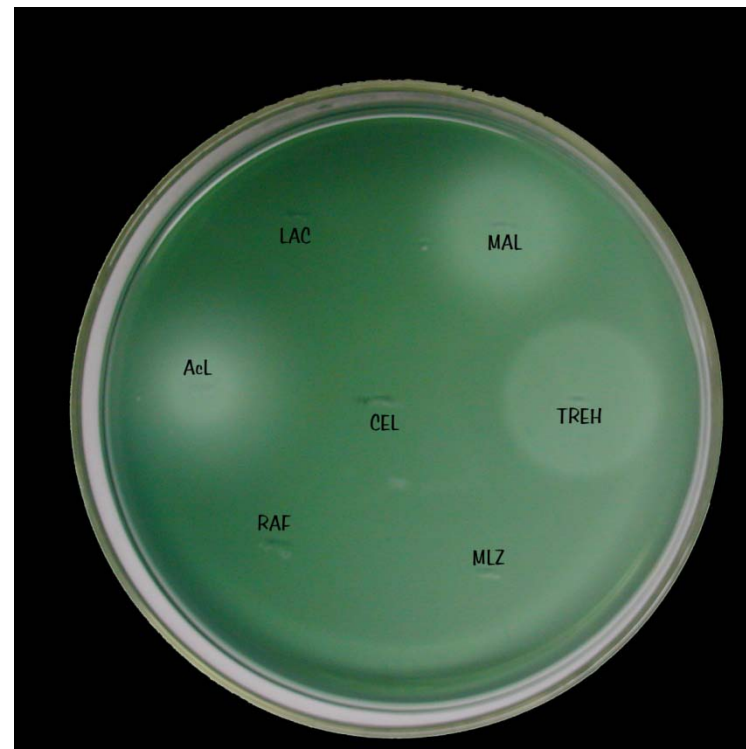
### **3.3 Resultados de la modificación del método de auxonograma del carbono para la identificación de las especies de *Candida***

El estudio comparativo entre el método de Wickerham y el de auxonograma modificado, utilizando las cepas de referencia de *Candida*, frente a 14 sustancias carbonadas, se muestra en la tabla 3.10. Una lectura inicial, realizada a la 24 h de incubación, mostró la posibilidad de interpretar los resultados de las reacciones de asimilación con el método de auxonograma modificado, mientras que con el método estándar de Wickerham no se visualizó la opalescencia propia del crecimiento microbiano, al utilizar los glúcidos seleccionados. A las 48 h, con el método de auxonograma propuesto, se realizó la interpretación de los resultados con mayor nitidez, a partir de la observación visual de la placa a trasluz y la zona de turbiedad alrededor del punto de incisión, en el cual se colocó la fuente de carbono. En la figura 3.7 se muestra una imagen de la identificación de una de las cepas estudiadas (*C. albicans*).

La lectura a las 72 h de incubación mostró una concordancia de las reacciones de asimilación positivas entre ambos procedimientos de un 96,5%, pues 2 (3,5%) de ellas resultaron dudosas,



**A**



**B**

**Figura 3.7.** Resultados de la evaluación de una cepa aislada (*C. albicans*) por el método de auxonograma modificado

A: GLU-glucosa (+), XIL-xilosa (+), ADO-adonitol (+), GAL-galactosa (+), INO-inositol (-), SOR-sorbitol (+), MDG-metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido (+); B: LAC-lactosa (-), CEL-celobiosa (-), MAL-maltosa (+), TREH-trehalosa (+), MLZ-melecitosa (-), RAF-rafinosa (-) y AcL-ácido láctico (+); (+): respuesta positiva y (-): respuesta negativa

al ser interpretadas por el técnico. Las discrepancias fueron para el adonitol y metil-alfa-D-glucopiranosido, en las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*, respectivamente, siendo el método de Wickerham responsable de las lecturas inexactas.

Finalmente, luego de los siete días de incubación (168 h), requeridos para el método de Wickerham, se logró una concordancia de un 100% para todas las cepas de *Candida* evaluadas frente a las sustancias carbonadas seleccionadas entre ambos métodos.

La aplicación del procedimiento de auxonograma modificado permitió realizar la identificación de las 156 cepas de *Candida* spp. aisladas (Tabla 3.11), según los patrones de asimilación de las sustancias carbonadas, coincidentes con los referidos en las tablas de estudios taxonómicos clásicos (Lacaz *et al.*, 1991; De Hoog *et al.*, 1996; Larone, 2002; De Hoog *et al.*, 2009).

Al igual que en otros métodos para la identificación de levaduras, basados en la asimilación de glúcidos, tales como el API 20C AUX y el ID 32C (bioMérieux) (Cárdenes-Perera *et al.*, 2004; Geraldo dos Santos *et al.*, 2006), la formulación del medio de cultivo propuesto contiene, además de las sales inorgánicas comunes de la base, aminoácidos esenciales, entre ellos la histidina (0,005 g/L), la metionina y el triptófano (0,02 g/L de ambos), que favorecen la adaptación de las especies de levaduras en el medio en un menor período de tiempo, ya que proveen los nutrientes necesarios para su desarrollo. A la formulación se le adicionó el azul de bromotimol (0,04 g/L) para favorecer el contraste de los halos de crecimiento reveladores de la asimilación de las sustancias carbonadas y agar (20 g/L) como soporte sólido. La composición puede ser tratada por esterilización en autoclave, sin la formación de precipitados indeseables.

Por otra parte, la técnica de Wickerham se efectúa sin agitación y se conoce que las levaduras requieren de condiciones aeróbicas para su adecuado desarrollo. Por ello el valorar la cantidad de medio de cultivo que se distribuye (0,5 mL), en correspondencia con las dimensiones del tubo requiere una especial atención, debido a que esto influye significativamente en la aereación del cultivo y, por consiguiente, en su desarrollo. Sin embargo, el uso de placas de Petri en el método modificado, facilita el intercambio de oxígeno del cultivo y minimiza la problemática de la interpretación de la reacción positiva de asimilación.

Al comparar el método estándar con el procedimiento de auxonograma propuesto, se encontró que un conjunto de factores influye significativamente en la interpretación de los resultados,

**Tabla 3.10.** Resultados del método modificado propuesto para la prueba de auxonograma y la técnica de Wickerham

Levadura	<sup>a</sup> Asimilación de carbohidrato:														Total
	GLU	XIL	ADO	GAL	INO	SOR	MDG	CEL	LAC	MAL	TREH	MLZ	RAF	AcL	
<i>C. guilliermondii</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	11
<i>C. tropicalis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	10
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1/1	1/1	1/1*	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	9
<i>C. albicans</i> ATCC 17111	1/1	1/1	1/1*	1/1	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	1/1	9
<i>C. parapsilosis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	0/0	1/1	1/1*	0/0	0/0	1/1	1/1	1/1	0/0	0/0	9
<i>C. kefir</i>	1/1	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	5
<i>C. glabrata</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	2
<i>C. krusei</i>	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2
Total	8/8	5/5	5/5	6/6	0/0	5/5	5/5	2/2	1/1	5/5	6/6	3/3	2/2	4/4	57

(<sup>a</sup>): los datos son expresados como respuesta positiva del carbohidrato asimilado por el método alternativo/respuesta positiva del carbohidrato asimilado por la técnica de Wickerham; GLU-glucosa, XIL-xilosa, ADO-adonitol, GAL-galactosa, INO-inositol, SOR-sorbitol, MDG-metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, CEL-celobiosa, LAC-lactosa, MAL-maltosa, TREH-trehalosa, MLZ-melecitosa, RAF-rafinosa y AcL-ácido láctico; (\*): reacción dudosa

**Tabla 3.11.** Porcentaje de las reacciones positivas de asimilación de compuestos carbonados utilizando el método modificado propuesto

[illegible]

tales como la composición del medio y las condiciones de incubación, entre otras, con diferencias sustanciales que posibilitan la interpretación de las reacciones en un menor período de tiempo y con mayor facilidad en el método propuesto.

La identificación de las especies de *Candida*, por sus patrones de asimilación de glúcidos, se puede ejecutar por diferentes esquemas, que muestran porcentajes de positividad o negatividad en ocasiones discrepantes. Por esta razón, cualquier identificación debe aproximarse en el mayor grado a la clasificación taxonómica reportada en la bibliografía más reciente (Larone, 2002).

El método de asimilación de los carbohidratos es uno de los ensayos que forman parte de la metodología micológica convencional, por lo que la cantidad de compuestos a evaluar puede ser seleccionada en dependencia de la especie que se sospecha. Si se desea aplicar una técnica simplificada de auxonograma, el empleo de los disacáridos (celobiosa, lactosa y trehalosa) y de los trisacáridos (melecitosa y rafinosa) es determinante.

Este procedimiento posibilitó el reconocimiento de *C. kefyr* (Tabla 3.11), revelando el estudio que esta fue la única especie capaz de asimilar la lactosa, además de la rafinosa y el ácido láctico. En los perfiles de identificación que se ofrecen con los sistemas ID 32C y API 20C AUX, se muestran datos variables de positividad: 83 y 18% para el sorbitol, y 85 y 34% para la xilosa, respectivamente. Estas reacciones resultaron negativas en el estudio, por lo que se considera que no son concluyentes para definir esta especie.

La diferenciación entre *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, ambas positivas a la melecitosa, se logró al evaluar la celobiosa, ya que la asimilación fue negativa para *C. parapsilosis* y positiva para *C. tropicalis* al aplicar el método modificado. No obstante, la reacción de asimilación de la celobiosa, según los sistemas ID 32C y API 20C AUX, es variable para estas especies, 91 y 17%, respectivamente (Cárdenes-Perera *et al.*, 2004; Geraldo dos Santos *et al.*, 2006).

El alto grado de reproducibilidad evidenciado por el procedimiento modificado de auxonograma, al identificar las diferentes cepas de *Candida*, puede atribuirse a las ventajas que el mismo ofrece, entre las que se incluye: el uso de un medio de cultivo sintético de fácil preparación, esterilizable en autoclave, con mayor contenido nutricional y estable hasta dos semanas, almacenado a temperatura de 2 a 8°C.



La exactitud para determinar las reacciones de asimilación empleando la modificación del método propuesto permite asegurar que éste resultó altamente favorable, conveniente y práctico ya que logró un ahorro sustancial de material y de tiempo, todo lo cual se evidenció al evaluar, de manera simultánea, 14 sustancias que constituyen las fuentes de carbono fundamentales para la diferenciación de las especies de *Candida*. El método constituye una alternativa para realizar las pruebas de asimilación en caso de no contar con discos impregnados con sustancias carbonadas. Estos aspectos son relevantes en un laboratorio de recursos limitados, especialmente si se maneja una elevada carga de trabajo y contribuye a minimizar los gastos, sin perder la efectividad.

### **3.4 Desarrollo a ciclo completo de un método cromogénico-fluorogénico**

#### **3.4.1 Influencia del MU- $\alpha$ -glc para la diferenciación de *Candida* spp.**

Se obtuvo un nuevo medio cromogénico-fluorogénico, que se diferenció del cromogénico por contener sulfato de magnesio anhidro en cantidad de 0,24 g/L e incluir 0,1 g/L del sustrato fluorogénico (MU- $\alpha$ -glc) para la detección de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa de *C. parapsilosis* (Tabla 3.12). El diseño de la nueva composición se sustentó sobre la base de la eficacia alcanzada por el medio de cultivo cromogénico para *Candida* y, como principio, permitió la detección de las actividades enzimáticas específicas dentro del género, tales como la N-acetil-beta-D-glucosaminidasa, la beta-glucosidasa y la alfa-glucosidasa, que actúan sobre los tres sustratos presentes en la composición. CromoCen CND-F posibilitó el cultivo de todas las especies de *Candida* utilizadas en el estudio, apreciando un favorable crecimiento y desarrollo de las colonias, así como de sus características morfológicas.

En la tabla 3.13 se muestra la evaluación del color, textura y morfología colonial de las 66 cepas de *Candida* evaluadas en el medio de cultivo cromogénico-fluorogénico. El espectro de colores obtenido fue variado: verde, azul, rosado violáceo, rosado pálido, blanco y blanco crema, además de la macro-morfología y el desarrollo de la fluorescencia para cada especie ensayada, elementos que aportan la información necesaria para la correcta identificación de las mismas.

El estudio demostró que fue posible identificar o detectar la mayoría de las especies de importancia médica, siendo las colonias de color verde o verde azul propias de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, las de color azul identifican la especie *C. tropicalis* y las colonias de color rosado

**Tabla 3.12.** Formulación de la composición cromogénica-fluorogénica

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de batata	20,0
Extracto de levadura	10,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,24
Desoxicolato de sodio	0,5
Ácido nalidíxico	0,03
Agar	15,0
X-glu	0,1
Ros-glc	0,1
MU- $\alpha$ -glc	0,1
Glicerol	10 mL

**Tabla 3.13.** Características coloniales de las especies de *Candida* en la nueva composición cromogénica-fluorogénica

Especie	Cantidad	Color	Morfología		Fluorescencia a 366 nm	
			Lisa	Rugosa	Positiva	Negativa
<i>C. albicans</i>	10	verde a verde azul	10	-	10	-
<i>C. parapsilosis</i>	9	blanco	5	4	9	-
<i>C. tropicalis</i>	9	azul	9	-	9	-
<i>C. glabrata</i>	9	blanco crema	9	-	-	9
<i>C. guilliermondii</i>	8	rosado pálido	8	-	8	-
<i>C. krusei</i>	7	blanco, opaca	-	7	-	7
<i>C. lusitaniae</i>	7	rosado	7	-	7	-
<i>C. kefyr</i>	4	rosado violáceo	4	-	-	4
<i>C. rugosa</i>	1	blanco	1	-	-	1
<i>C. dubliniensis</i>	1	verde	1	-	1	-
<i>C. famata</i>	1	rosado pálido	1	-	1	-
<b>Total</b>	<b>66</b>		<b>55</b>	<b>11</b>	<b>45 (68%)</b>	<b>21 (32%)</b>

a rosado pálido indican la detección de las especies *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. famata*. Todas las especies descritas anteriormente, fluorescen bajo luz UV de 366 nm.

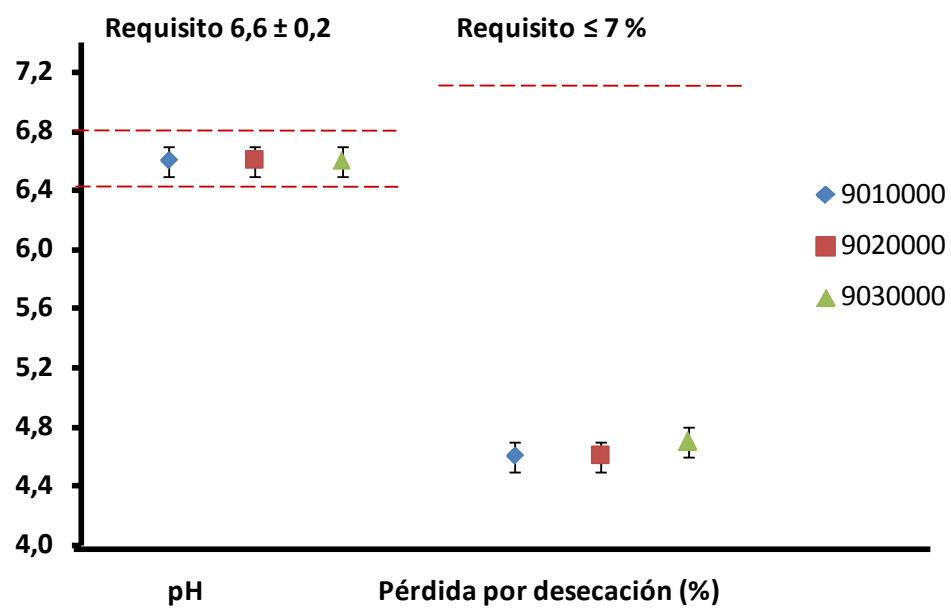
Otras especies de *Candida* se muestran de color blanco y es posible identificar a *C. parapsilosis* y a *C. krusei*. Las cepas de *C. parapsilosis* pueden manifestar diferentes características macroculturales, desde colonias redondas y lisas hasta colonias con una superficie rugosa, estrellada, y todas son fluorescentes. Las colonias de *C. krusei* son opacas, planas, con bordes irregulares, superficie algodonosa y sin fluorescencia. Las cepas *C. glabrata* y *C. rugosa* crecen en el medio y exhiben características muy similares entre sí, de color blanco, redondas, lisas y sin fluorescencia, por lo que su discriminación se logra por el método del auxonograma modificado.

El sustrato MU- $\alpha$ -glc por primera vez se incorpora a formulaciones agarizadas para la diferenciación de *Candida* y, en especial, en muestras clínicas. Bramono y col. (2006) reportaron la utilización de este sustrato para la identificación de especies de *Candida* en métodos de filtración por membrana, técnica no comúnmente empleada en el laboratorio clínico, mientras que los medios Fluoroplate Candida y agar SDCA-MUAG, que contienen 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida, sólo detectan *C. albicans* por su fluorescencia.

La actividad  $\alpha$ -glucosidasa se detectó en el 68% del total de cepas de *Candida* ensayadas, pero al combinar la fluorescencia con los colores que desarrollan las especies, se logró discriminar aquellas que muestran características similares, por ejemplo, *C. lusitaniae* de *C. kefyr*, siendo la primera fluorescente y no así la segunda. De manera análoga se diferenciaron *C. parapsilosis* de *C. glabrata*, ambas blancas, mostrando la primera una respuesta fluorescente, lo que coincide con otros trabajos de la bibliografía (Bramono *et al.*, 2006). La novedad del medio fue reconocida con el certificado de autor de patente de la OCPI (No. 23509) (Anexo D).

### **3.4.2 Resultados de la obtención del medio cromogénico-fluorogénico en la industria**

Se logró la fabricación a escala industrial de tres lotes de la Base de Medio CromoCen CND-F (9010000, 9020000 y 9030000). La evaluación de cada lote por los laboratorios de Control de la Calidad de BioCen demostró la consistencia entre los mismos al corresponder sus indicadores con los requisitos establecidos en la especificación. En la figura 3.8 se muestran los valores del pH y la pérdida por desecación de los lotes producidos, logrando resultados satisfactorios y reproducibles, coincidentes con lo reportado para los medios en polvo (Bridson, 1998).



**Figura 3.8** Evaluación del pH y la pérdida por desecación de tres lotes industriales de la Base de Medio CromoCen CND-F

El pH resultó de 6,6 en cada lote y los valores de la pérdida por desecación fueron inferiores al límite permitido por la especificación ( $\leq 7\%$ ). Ambos parámetros son considerados como críticos para el estudio del período de vida útil del medio en polvo (Zhurbenko y Rodríguez, 2009).

En documentos adjuntos (Anexo I), se encuentran los informes de análisis (AC 0160), que declaran los resultados satisfactorios de la evaluación microbiológica, en cuanto a la recuperación selectiva, detección e identificación de las especies del género de interés, así como la inhibición de los microorganismos empleados como control negativo.

Este resultado se debe a que la formulación contiene una mezcla de dos extractos nutritivos - el extracto de batata y el extracto de levadura - los cuales aportan una elevada concentración de carbohidratos, vitaminas, macro- y micro-elementos, todos fundamentales para el crecimiento de las levaduras, según la bibliografía consultada (Bridson, 1998; Larone, 2002). La composición garantiza un equilibrio entre nutrientes e inhibidores de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que, formando parte de la microbiota pueden acompañar las muestras clínicas, lo que asegura un aislamiento selectivo del germen de interés, característica común de otros medios cromogénicos antes desarrollados (Ballesté *et al.*, 2005; Ghelardi *et al.*, 2007).

Como elemento concluyente de la etapa de desarrollo se emitió el acta de aprobación de la introducción (AC 2842), que acredita la producción en serie del nuevo diagnosticador (Anexo I).

Las evaluaciones del estudio de estabilidad en anaquel, realizadas al medio de cultivo en polvo resultaron conformes según las especificaciones, aprobándose, hasta el momento, un período de validez de 24 meses y la continuidad de los ensayos según el cronograma establecido. A su vez, las placas preparadas con CromoCen CND-F mostraron resultados adecuados hasta 30 días almacenadas a temperatura de 2 a 8°C (Anexo F).

### **3.4.3 Desempeño del medio cromogénico-fluorogénico**

En la tabla 3.14 se presenta la información sintetizada que reúne los laboratorios participantes en el estudio de la evaluación externa del desempeño del medio CromoCen CND-F y el total de muestras clínicas procesadas (142) de diferentes orígenes.

El medio permitió, en un período máximo de 48 h, la identificación directa de seis especies de *Candida*, al valorar las características culturales y confirmar el desarrollo de fluorescencia, bajo luz UV, de las colonias. Las principales especies detectadas fueron *C. albicans* n=55 (38,7%),

hallándose en el primer orden de frecuencia entre los aislamientos analizados y *C. parapsilosis* n=29 (20,4%) en un segundo orden. Esta frecuencia de aislamientos es similar a la divulgada por Trofa y col. (2008) que reportaron 48,8% para *C. albicans* y alrededor del 17% para *C. parapsilosis*. Es de destacar que por primera vez se declara un medio capaz de ofrecer, con 100% de aciertos, la identificación de esta última especie. Con menor frecuencia se aislaron e identificaron *C. tropicalis* n=26 (18,3%) y *C. kefyr* n=3 (2,1%) (Tabla 3.15). Todas ellas respondieron a las características definidas para su adecuada tipificación (100% de exactitud).

Al considerar la morfología como elemento discriminante, en cuanto a la textura, superficie y bordes de las colonias, se distinguieron *C. krusei* y *C. inconspicua* (ambas sin fluorescencia). Su diferenciación se logró por el color de las colonias, siendo *C. krusei* n=2 (1,4%) blancas y *C. inconspicua* n=1 (0,7%) rosadas con mayor intensidad en el centro (Tabla 3.15).

Debido a la similitud de colores y características morfológicas de otras especies de *Candida*, para las cuales no fue posible realizar la identificación directa, se establecieron dos grupos: en el primero, colonias de color blanco a crema sin fluorescencia, típicas de *C. glabrata* y *C. rugosa*; y en el segundo, colonias de color rosado pálido con fluorescencia, propias de *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. famata*. Para diferenciarlas se acompañó el estudio con el auxonograma modificado y la micro-morfología colonial, lográndose la identificación confirmatoria de las especies *C. glabrata* n=23 (16,2%) y *C. lusitaniae* n=3 (2,1%), estableciendo, con ello, un nuevo método cromogénico-fluorogénico para la identificación y diferenciación de especies de *Candida* de importancia médica.

Como resultado de la evaluación externa del método se evidenciaron sus ventajas al aislar, diferenciar e identificar, en un sólo paso, en menor tiempo y con 100% de exactitud, el mayor número de especies de *Candida* con mejor rendimiento que el método de referencia, además que posibilitó la detección de infecciones polifúngicas y la identificación de algunas de las especies presentes en las muestras, siendo capaz de suprimir el desarrollo de las bacterias. Este hallazgo confirma, una vez más, los elevados valores de exactitud diagnóstica logrados para algunas especies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, con otros medios cromogénicos existentes en el mercado, que oscilan entre 96,3 y el 100% (Quindós *et al.*, 2001; García-Martos *et al.*, 2001; Letscher-Bru *et al.*, 2002).

**Tabla 3.14.** Muestras clínicas procesadas por diferentes laboratorios evaluadores

Muestra procesada	H. Pediátrico "Leonor Pérez"	H. Pediátrico "William Soler"	H. Ginecobstétrico "Eusebio Hdez"	Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas	ENCB, IPN	Total
Vaginal	2	4	19	8	14	<b>47</b>
Hemocultivo	-	1	-	6	-	<b>7</b>
Ótico	2	1	-	24	-	<b>27</b>
Coprocultivo	-	1	-	3	-	<b>4</b>
Catéter arterial	-	-	-	1	-	<b>1</b>
Lesión piel, herida	-	-	-	13	-	<b>13</b>
Espuito	-	-	-	2	-	<b>2</b>
Secreción bronquial	-	1	-	37	-	<b>38</b>
Uretral	-	1	-	2	-	<b>3</b>
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>19</b>	<b>96</b>	<b>14</b>	<b>142</b>

**Tabla 3.15.** Principales especies de *Candida* aisladas a partir de las muestras clínicas evaluadas con el CromoCen CND-F

Muestra procesada	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. inconspicua</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. glabrata</i>	Total
Vaginal	33	3	1	1	2	1	1	5	<b>47</b>
Hemocultivo	-	1	1	-	-	-	-	5	<b>7</b>
Ótico	3	1	-	-	18	-	-	5	<b>27</b>
Coprocultivo	1	2	-	-	-	-	-	1	<b>4</b>
Catéter arterial	1	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>
Lesión piel, herida	2	3	-	-	3	-	-	5	<b>13</b>
Espuito	1	-	-	-	-	-	-	1	<b>2</b>
Secreción bronquial	14	15	-	1	5	-	2	1	<b>38</b>
Uretral	-	1	1	-	1	-	-	-	<b>3</b>
<b>Total (Porcentaje)</b>	<b>55 (38,7%)</b>	<b>26 (18,3%)</b>	<b>3 (2,1%)</b>	<b>2 (1,4%)</b>	<b>29 (20,4%)</b>	<b>1 (0,7%)</b>	<b>3 (2,1%)</b>	<b>23 (16,2%)</b>	<b>142 (100%)</b>

El medio desarrollado representa otras ventajas para los servicios de microbiología del país, debido a que su preparación es sencilla y no requiere de esterilización en autoclave, disminuyendo el consumo energético por ese concepto. La interpretación de los resultados para la identificación de las especies se realiza visualmente, por el color y la morfología colonial.

En resumen, la evaluación microbiológica en los laboratorios externos demostró que el análisis de las características culturales en el medio CromoCen CND-F constituye una base importante para el aislamiento y la identificación primaria, de forma eficaz y rápida, de la mayoría de las especies de *Candida*. Se obtuvo el Registro Sanitario como diagnosticador en el CECMED de la Base de Medio CromoCen CND-F con el número D0712-14/9. Su utilización puede constituir una importante herramienta para la vigilancia, el control epidemiológico de las infecciones fúngicas sistémicas, el establecimiento de medidas terapéuticas y la posibilidad de alertar sobre los cambios en la distribución y emergencia de otras especies menos sensibles a los antifúngicos.

### **3.5 Validación intra- e inter-laboratorios y determinación de la incertidumbre de los métodos**

En la literatura científica se han publicado pocos resultados de la validación e incertidumbre de las mediciones en los métodos microbiológicos destinados al diagnóstico de *Candida*. Los principales resultados están encaminados a la evaluación de la utilidad y la eficiencia de los medios cromogénicos, fundamentalmente, CHROMagar Candida (Quindós *et al.*, 2001; Gatica *et al.*, 2002; Ruiz-Aragón *et al.*, 2003; Mesa *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005; Ballesté *et al.*, 2005) y Candida ID (Freydiere *et al.*, 2000; Willinger *et al.*, 2001; Fricker-Hidalgo *et al.*, 2001). Los principales parámetros que se exponen son sensibilidad, especificidad, eficiencia o exactitud, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice Kappa. Hasta el momento, se han divulgado escasos estudios de enumeración de cepas de *Candida* en los medios de cultivo cromogénicos. Este elemento es fundamental en el examen micológico de la infección urinaria, en la cual es relevante cualquier valor del recuento de levaduras, incluyendo *Candida* (López *et al.*, 2002; Okulicz *et al.*, 2007).

#### **3.5.1 Validación del método cromogénico**

##### **3.5.1.1. Resultados de la evaluación de los parámetros de inclusividad y exclusividad**

Los resultados del estudio de la inclusividad utilizando el método de referencia se muestran en las tablas 3.16 y 3.17 y con el método alternativo cromogénico en las tablas 3.18 y 3.19.



**Tabla 3.16.** Identificación de especies de *Candida* mediante sus características microscópicas utilizando el método de referencia

Especie	Cantidad	TG (E/O)	Requisito o reacción esperada	Respuesta
<i>C. albicans</i>	10	+/+	Abundantes PSH con BLT en racimos a intervalos regulares. Numerosas CLM simples, laterales o terminales a lo largo de las PSH.	(I) Conforme
<i>C. dubliniensis</i>	1	+/+	Abundantes PSH con BLT. Las CLM se reproducen en pares, cadenas o racimos en el extremo de las PSH.	(II) Conforme
<i>C. famata</i>	1	-/-	Rudimentarias PSH, normalmente ninguna. Posee agrupaciones de BLT y ausencia de CLM.	(III) Conforme
<i>C. glabrata</i>	9	-/-	No produce PSH. Posee BLT agrupadas sin arreglo y ausencia de CLM.	(IV) Conforme
<i>C. guilliermondii</i>	3	-/-	Desarrolla PSH cortas y pocas en número. Producción de pequeños racimos de BLT. Ausencia de CLM.	(V) Conforme
<i>C. inconspicua</i>	1	-/-	No produce PSH. Numerosas BLT agrupadas y ausencia de CLM.	(VI) Conforme
<i>C. kefyr</i>	5	-/-	Producción de PSH en ramas, con escasos BLT elongados, dispuestos en paralelo a modo de una corriente a lo largo de las PSH. Ausencia de CLM.	(VII) Conforme
<i>C. krusei</i>	1	-/-	Producción de abundantes PSH bifurcadas, con escasas BLT.	(VIII) Conforme
<i>C. lusitaniae</i>	3	-/-	Rudimentarias PSH, normalmente ninguna con agrupaciones de BLT sin arreglo y ausencia de CLM.	(IX) Conforme
<i>C. parapsilosis</i>	9	-/-	Producción de PSH, cortas, en forma satelital, pueden encorvarse en los extremos. Escasos BLT simples o en cadenas cortas. Ausencia de CLM.	(X) Conforme
<i>C. rugosa</i>	1	-/-	Producción de PSH delicadas satelitales. Ausencia de BLT y CLM.	(XI) Conforme
<i>C. tropicalis</i>	6	-/-	Producción de PSH largas y ramificadas. Escasos BLT ovalados, simples y distribuidos de forma alterna y espaciada a lo largo de la PSH. Ausencia de CLM.	(XII) Conforme
<b>Total</b>	<b>50</b>			

TG (E/O): tubo germinativo (reacción esperada/reacción obtenida), PSH: pseudohifas, BLT: blastosporas, CLM: clamidosporas

**Tabla 3.17.** Características macroscópicas y bioquímicas para identificar las especies de *Candida* por el método de referencia

Especie	Cantidad	Color y morfología colonial en agar dextrosa de Sabouraud		Crecimiento y asimilación (E/O)															
		Requisito	Respuesta	ACT	45°C	GLU	XIL	ADO	GAL	INO	SOR	MDG	CEL	LAC	MAL	TRH	MLZ	RAF	Acl
<i>C. albicans</i>	10	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
<i>C. dubliniensis</i>	1	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>C. famata</i>	1	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	V/-	+/+	+/+	V/+	V/+	-/-
<i>C. glabrata</i>	9	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>C. guilliermondii</i>	3	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	I/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
<i>C. inconspicua</i>	1	blanco, opaca <sup>b</sup>	blanco, opaca <sup>b</sup>	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
<i>C. kefyr</i>	5	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	+/+	+/+	+/+	V/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>C. krusei</i>	1	blanco, opaca <sup>b</sup>	blanco, opaca <sup>b</sup>	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
<i>C. lusitaniae</i>	3	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	V/+
<i>C. parapsilosis</i>	6	blanco a crema <sup>c</sup>	blanco, lisa	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
<i>C. parapsilosis</i>	3	blanco a crema <sup>c</sup>	blanco, rugosa	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
<i>C. rugosa</i>	1	blanco <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	V/-
<i>C. tropicalis</i>	6	blanco a crema <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
Total	50																		

(<sup>a</sup>): morfología redonda, lisa y abultada; (<sup>b</sup>): morfología irregular, superficie rugosa y plana; (<sup>c</sup>): morfología redonda, lisa o rugosa y abultada; E/O: reacción esperada/reacción obtenida; (+): positiva; (-): negativa; I: inhibida; V: variable; ACT: actidiona; GLU: glucosa; XIL: xilosa; ADO: adonitol; GAL: galactosa; INO: inositol; SOR: sorbitol; MDG: metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido; CEL: celobiosa; LAC: lactosa; MAL: maltosa; TRH: trehalosa; MLZ: melecitosa; RAF: rafinosa; Acl: ácido láctico

**Tabla 3.18.** Identificación de las especies de *Candida* utilizando el método alternativo

Especie	Cantidad	Color y morfología colonial en CromoCen CND-C	
		Requisito	Respuesta
<i>C. albicans</i> <sup>IP</sup>	10	verde a verde azul <sup>a</sup>	verde <sup>a</sup>
<i>C. dubliniensis</i> <sup>IP</sup>	1	verde a verde azul <sup>a</sup>	verde <sup>a</sup>
<i>C. famata</i> <sup>IP</sup>	1	rosado pálido <sup>a</sup>	rosado pálido <sup>a</sup>
<i>C. glabrata</i> <sup>IP</sup>	9	blanco crema <sup>a</sup>	blanco crema <sup>a</sup>
<i>C. guilliermondii</i> <sup>IP</sup>	3	rosado pálido, con o sin fondo azul <sup>a</sup>	rosado pálido <sup>a</sup>
<i>C. inconspicua</i>	1	rosado, opaca <sup>b</sup>	rosado, opaca <sup>b</sup>
<i>C. kefyr</i>	5	rosado violáceo <sup>a</sup>	rosado violáceo <sup>a</sup>
<i>C. krusei</i>	1	blanco, opaca <sup>b</sup>	blanco, opaca <sup>b</sup>
<i>C. lusitaniae</i> <sup>IP</sup>	3	rosado a rosado violáceo <sup>a</sup>	rosado <sup>a</sup>
<i>C. parapsilosis</i>	3	blanco <sup>c</sup>	blanco, rugosa
<i>C. parapsilosis</i> <sup>IP</sup>	6	blanco <sup>c</sup>	blanco, lisa
<i>C. rugosa</i> <sup>IP</sup>	1	blanco <sup>a</sup>	blanco <sup>a</sup>
<i>C. tropicalis</i>	6	azul <sup>a</sup>	azul <sup>a</sup>

(<sup>IP</sup>): especies que requieren una identificación posterior con otras pruebas adicionales; (<sup>a</sup>): morfología redonda, lisa y abultada; (<sup>b</sup>): morfología irregular, superficie rugosa y plana; (<sup>c</sup>): morfología redonda, lisa o rugosa y abultada

**Tabla 3.19.** Pruebas adicionales para diferenciar especies de *Candida* de igual color y morfología

Color	Especie	Crecimiento (reac. esperada/reac. obtenida)						Evaluación microscópica
		45°C	XIL	TRH	SAC	RAF	LAC	
Verde	<i>C. albicans</i>	+/+	+/+	+/+				
	<i>C. dubliniensis</i>	-/-	-/-	-/-				
Rosado pálido	<i>C. guilliermondii</i>					+/+	-/-	(V) PSH: +, BLT: +, CLM: -
	<i>C. lusitaniae</i>					-/-	-/-	(IX) PSH: -, BLT: +, CLM: -
	<i>C. famata</i>					+/+	V/-	(III) PSH: -, BLT: +, CLM: -
Blanco	<i>C. glabrata</i>	+/+		+/+	-/-	-/-		(IV) PSH: -, BLT: +, CLM: -
	<i>C. parapsilosis</i>	-/-		+/+	+/+	-/-		(X) PSH: +, BLT: +, CLM: -
	<i>C. rugosa</i>	-/-		-/-	-/-	-/-		(XI) PSH: +, BLT: -, CLM: -

XIL: xilosa, TRH: trehalosa, SAC: sacarosa, RAF: rafinosa, LAC: lactosa, (+): positivo, (-): negativo, PSH: pseudohifas, BLT: blastosporas, CLM: clamidosporas

Al evaluar las características micro-morfológicas de las 50 cepas de *Candida*, en suero de conejo estéril y en el medio agar extracto de arroz con Tween 80 (Tabla 3.16), se apreció la producción del tubo germinativo y la de clamidosporas, que son propiedades típicas de las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Wong *et al.*, 2006; Quesada *et al.*, 2007; Baradkar *et al.*, 2010). Otras cepas evaluadas mostraron, particularmente, la formación de pseudohifas o la ausencia de las mismas con abundantes células globulares (blastosporas) agrupadas sin arreglo. La producción de tales estructuras ha sido de gran utilidad para la identificación presuntiva de algunas especies (Al-Mosaid *et al.*, 2001; Linares y Solís, 2001; Wansley *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2004). Este resultado, como parte del método micológico tradicional, tiene un valor taxonómico orientativo por permitir, presuntivamente, señalar las especies con tales características.

El estudio macromorfológico de las diferentes especies de *Candida*, al utilizar el medio de cultivo ADS (Tabla 3.17), al valorar el color, la textura, la superficie y los bordes de la colonia, mostró características muy similares para la mayoría de las especies, por lo que su identificación se logró al efectuar las demás pruebas bioquímicas y fisiológicas, tales como resistencia a la actidiona, crecimiento a temperaturas elevadas (45°C) y la asimilación de varios compuestos carbonados. Los diferentes perfiles bioquímicos, mostrados por las especies, permitieron realizar una correcta identificación de las mismas, coincidente con lo revelado por otros autores (Linares y Solís, 2001; Larone, 2002).

Por otro lado, el estudio de las especies de *Candida*, utilizando el método alternativo con el medio CromoCen CND-C, permitió, en un sólo paso, la identificación correcta de cinco especies, al evaluar visualmente el color y la macromorfología colonial. Ellas fueron: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. inconspicua* y *C. parapsilosis* (morfotipo rugosa y estrellada). A su vez, permitió detectar otras ocho especies, comprendidas en tres grupos, según lo descrito en el acápite 3.2.4. El primero de estos grupos reúne a *C. albicans* y *C. dubliniensis*, el otro se compone de *C. guilliermondii*, *C. famata* y *C. lusitaniae* y, por último, el tercero agrupa a *C. glabrata*, *C. rugosa* y cepas de *C. parapsilosis* (morfotipo lisa) (Tabla 3.18).

El método cromogénico posibilitó la diferenciación de las especies comprendidas en los tres grupos, al utilizar siete pruebas adicionales, aplicadas de forma diferente en cada uno de ellos (Tabla 3.19). Al valorar los reportes bibliográficos, en cuanto a la cantidad de especies que

logran ser detectadas con otros medios cromogénicos, se ha constatado que CHROMagar Candida permite identificar las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Horvath *et al.*, 2003; Ballesté *et al.*, 2005). Se ha referido, además, su empleo para la identificación de *C. glabrata*. Sin embargo, Gatica y col. (2002), así como Ruiz-Aragón y col. (2003) han confirmado que otras nueve especies de *Candida*, entre ellas *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. famata* y *C. lusitanae*, dan origen a colonias con características similares. Para alcanzar una mayor exactitud en la identificación de *C. glabrata*, Murray y col. (2005) recomendaron combinar el medio cromogénico con pruebas rápidas, tales como la asimilación de la trehalosa. Por otra parte, Jabra-Rizk y col. (2001) consideran que la detección directa de *C. dubliniensis* en el medio es poco apropiada sobre la base de la intensidad de la coloración. Los resultados del presente estudio demostraron que el método alternativo con la utilización de CromoCen CND-C permitió la detección y diferenciación del mayor número de especies de *Candida* de importancia clínica. La evaluación del parámetro de la exclusividad, al estudiar otras especies microbianas, seleccionadas como microorganismos no diana, comprobó la habilidad del método alternativo para excluir posibles interferencias al realizar el análisis de las muestras clínicas. Todas las especies pertenecientes a otros géneros de levaduras fueron discriminadas de acuerdo a las características que desarrollaron las colonias (Tablas 3.20-3.22).

Es necesario resaltar que las especies del género *Rhodotorula* logran su desarrollo sólo a una temperatura de cultivo inferior a 30°C, manifestando un color de rosado a naranja tanto en el método de referencia como en el alternativo.

A pesar de que las colonias del género *Trichosporon* mostraron un color verde en el medio cromogénico, las mismas pudieron diferenciarse de otras del género *Candida* por presentar una morfología rugosa, seca y miceliar.

Al igual, las colonias del género *Cryptococcus* mostraron una coloración y una morfología mucoide que las diferenció del género de interés. Sin embargo, las especies de *Saccharomyces* se desarrollaron en el medio de color blanco y exhibieron una zona de precipitado biliar a su alrededor, así como una morfología redonda y lisa. Tales características son similares a algunas de las especies de *Candida*, por lo que es preciso realizar pruebas bioquímicas adicionales, tales como la asimilación de la sacarosa y la rafinosa, con el propósito de lograr su discriminación.

**Tabla 3.20.** Características macroscópicas y bioquímicas para identificar especies de otros géneros de levaduras diferentes al género *Candida* utilizando el método de referencia

Especie	Cantidad	Color y morfología colonial en agar dextrosa de Sabouraud		Crecimiento y asimilación (E/O)															
		Requisito	Respuesta	ACT	45°C	GLU	XIL	ADO	GAL	INO	SOR	MDG	CEL	LAC	MAL	TRH	MLZ	RAF	AcL
<i>R. glutinis</i>	1	rosado <sup>a</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-
<i>R. mucilaginosa</i>	2	rojo naranja <sup>a</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
<i>S. cerevisiae</i>	2	blanco <sup>a</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>S. uvarum</i>	1	blanco <sup>a</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>T. asahii</i>	1	blanco, opaca <sup>b</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	V/D	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
<i>T. inkin</i>	1	blanco, opaca <sup>b</sup>	conforme	V/D	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
<i>C. humicolus</i>	1	blanco <sup>c</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
<i>C. neoformans</i>	1	blanco <sup>c</sup>	conforme	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
Total	10																		

(<sup>a</sup>): morfología redonda y lisa; (<sup>b</sup>): morfología rugosa, estrellada, con micelio, seca, diámetro 1 mm; (<sup>c</sup>): morfología mucoide; E/O: reacción esperada/reacción obtenida; (+): positiva; (-): negativa; V: variable; D: débilmente positiva; ACT: actidiona; GLU: glucosa; XIL: xilosa; ADO: adonitol; GAL: galactosa; INO: inositol; SOR: sorbitol; MDG: metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido; CEL: celobiosa; LAC: lactosa; MAL: maltosa; TRH: trehalosa; MLZ: melecitosa; RAF: rafinosa; AcL: ácido láctico

**Tabla 3.21.** Elementos para diferenciar especies de otros géneros de levaduras del género *Candida* utilizando el método alternativo

Especie	Cantidad	Color y morfología colonial en CromoCen CND-C	
		Requisito	Respuesta
<i>R. glutinis</i>	1	rosado <sup>a</sup> , diámetro 0,5 mm (a 30°C)	conforme
<i>R. mucilaginosa</i>	2	rosado-naranja <sup>a</sup> , diámetro 0,5 mm (a 30°C)	conforme
<i>S. cerevisiae</i> <sup>IP</sup>	2	blanco <sup>a</sup> , con precipitado biliar	conforme
<i>S. uvarum</i> <sup>IP</sup>	1	blanco <sup>a</sup> , con precipitado biliar	conforme
<i>T. asahii</i>	1	verde <sup>b</sup> , opaca, diámetro 1 mm	conforme
<i>T. inkin</i>	1	verde claro <sup>b</sup> , opaca, diámetro 1 mm	conforme
<i>C. humicolus</i>	1	azul intenso, mucoide	conforme
<i>C. neoformans</i>	1	rosado pálido, mucoide, inhibido	conforme

(<sup>IP</sup>): especies que requieren otras pruebas adicionales para una correcta diferenciación; (<sup>a</sup>): morfología redonda, lisa, abultada; (<sup>b</sup>): morfología rugosa, con micelios, seca, estrellada

**Tabla 3.22.** Pruebas adicionales para diferenciar especies del género *Saccharomyces* de algunas especies de *Candida* de igual color y morfología colonial

Color	Especie	Crecimiento (reac. esperada/reac. obtenida)				Evaluación microscópica
		45°C	TRH	SAC	RAF	
Blanco	<i>Saccharomyces</i> spp.	-/-	-/-	+/+	+/+	PSH: -, BLT: +, CLM: -

TRH: trehalosa, SAC: sacarosa, RAF: rafinosa, (+): positivo, (-): negativo, PSH: pseudohifas, BLT: blastosporas, CLM: clamidosporas

A similares conclusiones arribaron Ruiz-Aragón y col. (2003) al evaluar las cepas aisladas de *S. cerevisiae*, que mostraron igual morfología y color que *C. glabrata* y *C. lusitaniae*.

Varios autores han evaluado el comportamiento de las especies de otros géneros de levaduras, diferentes de *Candida*, en medios cromogénicos, encontrando que los resultados falsos positivos, con relación a la identificación de *C. albicans*, se vinculan mayormente a *Trichosporon* spp., seguido de *C. neoformans* (Lipperheide *et al.*, 1993; Freydiere *et al.*, 2000). Sin embargo, Fricker-Hidalgo y col. (2001), al comparar Albicans ID2 y Candida ID, refirieron la discriminación de *Trichosporon* por su morfología macroscópica, resultados coincidentes con los obtenidos en el medio CromoCen CND-C.

Finalmente, el medio cromogénico mostró un elevado poder inhibitorio, manifestando la supresión del crecimiento en la mayoría de las bacterias evaluadas. Sólo *P. aeruginosa* y una cepa de *E. coli* aislada de una muestra crecieron en este medio. No obstante, el color y la apariencia colonial que mostraron permitieron su detección sin interferir la identificación de *Candida* (Tabla 3.23). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los medios CHROMagar Candida, Candida ID y agar Nickerson, de los cuales se ha descrito su actividad inhibitoria frente a las bacterias que acompañan las muestras clínicas, considerando el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas* y *E. coli* de inhibido a pobre (Odds y Bernaerts, 1994; Merck, 2006). Además de *P. aeruginosa*, Freydiere y col. (2000) detectaron el crecimiento de cepas de *Streptococcus* aisladas de muestras genitales y coprocultivos.

### **3.5.1.2 Límite de detección del método de referencia y del método alternativo**

El límite de detección, para los medios de cultivos ensayados, constituye el menor número de microorganismos que pueden ser detectados, pero no necesariamente cuantificados, en la muestra en el 50% de los casos bajo las mismas condiciones de ensayo (ISO 16140, 2003).

El método de referencia, con ADS, logró el 50% de recuperación del microorganismo de ensayo (*C. albicans*), al mostrar crecimiento en 5 placas de 10, en el nivel<sub>4</sub> ajustado a 1,5 UFC/mL. Sin embargo, el método cromogénico alternativo con el medio CromoCen CND-C logró, en ese mismo nivel, la promoción del crecimiento en 8 placas de las 10 inoculadas, lo que representa más del 50%, es decir, un 80% (Tabla 3.24).



**Tabla 3.23.** Características de otros microorganismos no levaduriformes al utilizar el método de referencia y el alternativo

Microorganismo	Referencia			Alternativo		
	agar dextrosa de Sabouraud			CromoCen CND-C		
	Requisito			Requisito		
	Crecimiento	Color y morfología colonial	Resultado	Crecimiento	Color y morfología colonial	Resultado
<i>E. aerogenes</i>	escaso	crema, traslúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>E. faecalis</i>	escaso	crema, traslúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>E. coli</i>	escaso	crema, traslúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>E. coli</i> (aislada)	escaso	crema, traslúcida con precipitado biliar	conforme	de inhibido a escaso	crema, traslúcida con precipitado biliar	conforme
<i>K. pneumoniae</i>	escaso	crema, mucoide	conforme	inhibido	-	conforme
<i>P. vulgaris</i>	escaso	crema, traslúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>P. aeruginosa</i>	bueno	crema-verdoso, semitransparente, plana, irregular y fluorescencia verde a 366 nm	conforme	bueno	crema-verdoso, semitransparente, plana, irregular y fluorescencia verde a 366 nm	conforme
<i>S. Typhimurium</i>	escaso	crema, traslúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>S. flexneri</i>	escaso	crema, traslúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>S. aureus</i>	escaso	crema	conforme	inhibido	-	conforme

Teniendo en cuenta el número de placas con crecimiento positivo por ambos métodos, el análisis estadístico reveló un valor de 1,273 UFC/mL del límite de detección para el método de referencia con un límite inferior de 0,668 y un límite superior de 2,424. En tanto que el método alternativo mostró un valor de 0,870 UFC/mL entre un intervalo de 0,457 al 1,657 de límite inferior y superior, respectivamente.

Para ambos métodos coincidió que el nivel de detección relativa se localiza entre los mismos niveles de contaminación representados por el nivel<sub>3</sub> (1 UFC/mL) y el nivel<sub>4</sub> (1,5 UFC/mL), donde se apreció menos y más del 50% de los resultados positivos, respectivamente. Los valores indican que el método alternativo posee una mayor sensibilidad para detectar el analito, ya que el límite de detección fue ligeramente inferior al obtenido por el método de referencia.

La prueba de hipótesis para determinar la igualdad de los niveles de detección se muestra en la tabla 3.25. Se estructuraron las tablas de contingencias 2 x 2 para el cálculo de la prueba exacta de Fisher teniendo en cuenta el nivel<sub>4</sub> (1,5 UFC/mL), donde se encontraron los valores con resultados positivos igual y mayor al 50% de detección. Para el método de referencia el número de placas con resultados positivos fue 5 y para el método alternativo 8, lo que representó una población de resultados positivos de 13 placas entre ambos procedimientos ( $F_{TP}=6,2270 \times 10^9$ ). El valor de los resultados negativos se comportó entre 5 y 2 placas en cada procedimiento, respectivamente, lo que resultó en un total de 7 placas ( $F_{TN}=5040$ ). El total de resultados analizados para cada método fue de 10 placas ( $F_{TR}=F_{TA}=3,6288 \times 10^6$ ) mostrando la constante del producto de factoriales  $PF_1=4,1327 \times 10^{26}$ . El total de resultados positivos y negativos de la población, que fue de 20 placas ( $F_{TT}=2,4329 \times 10^{18}$ ).

La suma total de las probabilidades para cada combinación resultó igual a 1,0; cifra superior al 0,05 establecido como nivel de confianza por lo que se concluye que los métodos poseen igual nivel de detección relativo.

Durante el examen de las publicaciones científicas no se hallaron informaciones en cuanto a la determinación de este parámetro para *Candida* spp. en ninguno de los medios cromogénicos, aunque sí de la sensibilidad analítica, indicador al cual el límite de detección está estrechamente relacionado al aplicar otras técnicas diagnósticas. Por ejemplo, Trépanier y col. (2001) y, más adelante en el 2007, De Marco y col. coincidieron en que el límite de detección de la técnica

**Tabla 3.24.** Resultados del límite de detección relativo

Nivel	UFC/mL	Referencia										Pc/Pt	Alternativo										Pc/Pt
1	0,004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10
2	0,100	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10
3	1,000	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/10
4	1,500	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	5/10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	8/10
5	2,000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	6/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
6	4,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	9/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
7	10,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Límite de detección (50% UFC/mL)		1,273											0,87										
Lím. inferior – Lím. superior		0,668 - 2,424											0,457 - 1,657										

(+): crecimiento positivo, (-): crecimiento negativo, Pc/Pt: número de placas con crecimiento positivo/total de placas del nivel

**Tabla 3.25.** Prueba de hipótesis para corroborar igualdad de los niveles de detección

Combinación		Tabla de contingencias		Factorial				PF <sub>2</sub>	P
		Referencia	Alternativo	F <sub>SPR</sub>	F <sub>SPA</sub>	F <sub>SNR</sub>	F <sub>SNA</sub>		
I	SP/ SN	3/7	10/0	6	3,6288×10 <sup>6</sup>	5040	1	2,6697×10 <sup>-29</sup>	0,0015
II	SP/ SN	4/6	9/1	24	3,6288×10 <sup>5</sup>	720	1	1,5256×10 <sup>-28</sup>	0,0271
III	SP/ SN	5/5	8/2	120	40320	120	2	2,8251×10 <sup>-27</sup>	0,1463
IV	SP/ SN	6/4	7/3	720	5040	24	6	1,2713×10 <sup>-27</sup>	0,3251
V	SP/ SN	7/3	6/4	5040	720	6	24	1,2713×10 <sup>-27</sup>	0,3251
VI	SP/ SN	8/2	5/5	40320	120	2	120	2,8251×10 <sup>-27</sup>	0,1463
VII	SP/ SN	9/1	4/6	3,6288×10 <sup>5</sup>	24	1	720	1,5256×10 <sup>-28</sup>	0,0271
VIII	SP/ SN	10/0	3/7	3,6288×10 <sup>6</sup>	6	1	5040	2,6697×10 <sup>-29</sup>	0,0015
Total									1,0000

SP: suma de los positivos, SN: suma de los negativos, F<sub>SPR</sub>: factorial de SP por el método de referencia (MR), F<sub>SPA</sub>: factorial de SP por el método alternativo (MA), F<sub>SNR</sub>: factorial de SN por MR, F<sub>SNA</sub>: factorial de SN por MA y F<sub>TT</sub>: factorial de todas las SP y SN del MR y MA, PF: producto de los factoriales, P: probabilidad

molecular (PCR) para la detección de *Candida* resultó de 20 UFC/mL de muestra. No obstante, Colom y col (2006) resumen diversos métodos moleculares de diagnóstico que muestran claramente una mayor sensibilidad que el cultivo (1-15 UFC/mL), los cuales tienen como diana las secuencias de los genes ribosomales. Por otro lado, en la validación de un kit de vaginitis, diseñado sobre la base de la agregación de partículas de látex acopladas a anticuerpos específicos, el límite de detección para *C. albicans* resultó mayor que  $1 \times 10^6$  UFC/mL (Betancourt *et al.*, 2009), valores todos muy superiores al calculado para CromoCen CND-C y para el agar dextrosa de Sabouraud. De esta manera, con el nuevo método cromogénico se garantiza la recuperación de *Candida* a muy bajas concentraciones, con amplias posibilidades para evaluar los líquidos corporales infectados que comúnmente son estériles.

### **3.5.1.3 Nivel crítico y límite de cuantificación del método de referencia y el método alternativo**

En la tabla 3.26 se observa que el nivel con 0,1 UFC/mL fue el mínimo que permitió realizar el recuento microbiano por ambos procedimientos, alcanzando resultado positivo sólo en una placa de las 10 inoculadas. Se realizó el análisis estadístico, determinando para este nivel los valores de las variables  $V_0$ ,  $S_0$  y  $X_0$ , siendo esta última necesaria para adicionarla a las expresiones matemáticas definidas para el método alternativo (Tabla 3.27). El LC calculado para los métodos coincidió y resultó igual a 0,5202 UFC/mL. Este valor expresa la menor cantidad que puede ser detectada en las concentraciones más bajas del analito, pero no cuantificada como valor exacto y se considera que por debajo del mismo no hay seguridad de que el real no sea nulo (ISO 16140, 2003).

Del mismo modo, los resultados del LOQ reflejaron cifras equivalentes en ambos métodos evaluados e igual a 3,1623 UFC/mL. Estos valores representan la menor cantidad del recuento microbiano que puede ser medida cuantitativamente con precisión y exactitud. Los dos procedimientos muestran valores cercanos al LOQ teórico igual a 3 UFC/mL. Es significativo que no se encontró referencia alguna, en la literatura consultada, en cuanto a la determinación de estos indicadores para el género *Candida*. Estos resultados confirman la utilidad del método para la cuantificación de *Candida* a muy bajas concentraciones, en líquidos como la orina.

**Tabla 3.26.** Recuentos obtenidos por placa para cada nivel de inoculación utilizando ambos métodos

Nivel	UFC/mL	Referencia										Alternativo									
0	0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2	1,000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	1,500	0	0	0	2	1	0	0	4	1	1	0	4	1	1	2	0	2	2	1	2
4	1,750	1	4	1	1	2	0	1	0	2	1	0	1	3	3	0	2	0	0	3	1
5	2,000	3	0	3	2	0	2	1	4	0	0	1	2	1	2	3	2	1	1	1	1
6	4,000	0	1	5	2	2	4	2	5	5	3	3	3	3	2	4	3	1	2	5	4
7	10,00	7	3	7	7	3	2	4	2	7	5	2	4	3	2	3	6	3	2	7	3

**Tabla 3.27.** Resultados del nivel crítico y el límite de cuantificación para los métodos de ensayo

Placa No.	Referencia		Alternativo	
	$X_{iR}$	$(X_i - X_m)^2$	$X_{iA}$	$(X_i - X_m)^2$
1	0	0,0100	0	0,0100
2	0	0,0100	0	0,0100
3	0	0,0100	1	0,8100
4	0	0,0100	0	0,0100
5	1	0,8100	0	0,0100
6	0	0,0100	0	0,0100
7	0	0,0100	0	0,0100
8	0	0,0100	0	0,0100
9	0	0,0100	0	0,0100
10	0	0,0100	0	0,0100
	$X_m=0,1$	$SDC_R=0,9000$	$X_m=0,1$	$SDC_A=0,9000$
	$X_0=0$	$V_0=0,1000$	$X_0=0$	$V_0=0,1000$
		$S_0=0,3162$		$S_0=0,3162$
	<b>LC (nivel crítico)</b>		0,5202	0,5202
	<b>LOQ (límite de cuantificación)</b>		3,1623	3,1623

$X_i$ : recuento de UFC/placa,  $X_m$ : media de los recuentos,  $(X_i - X_m)^2$ : diferencia cuadrática (DC), SDC: suma de las diferencias cuadráticas,  $X_0$ : mediana de los valores,  $V_0$ : varianza del recuento,  $S_0$ : desviación estándar

#### 3.5.1.4 Límite de determinación de los métodos de referencia y alternativo

El LD para ambos métodos resultó de 3,1972 y 3,3663 UFC/mL, respectivamente, teniendo en cuenta una sobredispersión de 0,0588 y 0,0973 UFC/mL, resultados considerados como semejantes (Tabla 3.28). Este parámetro representa el valor mínimo que puede ser determinado por el método y constituye la cifra más cercana al valor real.

#### 3.5.1.5 Robustez de los métodos a diferentes temperaturas de incubación

Lightfoot y Maier (1998) definieron la robustez de un método como el efecto de los cambios en el ambiente de ensayo sobre los resultados obtenidos, o sea, su efecto sobre la incertidumbre. Corry y col. (2007) abordaron las distintas fuentes de incertidumbres en los métodos microbiológicos sobre la base del recuento de colonias, destacando la influencia de la temperatura y del tiempo de incubación sobre la dispersión de los resultados. Hasta el presente, no se han encontrado referencias sobre la determinación de la robustez para métodos de recuentos de *Candida* en clínica. Sin embargo, para la acreditación de los laboratorios, de acuerdo a la norma ISO 17025:1999, su determinación constituye un requisito indispensable.

Los resultados del tratamiento estadístico de los datos obtenidos aplicando el método de referencia se muestran en la tabla 3.29 y para el método alternativo en la tabla 3.30. Los valores de la *t* de Student, calculados para cada par de temperatura [(28-35°C), (35-42°C), (28-42°C)] y para ambos métodos, resultaron inferiores al valor teórico (1,7341), demostrando su robustez en todo el intervalo de 28 a 42°C. A su vez, con estos valores de la *t* calculada y los grados de libertad se calculó la distribución (*p*), y ésta resultó superior al NC, lo que corroboró que para ambos métodos evaluados no existen diferencias entre las temperaturas.

Este resultado de la robustez en la temperatura garantiza que los medios de cultivo, ADS y CromoCen CND-C, pueden ser utilizados en el laboratorio para las técnicas de cultivo y aislamiento primario, así como para la discriminación de especies de acuerdo a la sensibilidad de las mismas, al ser incubadas a elevadas temperaturas (42-45°C), como el caso de la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Estos resultados constituyen el primer reporte, en Cuba, de determinación de la incertidumbre de las mediciones microbiológicas en métodos, para el recuento de *Candida*, destinados al diagnóstico clínico y facilitan la introducción del mismo en la rutina de los servicios microbiológicos nacionales.

**Tabla 3.28.** Límite de determinación introduciendo el factor de sobredispersión para ambos procedimientos

Placa No.	Referencia			Alternativo		
	$X_{iR}$	$X_{MLR}$	DC	$X_{iA}$	$X_{MLA}$	DC
1	98	$4,90 \times 10^6$	$3,60 \times 10^9$	84	$4,20 \times 10^6$	$50,41 \times 10^{10}$
2	97	$4,85 \times 10^6$	$1,00 \times 10^8$	101	$5,05 \times 10^6$	$1,96 \times 10^{10}$
3	103	$5,15 \times 10^6$	$9,61 \times 10^{10}$	95	$4,75 \times 10^6$	$2,56 \times 10^{10}$
4	90	$4,50 \times 10^6$	$11,56 \times 10^{10}$	101	$5,05 \times 10^6$	$1,96 \times 10^{10}$
5	97	$4,85 \times 10^6$	$1,00 \times 10^8$	110	$5,50 \times 10^6$	$34,81 \times 10^{10}$
6	90	$4,50 \times 10^6$	$11,56 \times 10^{10}$	106	$5,30 \times 10^6$	$15,21 \times 10^{10}$
7	99	$4,95 \times 10^6$	$1,21 \times 10^{10}$	107	$5,35 \times 10^6$	$19,36 \times 10^{10}$
8	103	$5,15 \times 10^6$	$9,61 \times 10^{10}$	104	$5,20 \times 10^6$	$8,41 \times 10^{10}$
9	88	$4,40 \times 10^6$	$19,36 \times 10^{10}$	83	$4,15 \times 10^6$	$57,76 \times 10^{10}$
10	103	$5,15 \times 10^6$	$9,61 \times 10^{10}$	91	$4,55 \times 10^6$	$12,96 \times 10^{10}$
		$X_m = 4,84 \times 10^6$	$SDC = 72,90 \times 10^{10}$			$X_m = 4,91 \times 10^6$
			$V_0 = 8,10 \times 10^{10}$			
			$S_0 = 28,4604 \times 10^4$			
<b>u</b> (factor de sobredispersión)		<b>0,0588</b>		<b>0,0973</b>		
<b>LD</b> (límite de determinación)		<b>3,1972</b>		<b>3,3663</b>		

$X_i$ : recuento de UFC/placa,  $X_{ML}$ : recuento de UFC/mL,  $X_m$ : media de los recuentos,  $X_{ML}$ , DC: diferencia de cuadrados, SDC: suma de las diferencias de cuadrados,  $V_0$ : varianza del recuento,  $S_0$ : desviación estándar

**Tabla 3.29.** Análisis de la robustez del método de referencia a tres temperaturas de incubación

Método de referencia																
T1= 28°C				V <sub>T1</sub>	V <sub>A</sub> (T1 y T2)	T2= 35°C			V <sub>T2</sub>	V <sub>A</sub> (T2 y T3)	T3= 42°C			V <sub>T3</sub>	V <sub>A</sub> (T1 y T3)	
Placa No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>			
1	46	49	47,5	113,9868	125,2184	50	49	49,5	136,4500	178,5987	58	60	59,0	220,7474	167,3671	
2	51	51	51,0			35	36	35,5			37	37	37,0			
3	55	54	54,5			69	70	69,5			53	56	54,5			
4	34	33	33,5			66	68	67,0			75	77	76,0			
5	64	66	65,0			58	60	59,0			57	61	59,0			
6	36	34	35,0			66	73	69,5			56	57	56,5			
7	66	65	65,5			69	71	70,0			20	20	20,0			
8	47	48	47,5			47	49	48,0			42	41	41,5			
9	40	41	40,5			48	49	48,5			56	57	56,5			
10	47	48	47,5			60	64	62,0			47	47	47,0			
PM <sub>T1</sub> = 48,75			D <sub>1</sub> =1,4625			PM <sub>T2</sub> = 57,85			D <sub>2</sub> =1,7355			PM <sub>T3</sub> = 50,70			D <sub>3</sub> =1,5210	
t <sub>(T1yT2)</sub> = 1,5262			p=0,0722			t <sub>(T2yT3)</sub> = 0,9060			p=0,1885			t <sub>(T1yT3)</sub> = 0,0741			p=0,4709	
p>NC=0,05 No hay diferencias entre las temperaturas que se comparan																
t <sub>calculada</sub> ≤ t <sub>teórica</sub> =1,7341 Hay robustez entre las temperaturas que se comparan																

T: temperatura, X<sub>1</sub>: primer recuento (UFC/placa), X<sub>2</sub>: segundo recuento (UFC/placa), X<sub>m</sub>: media de los recuentos, V<sub>T</sub>: varianza de los recuentos de cada temperatura, V<sub>A</sub>: varianza agrupada entre dos temperaturas, PM<sub>T</sub>: valor medio de la media de los recuentos, D: 3% del valor medio, t<sub>(T1yT2)</sub>: t de Student calculada entre dos temperaturas, p: distribución dependiente de t<sub>calculada</sub>, gL=18 y nivel de confianza (NC=0,05)



**Tabla 3.30.** Análisis de la robustez del método de alternativo a tres temperaturas de incubación

Método alternativo																
T1= 28°C				V <sub>T1</sub>	V <sub>A</sub> (T1 y T2)	T2= 35°C			V <sub>T2</sub>	V <sub>A</sub> (T2 y T3)	T3= 42°C			V <sub>T3</sub>	V <sub>A</sub> (T1 y T3)	
Placa No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>			
1	85	86	85,5	160,3447	213,3447	29	30	29,5	266,3447	192,7237	55	55	55,0	119,1026	139,7237	
2	66	69	67,5			75	75	75,0			75	76	75,5			
3	79	79	79,0			49	50	49,5			67	69	68,0			
4	87	92	89,5			56	57	56,5			44	44	44,0			
5	60	61	60,5			83	83	83,0			73	75	74,0			
6	87	96	91,5			60	62	61,0			78	79	78,5			
7	69	69	69,0			54	54	54,0			68	68	68,0			
8	73	72	72,5			62	62	62,0			75	75	75,0			
9	52	52	52,0			81	83	82,0			80	79	79,5			
10	65	68	66,5			46	46	46,0			66	68	67,0			
PM <sub>T1</sub> = 73,35				D <sub>1</sub> =2,2005		PM <sub>T2</sub> = 59,85				D <sub>2</sub> =1,7955		PM <sub>T3</sub> = 68,45			D <sub>3</sub> =2,0535	
t <sub>(T1yT2)</sub> = 1,7298				p=0,0504		t <sub>(T2yT3)</sub> = 1,0960				p=0,1438		t <sub>(T1yT3)</sub> = 0,5385			p=0,2984	
p>NC=0,05 No hay diferencias entre las temperaturas que se comparan																
t <sub>calculada</sub> ≤ t <sub>tabla</sub> =1,7341 Hay robustez entre las temperaturas que se comparan																

T: temperatura, X<sub>1</sub>: primer recuento (UFC/placa), X<sub>2</sub>: segundo recuento (UFC/placa), X<sub>m</sub>: media de los recuentos, V<sub>T</sub>: varianza de los recuentos de cada temperatura, V<sub>A</sub>: varianza agrupada entre dos temperaturas, PM<sub>T</sub>: valor medio de la media de los recuentos, D: 3% del valor medio, t<sub>(T1yT2)</sub>: t de Student calculada entre dos temperaturas, p: distribución dependiente de t<sub>calculada</sub>, gL=18 y nivel de confianza (NC=0,05)

### **3.5.1.6 Resultados del estudio de la robustez de los métodos a diferentes períodos de incubación**

En el método de referencia con ADS (Tabla 3.31), los recuentos no se comportan con igual consistencia en los intervalos comparados entre 36 y 48 h, así como 36 y 72 h. Se encontró que la placa número 5 mostró, en ambas situaciones, un coeficiente de variación de 19%. De acuerdo a lo que se establece en la norma ISO/TR 13843 (2000), si sólo uno de los valores analizados resulta mayor que el 4%, se considera que el método no es robusto en ese intervalo de temperatura de incubación. No obstante, sí se encontró robustez en el período de 48 y 72 h, lo que coincide con el recomendado para la utilización de este medio de cultivo (Merck, 2006).

En la tabla 3.32 se muestra el análisis para el método alternativo con CromoCen CND-C. En este caso, el cálculo del coeficiente de variación para todos los valores en cada intervalo de tiempo analizado se encontró por debajo del 4%. Esto reflejó que el método es robusto para todos los períodos de incubación estudiados y confirma que el mismo puede ser empleado con seguridad para el cultivo y aislamiento de los microorganismos de interés en un período mínimo de 36 h.

### **3.5.1.7 Proporcionalidad del volumen de los métodos de referencia y alternativo**

En la tabla 3.33 se indica que el índice general de proporcionalidad resultó para el método de referencia igual a 25,7973, y para el método alternativo de 16,9906, ambos valores menores que la distribución teórica de  $\chi^2$  (31,2641), por lo que los procedimientos garantizan la linealidad general de sus resultados, verificándose para el método de referencia en el intervalo de 19-203 UFC/mL y para el método alternativo de 25-194 UFC/mL.

Entre las publicaciones revisadas no se han encontrado evidencias del cálculo de la linealidad o proporcionalidad del volumen de inóculo para medios cromogénicos diseñados para el recuento de las levaduras. La relevancia de este resultado se evidencia en las posibilidades que tienen los métodos, y en especial el cromogénico alternativo, de poder ser utilizado como un medio para el recuento de *Candida* en muestras clínicas, como es el caso de los urocultivos.

### **3.5.1.8 Evaluación de la capacidad diagnóstica del medio CromoCen CND-C a partir de cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes**

Los resultados obtenidos de las 505 cepas aisladas evaluadas, al utilizar el método de referencia y el método cromogénico alternativo, mostraron una coincidencia total en la recuperación de

**Tabla 3.31.** Análisis de la robustez del tiempo de incubación en el método de referencia

Método de referencia												
Placa No.	Recuento, UFC/placa			Intervalo de comparación								
	X <sub>H1</sub> (36 h)	X <sub>H2</sub> (48 h)	X <sub>H3</sub> (72 h)	36 y 48 h			48 y 72 h			36 y 72 h		
				X <sub>m</sub>	V	CV (%)	X <sub>m</sub>	V	CV (%)	X <sub>m</sub>	V	CV (%)
1	50	49	48	49,5	0,25	1	48,5	0,25	1	49,0	1,00	2
2	36	36	36	36,0	0,00	0	36,0	0,00	0	36,0	0,00	0
3	70	70	68	70,0	0,00	0	69,0	1,00	1	69,0	1,00	1
4	68	68	68	68,0	0,00	0	68,0	0,00	0	68,0	0,00	0
5	67	60	60	63,5	12,25	19	60,0	0,00	0	63,5	12,25	19
6	72	73	73	72,5	0,25	0	73,0	0,00	0	72,5	0,25	0
7	70	71	71	70,5	0,25	0	71,0	0,00	0	70,5	0,25	0
8	49	49	48	49,0	0,00	0	48,5	0,25	1	48,5	0,25	1
9	48	49	48	48,5	0,25	1	48,5	0,25	1	48,0	0,00	0
10	62	64	65	63,0	1,00	2	64,5	0,25	0	63,5	2,25	4
Resultado del intervalo				No robusto			Robusto			No robusto		

X<sub>H</sub>: recuento para cada tiempo de ensayo, X<sub>m</sub>: media de los recuentos, V: varianza de los recuentos de dos tiempos, CV: coeficiente de variación en el intervalo de comparación de dos tiempos

**Tabla 3.32.** Análisis de la robustez del tiempo de incubación en el método alternativo

Método alternativo												
Placa No.	Recuento, UFC/placa			Intervalo de comparación								
				36 y 48 h			48 y 72 h			36 y 72 h		
	X <sub>H1</sub> (36 h)	X <sub>H2</sub> (48 h)	X <sub>H3</sub> (72 h)	X <sub>m</sub>	V	CV (%)	X <sub>m</sub>	V	CV (%)	X <sub>m</sub>	V	CV (%)
1	29	30	29	29,5	0,25	1	29,5	0,25	1	29,0	0,00	0
2	75	75	75	75,0	0,00	0	75,0	0,00	0	75,0	0,00	0
3	51	50	50	50,5	0,25	0	50,0	0,00	0	50,5	0,25	0
4	56	57	56	56,5	0,25	0	56,5	0,25	0	56,0	0,00	0
5	82	83	85	82,5	0,25	0	84,0	1,00	1	83,5	2,25	3
6	62	62	61	62,0	0,00	0	61,5	0,25	0	61,5	0,25	0
7	54	54	54	54,0	0,00	0	54,0	0,00	0	54,0	0,00	0
8	63	62	62	62,5	0,25	0	62,0	0,00	0	62,5	0,25	0
9	82	83	83	82,5	0,25	0	83,0	0,00	0	82,5	0,25	0
10	45	46	45	45,5	0,25	1	45,5	0,25	1	45,0	0,00	0
Resultado del intervalo				Robusto			Robusto			Robusto		

X<sub>H</sub>: recuento para cada tiempo de ensayo, X<sub>m</sub>: media de los recuentos, V: varianza de los recuentos de dos tiempos, CV: coeficiente de variación en el intervalo de comparación de dos tiempos

**Tabla 3.33.** Análisis de la proporcionalidad o linealidad del método de referencia y el método alternativo con diferentes volúmenes

Ensayo	V <sub>ML</sub> , mL	V <sub>R</sub>	Método de referencia							Método alternativo						
			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	T <sub>X</sub>	T <sub>R</sub>	ln(T <sub>R</sub> )	R	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	T <sub>X</sub>	T <sub>R</sub>	ln(T <sub>R</sub> )	R
1	0,05	1	15	29	19	63	63,00	4,143	261,018	28	26	27	81	81,00	4,394	355,950
2	0,05	1	16	24	17	57	57,00	4,043	230,454	20	35	21	76	76,00	4,331	329,136
3	0,05	1	15	36	26	77	77,00	4,344	334,473	34	32	31	97	97,00	4,575	443,747
4	0,10	2	49	66	53	168	84,00	4,431	744,377	49	39	50	138	69,00	4,234	584,307
5	0,10	2	70	57	65	192	96,00	4,564	876,355	42	44	54	140	70,00	4,249	594,789
6	0,10	2	52	39	51	142	71,00	4,263	605,301	49	57	46	152	76,00	4,331	658,272
7	0,20	4	96	91	94	281	70,25	4,252	1194,829	105	102	102	309	77,25	4,347	1343,238
8	0,20	4	105	86	113	304	76,00	4,331	1316,543	84	89	94	267	66,75	4,201	1121,655
9	0,20	4	89	110	96	295	73,75	4,301	1268,701	89	87	99	275	68,75	4,231	1163,381
10	0,40	8	206	216	186	608	76,00	4,331	2633,086	195	186	164	545	68,12	4,221	2300,633
11	0,40	8	162	188	197	547	68,37	4,225	2311,079	188	160	194	542	67,75	4,216	2284,977
12	0,40	8	193	189	208	590	73,75	4,301	2537,402	190	182	210	582	72,75	4,287	2495,051
<b>Total</b>		<b>45</b>	<b>3324</b>							<b>3204</b>						
<b>G<sub>n-1</sub><sup>2</sup></b>			<b>25,7973</b>							<b>16,9906</b>						

$$\chi^2 = 31,2641 \text{ } (\alpha=0,1\% \text{ y gl}=11)$$

**G<sub>n-1</sub><sup>2</sup> <  $\chi^2$  Garantiza la linealidad en el rango 19-203 UFC/mL**

**G<sub>n-1</sub><sup>2</sup> <  $\chi^2$  Garantiza la linealidad en el rango 25-194 UFC/mL**

V<sub>ML</sub>: volumen del inóculo por placa, V<sub>R</sub>: volumen relativo, X: recuento de las tres réplicas (UFC/placa), T<sub>X</sub>: suma del recuento de las réplicas, T<sub>R</sub>: recuento relativo respecto al volumen, R: variable de proporcionalidad, G<sub>n-1</sub><sup>2</sup>: índice de proporcionalidad del método

383 cepas con características propias del género *Candida* (Tabla 3.34). Así mismo, se encontró que 122 cepas fueron consideradas como resultados negativos con relación a su identificación dentro del género de interés después de 48 h de incubación a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por ambos procedimientos, por lo que los parámetros de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, así como la eficiencia, muestran valores de un 100% cada uno de ellos, con un intervalo de confianza del 99 al 100%.

El análisis de la sensibilidad relativa demostró que el método alternativo posee la habilidad de revelar el microorganismo diana, al igual que es detectado por el método de referencia en una muestra infectada, ya que los resultados obtenidos no difieren entre ambos procedimientos. A su vez, el indicador de la especificidad expresó que el método cromogénico es capaz de descartar un microorganismo no diana, es decir, mide exactamente dentro de una muestra los microorganismos no diana, al igual que el método de referencia.

La exactitud relativa y la eficiencia son parámetros estrechamente relacionados y su análisis permite valorar el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por cada método al analizar la misma muestra. Estos indicadores reflejan que la proporción de resultados positivos, confirmados por el método cromogénico, no mostró diferencias con respecto a los alcanzados por el método de referencia. Ello garantiza que el nuevo método cromogénico es capaz de detectar o recobrar, de forma precisa, el microorganismo diana (especies del género *Candida*) presente en una muestra infectada.

La razón de los falsos positivos y de los falsos negativos resultó igual a cero, debido a que no se encontraron desviaciones positivas ni desviaciones negativas entre ambos métodos. Estos hallazgos coinciden con los valores de recuperación divulgados en la mayoría de las evaluaciones realizadas con los medios cromogénicos de mayor difusión en el mercado (CHROMagar *Candida* y *Candida* ID) (Freydiere *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2001; Mesa *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005). Los autores reportaron valores del 100% de promoción del crecimiento de *Candida*, sin embargo Fricker-Hidalgo y col. (2001) detectaron que este indicador resultó del 91,2 al 95,5% en los medios Albicans ID, *Candida* ID y ADS con cloranfenicol.

El índice Kappa, que considera el conjunto de todas las discrepancias y concordancias entre los métodos, resultó igual a 1, indicador que, según la norma ISO 16140 (2003), representa la

fortaleza del método alternativo en comparación con el estándar para promover el cultivo de los microorganismos diana y se interpreta como “casi perfecta”.

El análisis de la selectividad del método alternativo mostró un valor de -0,12, siendo el requisito mayor e igual a -1. Este parámetro garantiza que la señal detectada está dada sólo a los microorganismos diana. Freydiere y col. (2000) encontraron una selectividad de Candida ID de 5 cepas bacterianas de un total de 131 especímenes evaluados, lo que representa una selectividad de -0,79; valor inferior al nivel logrado por CromoCen CND-C.

Las cepas evaluadas fueron clasificadas según su procedencia en cuatro conjuntos: vaginales, óticos, hemocultivos y otros; y se encontró que las dos metodologías mostraron acuerdo total en el recobrado de las especies en cada origen analizado y el cálculo de la exactitud relativa resultó del 100% (IC=99-100%) (Tabla 3.35). Los resultados expresan que tanto el método de referencia como el alternativo fueron capaces de promover el cultivo de 220 cepas de interés y descartar un total de 107 cepas que no corresponden con especies del género *Candida*, a partir de los aislados de exudados vaginales. Se demostró que todas las cepas aisladas de muestras de origen ótico y hemocultivos correspondían con especies de *Candida*, encontrándose acuerdos en el recobrado de 58 y 30 especies de cada origen por las dos metodologías. En la categoría de “otros”, se logró, por ambos procedimientos, de forma coincidente, la recuperación de 75 cepas microbianas y la supresión de otras 15 no dianas.

La identificación de las especies de *Candida*, utilizando la metodología de referencia (Tabla 3.36), mostró que el número de cepas de cada especie identificada concuerda con el valor de las recuperadas por el nuevo método (n=383) (Tabla 3.34). Se destacó la distribución de las especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la más frecuente 41,5% (n=159), en segundo orden *C. parapsilosis* 16% (n=61) y consecutivamente *C. glabrata* 13,3% (n=51), *C. guilliermondii* 9,4% (n=36), *C. tropicalis* 7,6% (n=29), *C. krusei* 6,5% (n=25), *C. lusitaniae* 3,13% (n=12), *C. kefyr* 1,6% (n=6) y en menor medida, por debajo de 1%, las especies *C. inconspicua*, *C. famata*, *C. dubliniensis* y *C. rugosa*. Investigaciones ejecutadas por otros autores, utilizando cepas aisladas de muestras clínicas sembradas en medios cromogénicos, reflejaron una prevalencia de *C. albicans* del 74% para las procedentes de exudados vaginales y del 33% provenientes de hemocultivos (Gatica *et al.*, 2002; Ballesté *et al.*, 2005).

**Tabla 3.34.** Parámetros diagnósticos del CromoCen CND-C para promover el cultivo de cepas aisladas del género *Candida*

Referencia		Alternativo		
SP	383	383		
SN	122	122		
	AP	DP	AN	DN
	383	0	122	0
SR, %	100,00			
EsR, %	100,00			
ExR, %	100,00			
E, %	100,00	IC: 99,00 – 100,00%		
Kappa	1,00	Casi perfecta		
F	-0,12			

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, AP: acuerdos positivos, DP: desvíos positivos, AN: acuerdos negativos, DN: desvíos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, E: eficacia, F: selectividad, IC: intervalo de confianza

**Tabla 3.35.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas del medio utilizando cepas aisladas de varios orígenes

Análisis por origen				
	Vaginal	Ótico	Hemocultivo	Otros
AP	220	58	30	75
AN	107	0	0	15
SR, %	100,00	100,00	100,00	100,00
EsR, %	100,00	-	-	100,00
ExR, %	100,00	100,00	100,00	100,00
IC: 99,00 – 100,00%				

**Tabla 3.36.** Total de especies de *Candida* identificadas utilizando el método de referencia

Microorganismo	SN	SP	ExR, %
<i>C. albicans</i>	0	159	100,00
<i>C. parapsilosis</i>	0	61	100,00
<i>C. glabrata</i>	0	51	100,00
<i>C. guilliermondii</i>	0	36	100,00
<i>C. tropicalis</i>	0	29	100,00
<i>C. krusei</i>	0	25	100,00
	361		
Total	383		

Microorganismo	SN	SP	ExR, %
<i>C. lusitaniae</i>	0	12	100,00
<i>C. kefyr</i>	0	6	100,00
<i>C. inconspicua</i>	0	1	100,00
<i>C. famata</i>	0	1	100,00
<i>C. dubliniensis</i>	0	1	100,00
<i>C. rugosa</i>	0	1	100,00
	22		

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, ExR: exactitud relativa



Al evaluar el desempeño del método cromogénico alternativo para la identificación de especies de *Candida* se encontró que éste permitió reconocer por sus características coloniales las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* y *C. krusei*, con una correspondencia total de resultados positivos y negativos por ambos métodos, al lograr identificar las 159 cepas de *C. albicans* y excluir un total de 346 cepas diferentes a *C. albicans*. Así mismo, se distinguieron 29 cepas de *C. tropicalis*, 6 de *C. kefyr* y 25 de *C. krusei* (Tabla 3.37). La no existencia de desviaciones negativas y positivas y el reporte de los acuerdos positivos y negativos, permitieron calcular los parámetros de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas que resultaron todos 100% (IC=99-100%).

La evaluación de desempeño diagnóstico del medio CHROMagar Candida, por Ballesté y col. (2005), reflejó la utilidad del mismo para la identificación de *C. albicans* (97,4%), *C. tropicalis* (100%) y no así para *C. glabrata* (86,9%), ya que las cepas de esta última muestran colonias de igual color que otras especies aisladas resultando su identificación ambigua y confusa. A su vez, la especificidad en la identificación de *C. krusei* resultó del 66%, debido a la cantidad de falsos positivos encontrados. Li-Ung y col. (2001) hallaron, al utilizar este medio cromogénico, una sensibilidad y especificidad para *C. albicans* y *C. krusei* del 100%, así como alrededor del 97 y 98%, para ambos parámetros, respectivamente, para las especies *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Dado a la amplia utilización internacional alcanzada por la identificación de tres a cuatro especies de *Candida*, del medio CHROMagar Candida y su elevada exactitud diagnóstica, es de esperar que el nuevo medio CromoCen CND-C, el cual es capaz de identificar un mayor número de especies (cinco) con una elevada exactitud diagnóstica, tenga una elevada aceptación en la red de laboratorios de microbiología en el país.

El índice Kappa mostró valores de 1 para las cuatro especies de *Candida* identificadas y superior a lo reportado por Ballesté y col. (2005) en CHROMagar Candida (0,71 para *C. tropicalis*, 0,79 para *C. krusei* y 0,86 para *C. albicans*), lo que demostró la concordancia entre los métodos y la fortaleza del método alternativo para la identificación de especies de *Candida*. La selectividad para *C. albicans* resultó de -0,5, por lo que el método alternativo puede ser utilizado para detectar esta especie entre otras del mismo género o de otros microorganismos que se espera que el medio sea capaz de inhibir.

En la tabla 3.38 se presenta la distribución de las especies identificadas según su origen, reconociendo que *C. albicans* mostró una incidencia de un 35,5% (n=116) en los exudados vaginales, 25,9% (n=15) en los exudados óticos, 10% (n=3) en los hemocultivos y 27,8% (n=25) cuando procede de otros orígenes. *C. tropicalis* manifestó una frecuencia del 5,2% (n=17) entre los exudados vaginales, 1,7% (n=1) entre los exudados óticos y 12,2% (n=11) para otros orígenes. La especie *C. kefyr* no se detectó en muestras de origen vaginal, ni en hemocultivos, pero reflejó un 1,7% (n=1) en exudados óticos y 5,5% (n=5) en la categoría de “otros”. Por último, *C. krusei* mostró un 5,5% (n=18) en vaginales, 6,9% (n=4) en óticos, 3,3% (n=1) en hemocultivos y 2% (n=2) en muestras pertenecientes a otros orígenes. El análisis comparativo de los resultados para la identificación de las especies aisladas por ambas metodologías resultó equivalente, lo que reflejó valores de un 100% para los parámetros diagnósticos calculados, tales como la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas.

Se corroboró, una vez más, el alcance del método cromogénico alternativo para la detección de dos grupos de especies con características similares (Tabla 3.39). El primer grupo abarca a las especies que muestran colonias de color blanco a beige, con una morfología redonda y lisa, representativo de *C. glabrata*, algunas cepas de *C. parapsilosis* y *C. rugosa*. Tanto por el método de referencia como por el alternativo, se logró la recuperación y detección de 112 cepas con tales características. En un segundo grupo, se identificó, de forma coherente, un total de 48 cepas utilizando las dos metodologías. Sin embargo, el método cromogénico fue capaz de mostrar características coloniales distintivas de las cepas aisladas, como el desarrollo de un color de rosado a rosado pálido, lo que indicó la presencia de las especies *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. famata*.

El procedimiento alternativo para estos grupos de cepas recomienda aplicar otras pruebas bioquímicas adicionales que logran la diferenciación de las especies entre sí. En la tabla 3.39 se presenta, a modo de ejemplo, la identificación de 37 cepas de *C. guilliermondii* dentro de este segundo grupo por ambos procedimientos.

Los parámetros de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas calculados mostraron valores de un 100%, con un IC del 99 al 100%. El indicador de selectividad relativa se calculó sólo para el

**Tabla 3.37.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, índice Kappa y selectividad para identificar especies a partir de cepas aisladas del género *Candida*

<i>C. albicans</i>					<i>C. tropicalis</i>				<i>C. kefyr</i>				<i>C. krusei</i>			
Referencia		Alternativo			Referencia		Alternativo		Referencia		Alternativo		Referencia		Alternativo	
SP	159	159			29	29			6	6			25	25		
SN	346	346			476	476			499	499			480	480		
	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN
	159	0	346	0	29	0	476	0	6	0	499	0	25	0	480	0
SR, %		100,00			100,00				100,00				100,00			
EsR, %		100,00			100,00				100,00				100,00			
ExR, %		100,00			100,00				100,00				100,00			
IC: 99,00 – 100,00%																
Kappa		1,00			1,00				1,00				1,00			
F		-0,5			*				*				*			

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, AP: acuerdos positivos, DP: desvíos positivos, AN: acuerdos negativos, DN: desvíos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, F: selectividad, (\*): el número mínimo de resultados para calcular la selectividad para las 505 muestras es 50, por lo tanto se puede calcular sólo para *C. albicans*

**Tabla 3.38.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas de cepas identificadas de varios orígenes

<i>C. albicans</i>					<i>C. tropicalis</i>				<i>C. kefyr</i>				<i>C. krusei</i>			
	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR
AP	116	15	3	25	17	1	0	11	0	1	0	5	18	4	1	2
AN	211	43	27	65	310	57	30	79	327	57	30	85	309	54	29	88
SR, %	100,00				100,00				100,00				100,00			
EsR, %	100,00				100,00				100,00				100,00			
ExR, %	100,00				100,00				100,00				100,00			
IC: 99.00 – 100.00%																

AP: acuerdos positivos, AN: acuerdos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, VAG: vaginales, OTI: óticos, HEM: hemocultivos, OTR: otros

grupo 1 (cepas de color blanco), resultando su valor igual a -0,65, lo que corrobora que el método cromogénico es capaz de detectar al microorganismo diana a partir de cepas aisladas. En la tabla 3.40 se muestran los resultados del análisis de estos grupos de especies de *Candida* según su origen, apreciando una frecuencia de las colonias blancas de un 16,2% (n=53) en las muestras vaginales, el 58,6% (n=34) en los óticos, 23,3% (n=7) en hemocultivos y 20% (n=18) en otros orígenes. El grupo de colonias rosadas mostró en las muestras de origen vaginal una incidencia de un 4,6% (n=15), donde *C. guilliermondii* representó el 2,4% (n=8). En los exudados óticos se encontró un 5,17% (n=3), en hemocultivos 63,3% (n=19) coincidente su detección con la especie *C. guilliermondii*, y en la clasificación de otros orígenes se halló un 12,2% (n=11), que incluyó la especie *C. guilliermondii* con un 8,9% (n=8).

Los acuerdos positivos y negativos entre ambos procedimientos evaluados mostraron resultados de un 100% para los indicadores de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas. Dentro de la bibliografía revisada, Ballesté y col. (2005) detectaron diferencias en el desempeño del medio CHROMagar Candida, al analizar cepas de referencia y aisladas de muestras biológicas, señalando valores de sensibilidad y especificidad del 92 y 94%, respectivamente, al tipificar cepas de muestras biológicas, mientras que para las cepas de referencia la sensibilidad resultó del 71% y la especificidad del 100%.

El análisis de los resultados permite afirmar, que el método alternativo posee un excelente desempeño diagnóstico para la recuperación, detección y diferenciación de las especies aisladas de *Candida* con mayor incidencia, capaz de identificar y detectar, en sólo 48 h, más del 60% de las especies que pueden estar en la condición de patógeno en una muestra clínica.

#### **3.5.1.9 Exactitud relativa del medio CromoCen CND-C con muestras de exudados vaginales**

De las 410 muestras analizadas, 124 (30,24%) resultaron positivas a especies de *Candida*, utilizando ambos procedimientos (Figura 3.9). Las cepas recuperadas se identificaron por cada metodología y resultaron: 73 (58,9%) *C. albicans*, 18 (14,5%) *C. glabrata*, 9 (7,3%) *C. parapsilosis*, 7 (5,6%) *C. krusei*, 6 (4,8%) *C. guilliermondii*, 5 (4%) *C. tropicalis*, igual cantidad de *C. lusitaniae* y 1 (0,8%) de *C. inconspicua*.

En una evaluación reciente, que incluyó 392 muestras de exudados vaginales inoculados en tres medios (Chromogenic Candida agar, CHROMagar Candida y ADS con cloranfenicol), el 41,1%

**Tabla 3.39.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, índice Kappa y selectividad para detectar dos grupos de especies de acuerdo a sus características cromáticas a partir de cepas aisladas del género *Candida*

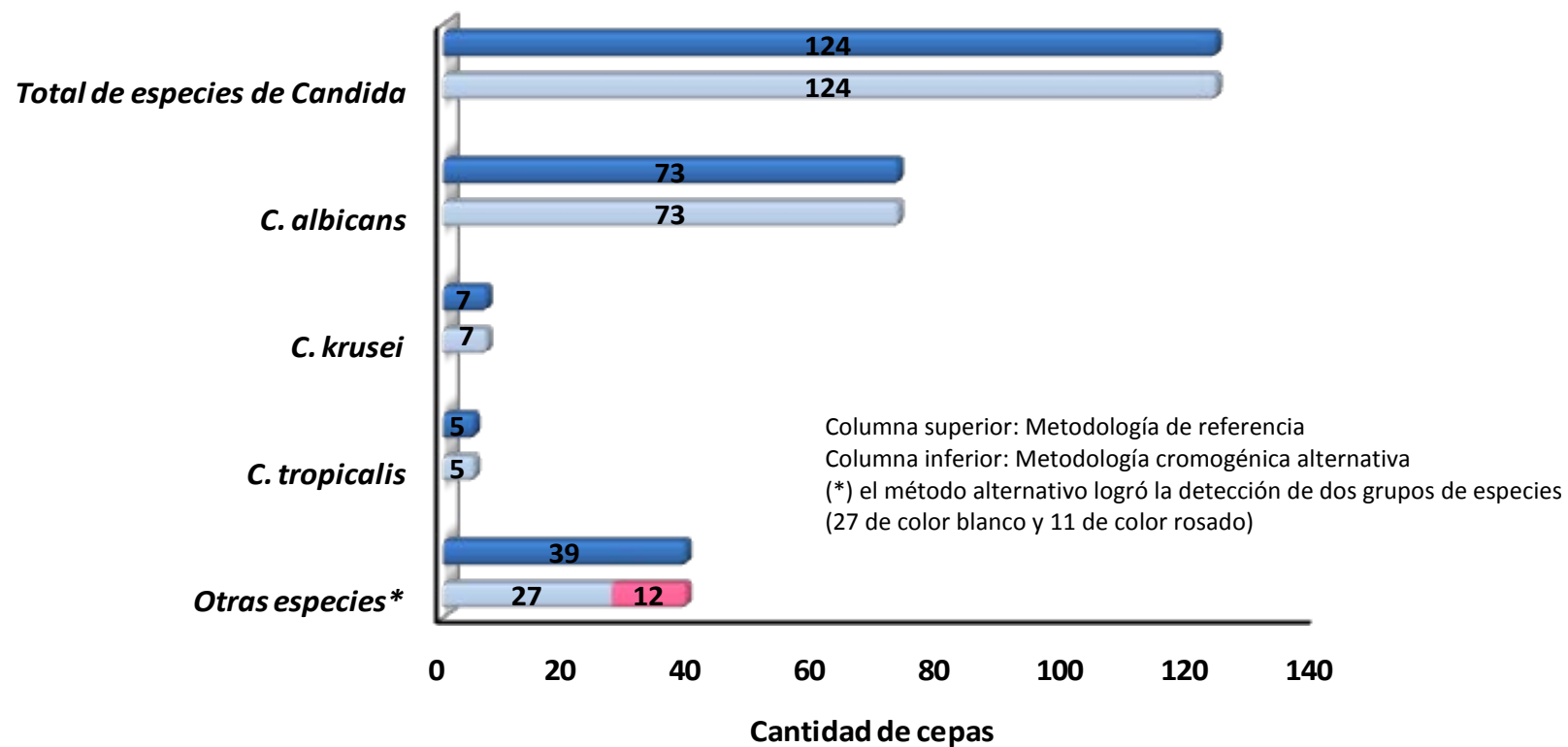
Grupo 1 (colonias blancas)					Grupo 2 (colonias rosado pálido)					<i>C. guilliermondii</i>			
Referencia		Alternativo			Referencia		Alternativo			Referencia		Alternativo	
SP	112	112			48		48			37		37	
SN	393	393			457		457			468		468	
	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	
	112	0	393	0	48	0	457	0	37	0	468	0	
SR, %		100,00			100,00			100,00			100,00		
EsR, %		100,00			100,00			100,00			100,00		
ExR, %		100,00			100,00			100,00			100,00		
IC: 99,00 – 100,00%													
Kappa		1,00			1,00			1,00			1,00		
F		-0,65			*			*			*		

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, AP: acuerdos positivos, DP: desvíos positivos, AN: acuerdos negativos, DN: desvíos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, F: selectividad, (\*): el número mínimo de resultados para calcular la selectividad para las 505 muestras es 50, por lo tanto se puede sólo calcular para el grupo 1

**Tabla 3.40.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas de los grupos de cepas detectadas de varios orígenes

Grupo 1 (colonias blancas)					Grupo 2 (colonias rosado pálido)				C. guilliermondii			
	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR
AP	53	34	7	18	15	3	19	11	8	2	19	8
AN	274	24	23	72	312	55	11	79	319	56	11	82
SR, %	100,00				100,00				100,00			
EsR, %	100,00				100,00				100,00			
ExR, %	100,00				100,00				100,00			
IC: 99,00 – 100,00%												

AP: acuerdos positivos, AN: acuerdos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, VAG: vaginales, OTI: óticos, HEM: hemocultivos, OTR: otros



**Figura 3.9.** Resultados comparativos para la identificación de cepas de *Candida* a partir de muestras de exudados vaginales utilizando el método de referencia y el cromogénico alternativo

resultó positivo a infecciones fúngicas, de las cuales el 13% eran polifúngicas. Los medios cromogénicos mostraron mayor recuperación que el de referencia (91,9-96,9% versus 89,4%). La frecuencia de aislamiento de especies de *Candida* resultó: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. kefyr*, *Candida zeylanoides* y *Candida colliculosa* (Ozcan *et al.*, 2010). En los ensayos realizados con el CromoCen CND-C, de las 286 (69,76%) muestras que resultaron negativas a cepas de *Candida*, se reportó la presencia de *Saccharomyces* spp. n=2 (0,5%), *Trichomonas* n=15 (3,6%) y diferentes especies bacterianas n=269 (65,6%) encontrando en orden de frecuencia las siguientes: *E. coli*, *Staphylococcus* coagulasa positivos, *Proteus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus* del grupo B, *Enterococcus* spp., *Providencia* spp., *Moraxella* spp. y *Klebsiella* spp. La frecuencia de aislamientos de bacterias (primer lugar) y levaduras, en especial *Candida* spp., (segundo lugar) coincide con lo descrito por Montes de Oca y col. (2005) que evaluaron el comportamiento clínico epidemiológico de la infección vaginal en gestantes residentes en Camagüey (Cuba). Este estudio reveló que el 85,71% de las pacientes presentaron infección vaginal, resultando el diagnóstico microbiológico positivo en el 50% a una vaginosis bacteriana, el 25% a *Candida* spp. y el 16,7% a *Trichomonas*. En Ciudad Habana, Cuba, Perurena y col. (2003) determinaron que en el 45% de las muestras procesadas de exudados vaginales se obtuvo crecimiento de células levaduriformes. Estos autores encontraron que, entre las especies de *Candida*, *C. albicans* se aisló en el 51,1% de los casos, seguido de *C. glabrata* en el 22,2%.

Se comprobó la capacidad del método para promover el cultivo, la recuperación, detección e identificación de los microorganismos diana a partir del aislamiento primario en muestras vaginales, siendo éste un elemento fundamental en la clínica, pues la candidiasis vulvovaginal afecta alrededor del 75% de las mujeres adultas, las que, en algún momento de su vida, padecen al menos un episodio de esta infección. Estas afecciones genitales generan pérdidas de años de salud y de vida productiva por las serias complicaciones en el curso del embarazo y el parto, con el riesgo de infectar al recién nacido (Perurena *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2005; Audisio *et al.*, 2005; Fowler, 2007).

Los acuerdos positivos y negativos, al evaluar la coincidencia entre los resultados, así como las desviaciones positivas y negativas, posibilitaron determinar que los parámetros de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas mostraron valores de un 100%.

En la bibliografía consultada se encontraron contados estudios dirigidos a la determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud diagnósticas o relativas de los medios cromogénicos para el diagnóstico de *Candida* a partir de exudados vaginales y, en general, muy escasos para el análisis directo de las muestras. Freydiere y col. (2000), al evaluar 131 especímenes clínicos en los medios Candida ID y Albicans ID, determinaron para *C. albicans* una sensibilidad de 95,4 y 86,3%, respectivamente, y la especificidad para ambos medios alcanzó el 100%.

En Pakistan se ejecutó un estudio comparativo entre CHROMagar Candida, agar harina de maíz con Tween 80 y ADS, utilizándolos como técnicas de cultivo de aislamiento primario al inocular directamente en ellos las muestras clínicas. Esta investigación arrojó valores de sensibilidad y especificidad para *Candida* spp. en el medio cromogénico de 98,2 y 98,4%, respectivamente, siendo estos valores superiores a los que caracterizaron a los demás medios evaluados (95-96%) (Ghufrana *et al.*, 2010).

Ozcan y col. (2010), al evaluar los medios cromogénicos Chromogenic Candida agar (CCA) y CHROMagar Candida con muestras de exudados vaginales, observaron que la eficiencia (exactitud) de ambos medios alcanzó sólo el 92,9% a las 72 h de incubación.

En Cuba, Betancourt y col. (2009), al evaluar una prueba rápida de aglutinación con partículas de látex, encontraron valores de sensibilidad superiores al 80% y de especificidad iguales o mayores al 90% para *Candida* spp.

Ninguno de los medios antes mencionados alcanzó el máximo de exactitud diagnóstica, por lo que sus autores recomendaron la aplicación de otras herramientas bioquímicas de identificación empleadas en la metodología tradicional. Siguiendo esta lógica, la combinación del medio CromoCen CND-C con otras pruebas adicionales (caracterización microscópica; asimilación de trehalosa, rafinosa, sacarosa, lactosa, xilosa y crecimiento a 45°C) posibilitó alcanzar el 100% de exactitud para todas las especies de *Candida* evaluadas.

Se determinó el índice Kappa el cual resultó igual a 1, lo que significa que la concordancia entre los métodos es “casi perfecta”. El indicador de la selectividad resultó igual a -0,27 por lo que el



método puede ser utilizado con garantía para detectar la presencia de especies de *Candida* como agentes patógenos en muestras vaginales.

El estudio reveló la capacidad del medio cromogénico para detectar las infecciones mixtas presentes en tres (2,4%) de las muestras estudiadas, con la posibilidad de identificar presuntivamente, de acuerdo al morfotipo colonial, algunas de las especies patógenas involucradas. Las asociaciones encontradas fueron *C. albicans* con *C. glabrata*, *C. tropicalis* con *C. krusei* y *C. albicans* con *C. inconspicua*. Combinaciones de especies similares también han sido publicadas por otros autores (Boktour *et al.*, 2004; Benetucci *et al.*, 2008; Ozcan *et al.*, 2010).

Benetucci y col. (2008) alertan acerca de la probabilidad de subestimar la presencia de la infección polifúngica, si no se emplea una metodología que permita discriminar la existencia de más de una especie de levadura; resaltando, para estos casos, el empleo de los medios cromogénicos como una alternativa sencilla y económica. Por tanto, la posibilidad que brinda el nuevo método cromogénico ofrece ventajas sustanciales sobre el método tradicional y puede constituir una herramienta muy útil para el diagnóstico de rutina en los hospitales del país.

Es conocido que el empleo de varios medios con sustratos cromogénicos, tales como Albicans ID, Fluoroplate Candida y CHROMagar Candida, posee una utilidad mayor que los medios tradicionales para el aislamiento y la rápida identificación de las especies de *Candida* en el laboratorio de microbiología clínica (Godoy *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004). A pesar de que en varios laboratorios están establecidas las técnicas para la identificación presuntiva de *C. albicans*, como la especie más frecuente, utilizando las pruebas de tubo germinativo y producción de clamidosporas, éstas presentan un porcentaje variable de falsos negativos (entre 5 y 10%) y es imprescindible contar con personal técnico entrenado para la interpretación de los resultados (Linares y Solís, 2001; Wansley *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2006). Sin embargo, en este trabajo, el empleo de los medios con sustratos cromogénicos permitió identificar aquellas cepas de *C. albicans* que resultaron negativas para tales pruebas microscópicas (Godoy *et al.*, 2001; Ballesté *et al.*, 2005).

Los resultados de la evaluación del medio CromoCen CND-C en muestras vaginales demostraron la capacidad y potencialidad del mismo para detectar, diferenciar e identificar un mayor número de especies de *Candida* con máxima exactitud diagnóstica; siendo un método de fácil ejecución,

demostrada en la práctica de los laboratorios de microbiología de Ciudad de la Habana. La coincidencia de la frecuencia de aislamientos de bacterias y diferentes especies de *Candida* con el método de referencia y con los reportes de otros autores cubanos reafirma la capacidad del nuevo medio para discriminar la microbiota acompañante y detectar las especies de interés.

#### **3.5.1.10 Recuperación relativa total del CromoCen CND-C y el agar dextrosa de Sabouraud**

Los resultados alcanzados se muestran en la tabla 3.41, encontrándose en el primer nivel un total de 22 muestras con recuentos superiores a 30 UFC/placa y en el segundo nivel un total de 30 muestras con valores inferiores al señalado. La recuperación relativa del nivel<sub>1</sub> resultó igual a 98,78% y para el nivel<sub>2</sub> ésta alcanzó el 98,37%, con una recuperación relativa total de 98,58%. Los valores obtenidos superan los límites recomendados para medios selectivos, según la norma ISO 11133-2 (2003), y reflejan las posibilidades del medio cromogénico para la promoción, cultivo y recuento de las especies de *Candida* a bajas concentraciones en la muestra.

#### **3.5.1.11 Equivalencia entre el método de referencia y el método alternativo**

En la tabla 3.42 se muestra el análisis estadístico para evaluar la equivalencia de los métodos. La determinación de la incertidumbre expandida de las diferencias de los recuentos, según la norma ISO 17994 (2004), expresa la medida de la similitud de los recuentos obtenidos por el método cromogénico alternativo con respecto al de referencia. En este caso, los valores del límite inferior (-7,4831) y del límite superior (16,6474) se encontraron dentro del lapso establecido por esta norma para el análisis, considerando un 10% de la desviación máxima aceptable, concluyendo con ello que los métodos no son diferentes.

Hasta el momento, no se han encontrado publicaciones científicas que mostraran estudios similares realizados en medios cromogénicos diseñados para el diagnóstico de *Candida*.

#### **3.5.1.12 Resultados del estudio de la repetibilidad individual (intra-laboratorio)**

Los resultados del estudio de la repetibilidad individual utilizando el método de referencia se muestran en la tabla 3.43. La  $RSD_I$  para los tres analistas del mismo laboratorio fue: A=0,027; B=0,015 y C=0,018. En todos los casos los valores fueron menores que 0,03; condición establecida como criterio de aceptación para el análisis, según la norma ISO 16140 (2003), por lo que se concluye que la repetibilidad individual de los recuentos resultó adecuada.

**Tabla 3.41.** Resultados de la recuperación relativa total del CromoCen CND-C y el medio agar dextrosa de Sabouraud

Recuentos mayores de 30 UFC/placa					Recuentos menores de 30 UFC/placa				
No.	Muestra*	Xm ADS	Ym CND-C	RR, %	No.	Muestra*	Xm ADS	Ym CND-C	RR, %
1	CGL1	148,0	128,3	86,69	1	CGL1-1	11,0	14,0	127,27
2	CGL2	59,0	59,0	100,00	2	CGL2-1	13,0	7,0	53,85
3	CGU1	112,0	96,0	85,71	3	CGU2-1	26,0	18,0	69,23
4	CGU2	115,0	106,0	92,17	4	CKF2	21,0	18,0	85,71
5	CKF1	93,0	94,0	101,08	5	CKF2-1	2,0	3,0	150,00
6	CKR1	49,0	63,7	130,00	6	CKR2-1	2,0	3,0	150,00
7	CKR2	31,0	24,0	77,42	7	CP1-1	26,0	26,0	100,00
8	CP1	148,0	193,3	130,61	8	CT1-1	7,0	6,0	85,71
9	CT1	40,0	48,7	121,75	9	CT2	24,0	27,0	112,50
10	CA17	77,0	27,7	35,97	10	CT2-1	2,0	2,0	100,00
11	RTT1	48,6	72,3	148,77	11	CA17-1	2,0	2,0	100,00
12	RTT2	56,8	59,5	104,75	12	CA2	14,0	15,0	107,14
13	RTT3	50,1	68,1	135,93	13	CA2-1	2,0	1,0	50,00
14	RTT4	96,8	99,2	102,48	14	ND1	22,4	21,3	95,09
15	RTT5	101,7	100,0	98,33	15	ND2	2,9	3,0	103,45
16	RTT6	107,9	94,6	87,67	16	ND3	4,7	3,5	74,47
17	RV10	73,4	61,5	83,79	17	ND4	5,7	5,6	98,25
18	RV2	46,7	41,6	89,08	18	RTT1-1	9,9	5,3	53,54
19	RV3	71,2	57,5	80,76	19	RTT2-1	6,5	7,1	109,23
20	RV6	57,3	49,5	86,39	20	RTT3-1	5,6	6,4	114,29
21	RV7	98,4	93,3	94,82	21	RV1	18,0	22,0	122,22
22	RV9	44,3	43,9	99,10	22	RV1-1	1,9	1,4	73,68
					23	RV1-2	7,1	6,3	88,73
					24	RV1-3	4,9	6,4	130,61
					25	RV2-1	6,4	3,9	60,94
					26	RV3-1	8,4	5,8	69,05
					27	RV4	22,8	23,0	100,88
					28	RV4-1	2,4	3,1	129,17
					29	RV5	21,5	27,9	129,77
					30	RV8	17,6	18,7	106,25
Recuperación relativa:				Nivel alto = 98,78%	Nivel bajo= 98,37%				
Recuperación relativa total: 98,58%									

Xm ADS: media de los recuentos utilizando agar dextrosa de Sabouraud, Ym CND-C: media de los recuentos utilizando CromoCen CND-C, RR: recuperación relativa, (\*): las muestras fueron codificadas de acuerdo a la cepa utilizada, la concentración del inóculo, el volumen de inoculación y la temperatura de incubación

**Tabla 3.42.** Determinación de la equivalencia de los recuentos entre el método de referencia y el método alternativo

No.	Muestra*	Referencia		Alternativo		X <sub>iP</sub> , %	(X <sub>iP</sub> -X <sub>MP</sub> ) <sup>2</sup>
		X <sub>PR</sub>	Ln(X <sub>PR</sub> )	X <sub>PA</sub>	Ln(X <sub>PA</sub> )		
1	CGL1	148,0	4,9972	128,3	4,8544	14,2841	94,13
2	CGL2	59,0	4,0775	59,0	4,0775	0,0000	21,00
3	CGU1	112,0	4,7185	96,0	4,5643	15,4151	117,35
4	CGU2	115,0	4,7449	106,0	4,6634	8,1493	12,72
5	CKF1	93,0	4,5326	94,0	4,5433	-1,0695	31,94
6	CKR1	49,0	3,8918	63,7	4,1542	-26,2364	949,78
7	CKR2	31,0	3,4340	24,0	3,1781	25,5933	441,47
8	CP1	148,0	4,9972	193,3	5,2642	-26,7031	978,77
9	CT1	40,0	3,6889	48,7	3,8857	-19,6800	588,65
10	CA17	77,0	4,3438	27,7	3,3214	102,2373	9536,53
11	RTT1	48,6	3,8836	72,3	4,2808	-39,7201	1962,69
12	RTT2	56,8	4,0395	59,5	4,0860	-4,6440	85,12
13	RTT3	50,1	3,9140	68,1	4,2210	-30,6956	1244,52
14	RTT4	96,8	4,5726	99,2	4,5971	-2,4491	49,44
15	RTT5	101,7	4,6220	100,0	4,6052	1,6857	8,39
16	RTT6	107,9	4,6812	94,6	4,5497	13,1547	73,49
17	RV10	73,4	4,2959	61,5	4,1190	17,6887	171,78
18	RV2	46,7	3,8437	41,6	3,7281	11,5644	48,75
19	RV3	71,2	4,2655	57,5	4,0518	21,3708	281,86
20	RV6	57,3	4,0483	49,5	3,9020	14,6328	101,02
21	RV7	98,4	4,5890	93,3	4,5358	5,3221	0,55
22	RV9	44,3	3,7910	43,9	3,7819	0,9070	13,51
						X <sub>MP</sub> =4,5822	SDC=16813,45
							S <sub>0</sub> =28,2956
							Sx <sub>m</sub> =6,0326
							U=12,0653
Lím. inferior=-7,4831				Lím. superior=16,6474			
Si (-20≤ Lím. inferior ≤0) y (0≤ Lím. superior ≤20) Los métodos no son diferentes							

$X_p$ : recuento promedio de las réplicas de la muestra (UFC/placa),  $X_{ip}$ : porcentaje de la diferencia relativa del logaritmo de los recuentos promedios,  $X_{MP}$ : valor medio de  $X_{ip}$ ,  $SDC$ : suma de la diferencia de cuadrados,  $S_0$ : desviación estándar de  $X_{MP}$ ,  $Sx_m$ : desviación estándar de la media,  $U$ : incertidumbre expandida, (\*): las muestras fueron codificadas de acuerdo a la cepa utilizada, la concentración del inóculo, el volumen de inoculación y la temperatura de incubación

**Tabla 3.43.** Estudio de la repetibilidad individual (intra-laboratorio) utilizando el método de referencia

Método de referencia																					
Placa	Analista A			SDC	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>	Analista B			SDC	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>	Analista C			SDC	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>				
1	71	72	71,5	0,5	0,707	0,010	0,000	70	70	70,0	0,0	0,000	0,000	0,000	70	72	71,0	2,0	1,414	0,020	0,000
2	86	79	82,5	24,5	4,950	0,060	0,004	90	88	89,0	2,0	1,414	0,016	0,000	90	88	89,0	2,0	1,414	0,016	0,000
3	67	67	67,0	0,0	0,000	0,000	0,000	69	68	68,5	0,5	0,707	0,010	0,000	68	69	68,5	0,5	0,707	0,010	0,000
4	74	76	75,0	2,0	1,414	0,019	0,000	75	77	76,0	2,0	1,414	0,019	0,000	77	78	77,5	0,5	0,707	0,009	0,000
5	66	66	66,0	0,0	0,000	0,000	0,000	66	66	66,0	0,0	0,000	0,000	0,000	68	68	68,0	0,0	0,000	0,000	0,000
6	82	83	82,5	0,5	0,707	0,009	0,000	80	83	81,5	4,5	2,121	0,026	0,001	83	84	83,5	0,5	0,707	0,009	0,000
7	66	69	67,5	4,5	2,121	0,031	0,001	71	70	70,5	0,5	0,707	0,010	0,000	70	70	70,0	0,0	0,000	0,000	0,000
8	75	70	72,5	12,5	3,536	0,049	0,002	72	73	72,5	0,5	0,707	0,010	0,000	77	77	77,0	0,0	0,000	0,000	0,000
9	58	58	58,0	0,0	0,000	0,000	0,000	59	61	60,0	2,0	1,414	0,024	0,001	63	59	61,0	8,0	2,828	0,046	0,002
10	90	90	90,0	0,0	0,000	0,000	0,000	96	97	96,5	0,5	0,707	0,007	0,000	97	97	97,0	0,0	0,000	0,000	0,000
Media	73,25					0,018	0,001	75,05					0,012	0,000	76,25					0,011	0,000
RSD <sub>A</sub> =0,027						RSD <sub>B</sub> =0,015						RSD <sub>C</sub> =0,018									
RSD <sub>I</sub> ≤ 0,03    La repetibilidad individual de los recuentos es adecuada																					

X<sub>1</sub>: primer recuento (UFC/placa), X<sub>2</sub>: segundo recuento (UFC/placa), X<sub>m</sub>: media de los recuentos, SDC: suma de la diferencia de cuadrados entre los recuentos, S<sub>r</sub>: desviación estándar de la repetibilidad, RSD: desviación estándar relativa, RSD<sub>i</sub>: desviación estándar individual

Es importante señalar que el valor más próximo a 0,03 fue el registrado por el analista A, lo cual significa que es la persona con mayor variabilidad al efectuar los recuentos de las placas.

El examen de la repetibilidad individual (intra-laboratorio) realizado con el método alternativo se presenta en la tabla 3.44, y arrojó los siguientes valores: analista A=0,030, B=0,018 y C=0,010. Del análisis de los datos se prevé que sólo los analistas B y C lograron una repetibilidad de los recuentos adecuada, mientras que el analista A fue el que más se aproximó al criterio de aceptación establecido (0,03).

Fowler y col. (1978) hallaron que la variación del recuento de las colonias en la misma placa por un mismo analista fue de 7,7% ( $\pm 0,077$ ), valor superior al obtenido en el CromoCen CND-C.

En un estudio de validación destinado a la enumeración de levaduras probióticas en piensos, comparando el método de vertimiento en placa sobre agar extracto de levadura y glucosa con cloranfenicol (AELG) con el método de inundación de la superficie sobre CHROMagar Candida, Leuschner y col. (2003) determinaron que la desviación estándar relativa de la repetibilidad (RSDr) para AELG fluctuó entre 2,4 y 4,9% (0,024 y 0,049) y para CHROMagar Candida entre 1,9 y 2,8% (0,019 y 0,028). Los autores concluyeron que para el análisis de rutina se recomienda el método de placa vertida, mientras que el medio cromogénico es más apropiado para la confirmación de especies, como *S. cerevisiae*.

En las fuentes consultadas, los valores reportados de RSDr para el medio cromogénico, empleado en piensos, se asemejan a los obtenidos en el CromoCen CND-C, pero, a diferencia de la recomendación de Leuschner, en este caso, además de su aplicación para la identificación de especies de *Candida* en el diagnóstico clínico, éste se propone para el recuento de las colonias.

En la tabla 3.45 se muestra el análisis de la varianza de los recuentos para evaluar la repetibilidad entre los laboratorios, sobre la base del cálculo de la varianza dentro de las placas, que resultó igual a 3,6073 para el ADS y de 3,5534 para el CromoCen CND-C. A su vez, se determinó la varianza de los recuentos entre placas, siendo en el método de referencia igual a 2,5583 y en el alternativo de 2,5376. La comparación de los valores obtenidos para cada varianza calculada mostró que en ambos métodos la varianza dentro de las placas fue mayor que la varianza entre placas, por lo que se concluye que no existen diferencias significativas entre los datos y, por tanto, la repetibilidad inter-laboratorios es satisfactoria. Este parámetro

**Tabla 3.44.** Estudio de la repetibilidad individual (intra-laboratorio) utilizando el método alternativo

Método alternativo																					
Placa	Analista A			SDC	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>	Analista B			SDC	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>	Analista C			SDC	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>m</sub>				
1	69	69	69,0	0,0	0,000	0,000	0,000	71	68	69,5	4,5	2,121	0,031	0,001	68	70	69,0	2,0	1,414	0,021	0,000
2	70	71	70,5	0,5	0,707	0,010	0,000	73	69	71,0	8,0	2,828	0,040	0,002	72	72	72,0	0,0	0,000	0,000	0,000
3	76	77	76,5	0,5	0,707	0,009	0,000	79	79	79,0	0,0	0,000	0,000	0,000	79	78	78,5	0,5	0,707	0,009	0,000
4	70	69	69,5	0,5	0,707	0,010	0,000	71	70	70,5	0,5	0,707	0,010	0,000	71	71	71,0	0,0	0,000	0,000	0,000
5	65	70	67,5	12,5	3,536	0,052	0,003	74	74	74,0	0,0	0,000	0,000	0,000	74	75	74,5	0,5	0,707	0,010	0,000
6	72	72	72,0	0,0	0,000	0,000	0,000	72	73	72,5	0,5	0,707	0,010	0,000	72	71	71,5	0,5	0,707	0,010	0,000
7	71	64	67,5	24,5	4,950	0,073	0,005	71	71	71,0	0,0	0,000	0,000	0,000	71	70	70,5	0,5	0,707	0,010	0,000
8	72	69	70,5	4,5	2,121	0,030	0,001	69	69	69,0	0,0	0,000	0,000	0,000	70	70	70,0	0,0	0,000	0,000	0,000
9	85	85	85,0	0,0	0,000	0,000	0,000	88	87	87,5	0,5	0,707	0,008	0,000	86	87	86,5	0,5	0,707	0,008	0,000
10	70	71	70,5	0,5	0,707	0,010	0,000	72	70	71,0	2,0	1,414	0,020	0,000	71	71	71,0	0,0	0,000	0,000	0,000
Media	71,85					0,020	0,001	73,5					0,012	0,000	73,45					0,007	0,000
RSD <sub>A</sub> =0,030						RSD <sub>B</sub> =0,018						RSD <sub>C</sub> =0,010									
RSD <sub>I</sub> ≤ 0,03 La repetibilidad de los recuentos individual es adecuada																					

X<sub>1</sub>: primer recuento (UFC/placa), X<sub>2</sub>: segundo recuento (UFC/placa), X<sub>m</sub>: media de los recuentos, SDC: suma de la diferencia de cuadrados entre los recuentos, S<sub>r</sub>: desviación estándar de la repetibilidad, RSD: desviación estándar relativa, RSD<sub>i</sub>: desviación estándar individual

**Tabla 3.45.** Análisis de la varianza de los recuentos para el estudio de la repetibilidad intra-laboratorio

Placa No.	Referencia					Alternativo					
	Analista A										
	lnX <sub>1</sub>	lnX <sub>2</sub>	X <sub>ln</sub>	SDC	SE	lnX <sub>1</sub>	lnX <sub>2</sub>	X <sub>ln</sub>	SD	SE	
1	4,2627	4,2767	4,2697	0,0001	0,4875	4,2341	4,2341	4,2341	0,0000	0,4391	
2	4,4543	4,3694	4,4119	0,0036	0,7063	4,2485	4,2627	4,2556	0,0001	0,4680	
3	4,2047	4,2047	4,2047	0,0000	0,4010	4,3307	4,3438	4,3373	0,0001	0,5865	
4	4,3041	4,3307	4,3174	0,0004	0,5564	4,2485	4,2341	4,2413	0,0001	0,4487	
5	4,1897	4,1897	4,1897	0,0000	0,3822	4,1744	4,2485	4,2114	0,0027	0,4096	
6	4,4067	4,4188	4,4128	0,0001	0,7078	4,2767	4,2767	4,2767	0,0000	0,4973	
7	4,1897	4,2341	4,2119	0,0010	0,4101	4,2627	4,1589	4,2108	0,0054	0,4087	
8	4,3175	4,2485	4,2830	0,0024	0,5063	4,2767	4,2341	4,2554	0,0009	0,4678	
9	4,0604	4,0604	4,0604	0,0000	0,2391	4,4427	4,4427	4,4427	0,0000	0,7590	
10	4,4998	4,4998	4,4998	0,0000	0,8618	4,2485	4,2627	4,2556	0,0001	0,4680	
Analista B											
1	4,2485	4,2485	4,2485	0,0000	0,4584	4,2627	4,2195	4,2411	0,0009	0,4484	
2	4,4998	4,4773	4,4886	0,0003	0,8411	4,2905	4,2341	4,2623	0,0016	0,4772	
3	4,2341	4,2195	4,2268	0,0001	0,4295	4,3694	4,3694	4,3694	0,0000	0,6368	
4	4,3175	4,3438	4,3306	0,0003	0,5764	4,2627	4,2485	4,2556	0,0001	0,4680	
5	4,1897	4,1897	4,1897	0,0000	0,3822	4,3041	4,3041	4,3041	0,0000	0,5367	
6	4,3820	4,4188	4,4004	0,0007	0,6872	4,2767	4,2905	4,2836	0,0001	0,5071	
7	4,2627	4,2485	4,2556	0,0001	0,4680	4,2627	4,2627	4,2627	0,0000	0,4778	
8	4,2767	4,2905	4,2836	0,0001	0,5071	4,2341	4,2341	4,2341	0,0000	0,4391	
9	4,0775	4,1109	4,0942	0,0006	0,2733	4,4773	4,4659	4,4716	0,0001	0,8103	
10	4,5643	4,5747	4,5695	0,0001	0,9962	4,2767	4,2485	4,2626	0,0004	0,4777	
Analista C											
1	4,2485	4,2767	4,2626	0,0004	0,4777	4,2195	4,2485	4,2340	0,0004	0,4390	
2	4,4998	4,4773	1,9494	12,8952	2,6311	4,2767	4,2767	1,8573	11,7064	2,9382	
3	4,2195	4,2341	1,8357	11,4350	3,0129	4,3694	4,3567	1,8949	12,1842	2,8109	
4	4,3438	4,3567	1,8893	12,1127	2,8296	4,2627	4,2627	1,8513	11,6299	2,9591	
5	4,2195	4,2195	1,8325	11,3955	3,0239	4,3041	4,3175	1,8722	11,8938	2,8876	
6	4,4188	4,4308	1,9217	12,5315	2,7217	4,2767	4,2627	1,8543	11,6681	2,9486	
7	4,2485	4,2485	1,8451	11,5526	2,9803	4,2627	4,2485	1,8482	11,5912	2,9696	
8	4,3438	4,3438	1,8865	12,0768	2,8391	4,2485	4,2485	1,8451	11,5526	2,9803	
9	4,1431	4,0775	1,7853	10,8135	3,1902	4,4543	4,4659	1,9370	12,7323	2,6714	
10	4,5747	4,5747	1,9868	13,3949	2,5112	4,2627	4,2627	1,8513	11,6299	2,9591	
M=3,5714						M=3,5571					
Total				108,218	74,191					106,601	73,591
V <sub>SE</sub> (Varianza entre las placas)					2,5583						2,5376
V <sub>SD</sub> (Varianza dentro de las placas)					3,6073						3,5534

$V_{SD} > V_{SE}$ : No hay diferencias significativas de los datos entre placas

La repetibilidad laboratorial es adecuada

lnX: logaritmo del primer y del segundo recuentos individuales, X<sub>ln</sub>: media puntual de los logaritmos de los recuentos, SDC: suma de la diferencia de cuadrados entre los logaritmos (análisis dentro de las placas), SE: diferencia entre la media puntual (X<sub>ln</sub>) y la media global (M) elevada al cuadrado (análisis entre las placas)



refleja la precisión intra-laboratorio, es decir, la cercanía de los acuerdos entre los resultados sucesivos e independientes alcanzados por el mismo método y bajo las mismas condiciones en cortos períodos de tiempo.

### **3.5.1.13 Resultados de la repetibilidad inter-laboratorios**

La tabla 3.46 muestra los valores de los recuentos obtenidos por analistas de diferentes laboratorios utilizando ambos métodos de ensayo. El tratamiento estadístico de los datos demostró que, tanto el método de referencia (ADS), como el método cromogénico (CromoCen CND-C) mostraron una adecuada repetibilidad de los recuentos, con valores de la desviación estándar de este indicador igual a 0,0292 y 0,0273, respectivamente, ambos menores que 0,1 (criterio de aceptación).

Este criterio permite medir la diferencia aparente de los recuentos obtenida por varios laboratorios y, con ello, reconocer el grado de acuerdos de los resultados individuales del ensayo.

Varios autores han encontrado que la RSDr, teniendo en cuenta los recuentos de 2 a 5 analistas, varió del 10 al 18% (0,1-0,18) (Fowler *et al.*, 1978; Peeler *et al.*, 1982), valores superiores a los encontrados en el medio CromoCen CND-C.

El hecho, de que en ambos procedimientos la repetibilidad inter-laboratorios resulte adecuada, garantiza que el método cromogénico pueda ser utilizado repetidamente para la evaluación de múltiples muestras en diferentes laboratorios.

### **3.5.1.14 Dispersión de los recuentos de los métodos de referencia y alternativo**

El resultado del procesamiento estadístico de los datos obtenidos de las 8 muestras evaluadas utilizando el método de referencia se aprecia en la tabla 3.47. Se observó que cada valor individual de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) por muestra fue inferior a la  $\chi^2_{teóricaM}=27,8772$  y similar comportamiento se encontró al calcular la  $\chi^2_{total}=91,5020$  que resultó menor que la  $\chi^2_{teórica}=114,8351$ . Al efectuar este mismo análisis, utilizando el método cromogénico alternativo (Tabla 3.48), se comprobó que los valores individuales y el total del estadígrafo  $\chi^2$  (105,2234) resultaron inferiores al valor  $\chi^2_{teórico}$ .

El estudio demostró que ambos métodos no provocaron una dispersión de los datos superior a la distribución de Poisson, como se establece en la norma ISO/TR 13843 (2000), y el resultado

**Tabla 3.46.** Estudio de la repetibilidad del ensayo (inter-laboratorios) utilizando el método de referencia y el alternativo

Placa No.	Referencia							Alternativo						
	Laboratorio			X <sub>m</sub>	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>	Laboratorio			X <sub>m</sub>	S <sub>r</sub>	RSD	RSD <sup>2</sup>
	A		B					A		B				
	X <sub>1A</sub>	X <sub>2A</sub>	X <sub>1B</sub>					X <sub>1A</sub>	X <sub>2A</sub>	X <sub>1B</sub>				
1	18	18	18	18,00	0,0000	0,0000	0,0000	22	23	23	22,67	0,5774	0,0255	0,0006
2	30	30	33	31,00	1,7321	0,0559	0,0031	24	24	24	24,00	0,0000	0,0000	0,0000
3	21	21	21	21,00	0,0000	0,0000	0,0000	24	24	24	24,00	0,0000	0,0000	0,0000
4	16	16	16	16,00	0,0000	0,0000	0,0000	18	18	18	18,00	0,0000	0,0000	0,0000
5	29	29	29	29,00	0,0000	0,0000	0,0000	21	22	21	21,33	0,5774	0,0271	0,0007
6	19	19	19	19,00	0,0000	0,0000	0,0000	26	26	24	25,33	1,1547	0,0456	0,0021
7	19	20	21	20,00	1,0000	0,0500	0,0025	26	26	26	26,00	0,0000	0,0000	0,0000
8	30	30	32	30,67	1,1547	0,0377	0,0014	16	16	16	16,00	0,0000	0,0000	0,0000
9	26	25	27	26,00	1,0000	0,0385	0,0015	26	26	24	25,33	1,1547	0,0456	0,0021
10	20	20	20	20,00	0,0000	0,0000	0,0000	27	27	25	26,33	1,1547	0,0438	0,0019
Media				23,07	0,0009						22,90	0,0007		
RSD <sub>R</sub> =0,0292							RSD <sub>A</sub> =0,0273							
Si RSD <sub>L</sub> ≤0,1 La repetibilidad de los recuentos entre los laboratorios es adecuada														

X: recuento de los analistas de los laboratorios A y B, X<sub>m</sub>: media de los recuentos, S<sub>r</sub>: desviación estándar de la repetibilidad de los recuentos entre varios laboratorios, RSD: desviación estándar relativa, RSD<sub>L</sub>: desviación estándar entre los laboratorios

**Tabla 3.47.** Dispersión de los recuentos por el método de referencia según análisis de la distribución de Poisson

Método de referencia																	
Réplica	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Muestra 6		Muestra 7		Muestra 8		
	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	
1	102	10404	98	9604	126	15876	15	225	49	2401	96	9216	35	1225	47	2209	
2	84	7056	97	9409	120	14400	29	841	66	4356	91	8281	47	2209	77	5929	
3	108	11664	103	10609	115	13225	19	361	53	2809	94	8836	43	1849	86	7396	
4	86	7396	90	8100	101	10201	16	256	70	4900	105	11025	38	1444	76	5776	
5	100	10000	97	9409	107	11449	24	576	57	3249	86	7396	49	2401	59	3481	
6	112	12544	90	8100	103	10609	17	289	65	4225	113	12769	47	2209	80	6400	
7	96	9216	99	9801	105	11025	15	225	52	2704	89	7921	45	2025	80	6400	
8	99	9801	103	10609	105	11025	36	1296	39	1521	110	12100	51	2601	75	5625	
9	121	14641	88	7744	95	9025	26	676	51	2601	96	9216	48	2304	86	7396	
10	109	11881	103	10609	102	10404	18	324	71	5041	104	10816	40	1600	68	4624	
Total	1017	104603	968	93994	1079	117239	215	5069	573	33807	984	97576	443	19867	734	55236	Total de $\chi^2$ muestra
$\chi^2$ muestra	11,5447		3,0124		7,5524		20,7674		17,0000		7,6260		5,4650		18,5341		

$$\chi^2_{\text{muestra}} < \chi^2_{\text{teóricaM}} = 27,8772$$

$$\chi^2_{\text{total}} < \chi^2_{\text{teóricaT}} = 114,8351 \text{ El método no provoca dispersión de los datos superior a la distribución de Poisson}$$

X<sub>i</sub>: recuento por placa (UFC/placa), χ<sup>2</sup><sub>muestra</sub>: distribución chi cuadrado por muestra, χ<sup>2</sup><sub>teóricaM</sub>: valor teórico para p=0,1% y gL(n-1)=9, χ<sup>2</sup><sub>total</sub>: valor total, χ<sup>2</sup><sub>teóricaT</sub>: valor total teórico para p=0,1% y gL(n-1)=72

**Tabla 3.48.** Dispersión de los recuentos por el método alternativo según análisis de la distribución de Poisson

Método alternativo																	
Réplica	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Muestra 6		Muestra 7		Muestra 8		
	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	X <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> <sup>2</sup>	
1	105	11025	84	7056	85	7225	28	784	49	2401	105	11025	39	1521	56	3136	
2	86	7396	101	10201	86	7396	26	676	39	1521	102	10404	45	2025	45	2025	
3	108	11664	95	9025	123	15129	27	729	50	2500	102	10404	47	2209	69	4761	
4	114	12996	101	10201	106	11236	20	400	42	1764	84	7056	44	1936	84	7056	
5	111	12321	110	12100	83	6889	35	1225	44	1936	89	7921	46	2116	45	2025	
6	88	7744	106	11236	105	11025	21	441	54	2916	94	8836	48	2304	79	6241	
7	98	9604	107	11449	78	6084	34	1156	49	2401	89	7921	35	1225	60	3600	
8	101	10201	114	12996	84	7056	32	1024	57	3249	87	7569	38	1444	44	1936	
9	106	11236	83	6889	88	7744	31	961	46	2116	99	9801	49	2401	77	5929	
10	83	6889	91	8281	108	11664	25	625	65	4225	82	6724	48	2304	56	3136	
Total	1000	101076	992	99434	946	91448	279	8021	495	25029	933	87661	439	19485	615	39845	Total de $\chi^2$ muestra
$\chi^2$ muestra	10,7600		10,3589		20,6808		8,4910		10,6364		6,5606		4,8497		32,8862		105,2234

$$\chi^2_{\text{muestra}} < \chi^2_{\text{teóricaM}} = 27,8772$$

$\chi^2_{\text{total}} < \chi^2_{\text{teóricaT}} = 114,8351$  El método no provoca dispersión de los datos superior a la distribución de Poisson

X<sub>i</sub>: recuento por placa (UFC/placa), χ<sup>2</sup><sub>muestra</sub>: distribución chi cuadrado por muestra, χ<sup>2</sup><sub>teóricaM</sub>: valor teórico para p=0,1% y gL(n-1)=9, χ<sup>2</sup><sub>total</sub>: valor total, χ<sup>2</sup><sub>teóricaT</sub>: valor total teórico para p=0,1% y gL(n-1)=72

de este parámetro refleja que, al analizar una muestra en diferentes momentos, se logran recuentos reproducibles por cualquiera de los dos procedimientos.

#### **3.5.1.15 Sobredispersión de los recuentos paralelos de los métodos de ensayo**

En la tabla 3.49 aparecen reflejados los resultados del ensayo inter-laboratorios utilizando los métodos de referencia y el alternativo. Se observó la variabilidad de los recuentos obtenidos por placa en los diferentes laboratorios. A partir de los datos obtenidos se calcularon las ecuaciones de regresión de la razón de Lexis versus recuentos medios para ambos métodos, según la norma ISO/TR 13843 (2000), representadas, a su vez, en la figura 3.10, por la línea de regresión de los diferentes puntos que constituyen los resultados de los ensayos, siendo para el método de referencia  $Y=0,41+0,006X$  y para el método alternativo  $Y=0,59+0,004X$ .

Las pendientes 0,006 (referencia) y 0,004 (alternativo) expresan el valor cuadrático de la sobredispersión ( $u^2$ ), donde el exceso de la variación de los valores de los recuentos resultó:  $u=0,081$  (referencia) y  $u=0,064$  (alternativo), y los valores del componente de error adicionado de  $\pm 8\%$  para el método de referencia y de  $\pm 6\%$  para el método alternativo, demostrando así la precisión de ambos procedimientos.

Es de destacar que no se encontró ninguna referencia anterior a este estudio, que abordara el cálculo de tan importante indicador. El resultado de este parámetro, al ser menor del 10%, recomendado como límite de aceptación por la mencionada norma ISO/TR 13843 (2000), garantiza que el análisis de una misma muestra sea reproducible al utilizar cualquiera de los métodos evaluados por diferentes laboratorios, analistas y condiciones de incubación.

#### **3.5.1.16 Criterio de la conformidad y la concordancia del método**

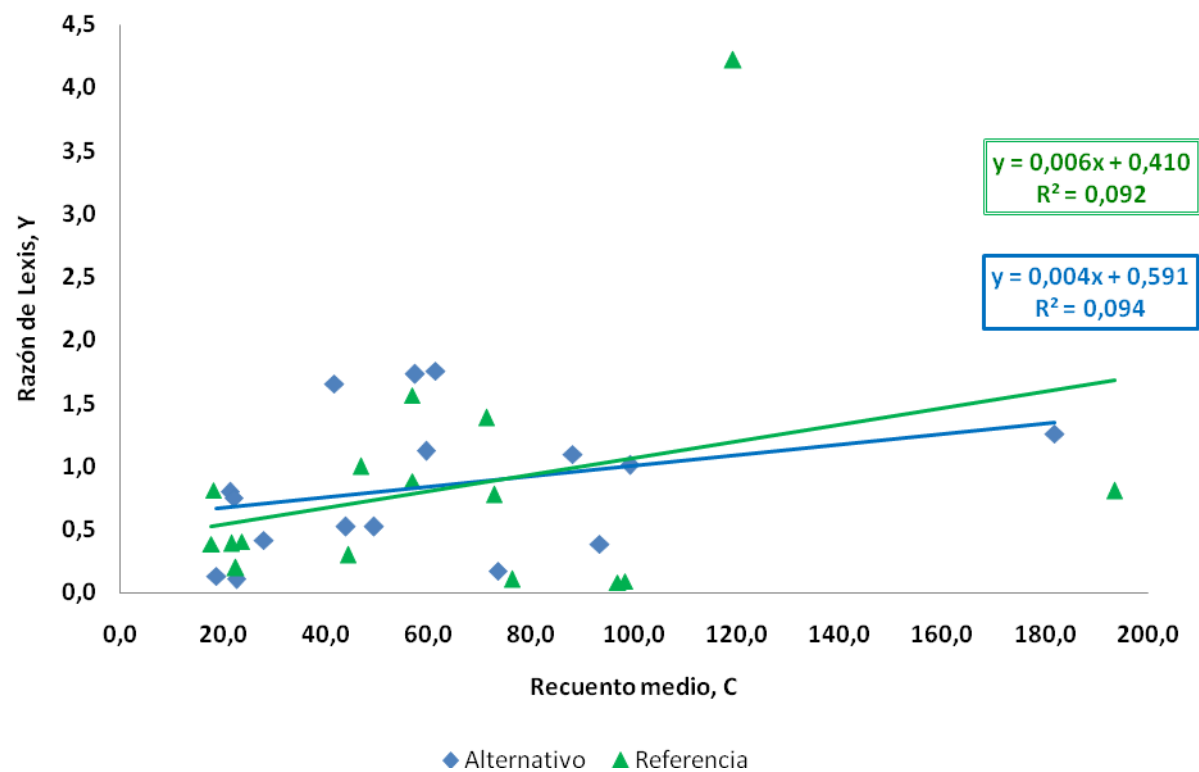
El análisis cualitativo de la promoción del crecimiento utilizando el método de referencia y el método alternativo, en dos laboratorios (A y B), demostró una total coincidencia de la cantidad de placas con resultados positivos (10/10 réplicas) (Tabla 3.50).

El tratamiento de los datos utilizados para el cálculo del criterio de la conformidad, según la norma ISO 16140 (2003), para ambos métodos se muestra en la tabla 3.51, siendo su valor igual al 100%. Este parámetro es equivalente a la repetibilidad para los métodos cuantitativos y mide la diferencia aparente que existe al analizar los resultados de dos porciones idénticas de la muestra estudiada en diferentes laboratorios. El valor alcanzado demostró la máxima

**Tabla 3.49.** Análisis de la sobredispersión de los recuentos paralelos en los métodos de ensayo

Método de referencia									Método alternativo							
Laboratorio	Recuento (UFC/placa)					X <sub>m</sub>	V <sub>0</sub>	Y	Recuento (UFC/placa)					X <sub>m</sub>	V <sub>0</sub>	Y
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>				X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>			
1	25	20	23	24	21	22,4	4,4	0,20	15	25	21	22	24	21,3	17,0	0,80
2	12	21	21	18	19	18,0	14,6	0,81	21	28	21	25	17	22,0	16,5	0,75
3	56	44	41	42	53	46,7	46,7	1,00	43	39	36	35	56	41,6	68,9	1,66
4	86	61	74	63	74	71,2	98,7	1,39	54	48	67	49	69	57,4	99,3	1,73
5	26	19	24	27	24	23,6	9,5	0,40	24	21	23	21	25	22,5	2,4	0,11
6	22	18	21	26	22	21,5	8,4	0,39	27	24	28	33	28	27,9	11,6	0,41
7	58	61	61	45	61	56,9	50,2	0,88	43	47	49	53	56	49,4	25,9	0,52
8	93	100	99	100	101	98,2	9,0	0,09	104	93	92	88	91	93,3	35,8	0,38
9	212	177	194	191	194	193,5	156,0	0,81	193	159	178	183	197	181,9	228,8	1,26
10	16	15	22	19	18	17,7	6,8	0,39	16	20	20	19	19	18,6	2,4	0,13
11	41	41	48	48	44	44,3	13,2	0,30	42	46	47	37	49	43,9	22,9	0,52
12	61	80	70	78	75	72,7	56,4	0,78	51	76	62	52	66	61,4	107,8	1,76
13	115	86	138	143	116	119,3	503,1	4,22	89	89	95	72	96	88,0	96,6	1,10
14	43	68	62	58	54	56,8	88,8	1,56	52	53	72	58	64	59,5	66,9	1,12
15	98	97	94	101	96	96,8	7,7	0,08	93	98	108	111	87	99,2	100,1	1,01
16	80	74	76	74	78	76,2	8,1	0,11	71	75	73	70	79	73,5	12,5	0,17
Y=0,41+0,0066X									Y=0,59+0,0041X							

X: recuentos individuales de 5 réplicas,  $X_m$ : media de los recuentos,  $V_0$ : varianza de los recuentos, Y: razón de Lexis



**Figura 3.10.** Dependencia de la razón de Lexis con respecto al recuento medio de las colonias utilizando los métodos de referencia y el alternativo

probabilidad de encontrar los mismos resultados en varios laboratorios utilizando cualquiera de los procedimientos evaluados.

Por otro lado, el cálculo de la conformidad resultó igual al 100% (Tabla 3.52). El cálculo de este indicador, equivalente a la repetibilidad para métodos cuantitativos, refleja el porcentaje de la oportunidad de encontrar el mismo resultado, es decir, el número de positivos o negativos de dos porciones idénticas de la muestra analizada por varios laboratorios, y ello confirma la fiabilidad del nuevo método. En general, existen escasos reportes acerca de la determinación de estos indicadores en medios de cultivo. Los mismos no se encontraron en la bibliografía para medios cromogénicos destinados al diagnóstico de *Candida*. No obstante, Betancourt y col. (2009) determinaron la concordancia de la prueba de aglutinación en látex, para este microorganismo, alcanzando un valor superior al 90%.

### **3.5.2 Validación del método cromogénico-fluorogénico**

#### **3.5.2.1. Parámetros de inclusividad y exclusividad del CromoCen CND-F**

La evaluación de la inclusividad del método cromogénico-fluorogénico (Tabla 3.53) mostró que el medio de cultivo permitió diferenciar, en menos de 48 h de incubación, un mayor número de especies de *Candida*. Entre ellas se resaltan *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. La identificación de las colonias de *C. parapsilosis* en cualquiera de sus morfotipos se evidenció por la emisión de fluorescencia, revelada por el sustrato MU- $\alpha$ -glc. La fluorescencia se manifestó también en varias de las especies del género, tales como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*. A pesar de esto, su identificación o detección se realizó sobre la base de los colores que desarrollaron las colonias.

Los escasos medios fluorogénicos existentes en el mercado para el diagnóstico de *Candida*, tales como el Fluoroplate Candida y el agar SDCA-MUAG, por lo general, sólo permiten la identificación de *C. albicans*, ya que éstos se fundamentan en el empleo de un único sustrato para revelar la actividad N-acetil-galactosaminidasa (Manafi y Willinger, 1991; Rouselle *et al.*, 1994; Willinger *et al.*, 1994). No obstante, otros métodos fluorogénicos, como el sistema de filtración por membrana que combina los sustratos (4-MU)-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida, -fosfato y -pirofosfato, lograron identificar un mayor número de especies de este género, entre



**Tabla 3.50.** Resultados cualitativos del estudio inter-laboratorios utilizando el método de referencia y el método alternativo

Laboratorio	Referencia											Alternativo										
	Número de réplicas (N)										No. positivos	Número de réplicas (N)										No. positivos
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	

(+): crecimiento positivo, (-): crecimiento negativo

**Tabla 3.51.** Cálculo del criterio de la conformidad del método de referencia y el método alternativo

Laboratorio	Referencia						Alternativo					
	n <sup>+</sup>	Pp	Ppp	Pn	Ppn	Ppmr	n <sup>+</sup>	Pp	Ppp	Pn	Ppn	Ppmr
A	10	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	10	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
B	10	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	10	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
Media						1,00						1,00
A (conformidad)						100%						100%

n<sup>+</sup>: número de positivos, Pp: probabilidad de positivos, Ppp: probabilidad de los pares de positivos, Pn: probabilidad de negativos, Ppn: probabilidad de los pares de negativos, Ppmr: probabilidad de los pares del mismo resultado

**Tabla 3.52.** Cálculo del criterio de concordancia del método de referencia y el método alternativo

Laboratorio	Referencia			Alternativo		
	n <sup>+</sup>	PR <sub>IL-IR</sub>	PR <sub>IL</sub>	n <sup>+</sup>	PR <sub>IL-IR</sub>	PR <sub>IL</sub>
A	10	100	100	10	100	100
B	10	100	100	10	100	100
Total		200	200		200	200
C (Concordancia)			100%			100%

n<sup>+</sup>: número de positivos, PR<sub>IL-IR</sub>: pares de las réplicas inter-laboratorios con iguales resultados, PR<sub>IL</sub>: pares de las réplicas inter-laboratorios, C: concordancia [ $C = (\sum PR_{IL-IR} / \sum PR_{IL}) \times 100$ ]

**Tabla 3.53.** Identificación de las especies de *Candida* utilizando el método cromogénico-fluorogénico

Especie	Cantidad	CromoCen CND-F			
		Requisito		Resultado	
		Color y morfología colonial	Fluorescencia a 366 nm	Color y morfología colonial	Fluorescencia a 366 nm
<i>C. albicans</i> <sup>IP</sup>	10	verde a verde azul <sup>a</sup>	+	verde <sup>a</sup>	+
<i>C. dubliniensis</i> <sup>IP</sup>	1	verde a verde azul <sup>a</sup>	+	verde <sup>a</sup>	+
<i>C. famata</i> <sup>IP</sup>	1	rosado pálido <sup>a</sup>	+	rosado pálido <sup>a</sup>	+
<i>C. glabrata</i> <sup>IP</sup>	9	blanco crema <sup>a</sup>	-	blanco crema <sup>a</sup>	-
<i>C. guilliermondii</i> <sup>IP</sup>	3	rosado pálido <sup>a</sup>	+	rosado pálido <sup>a</sup>	+
<i>C. inconspicua</i>	1	rosado, opaca <sup>b</sup>	-	rosado, opaca <sup>b</sup>	-
<i>C. kefyr</i>	5	rosado violáceo <sup>a</sup>	-	rosado violáceo <sup>a</sup>	-
<i>C. krusei</i>	1	blanco, opaca <sup>b</sup>	-	blanco, opaca <sup>b</sup>	-
<i>C. lusitaniae</i> <sup>IP</sup>	3	rosado <sup>a</sup>	+	rosado <sup>a</sup>	+
<i>C. parapsilosis</i>	3	blanco <sup>c</sup>	+	blanco y rugosa	+
<i>C. parapsilosis</i>	6	blanco <sup>c</sup>	+	blanco y lisa	+
<i>C. rugosa</i> <sup>IP</sup>	1	blanco <sup>a</sup>	-	blanco <sup>a</sup>	-
<i>C. tropicalis</i>	6	azul <sup>a</sup>	+	azul <sup>a</sup>	+

(<sup>IP</sup>): especies que requieren una identificación posterior con otras pruebas adicionales, (<sup>a</sup>): morfología redonda, lisa y abultada, (<sup>b</sup>): morfología irregular, superficie rugosa y plana, (<sup>c</sup>): morfología redonda, lisa o rugosa y abultada

ellas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Bauters *et al.*, 1999 y 2003). Sin embargo, tampoco se consiguió con el medio identificar o diferenciar *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, *C. famata* y *C. lusitaniae*.

En CromoCen CND-F, las cepas, que no fueron identificadas directamente, lograron ser diferenciadas, agrupándolas según la similitud del color que manifestaron las colonias y por otras propiedades culturales (morfología y fluorescencia). Los tres conjuntos resultaron: grupo 1- *C. albicans* y *C. dubliniensis*; grupo 2- *C. guilliermondii*, *C. famata* y *C. lusitaniae*; y grupo 3- *C. glabrata* y *C. rugosa*.

Es importante resaltar que las cepas de *C. glabrata* no fluorescen bajo luz UV, sin embargo, muestran un color rosa que puede ser utilizado para su identificación presuntiva, una vez que se adquiera la experiencia necesaria al trabajar con el medio. Baradkar y col. (2010) propusieron emplear una combinación del CHROMagar Candida con el agar harina de maíz para la evaluación de la presencia de pseudohifas con el objetivo de identificar las cepas de *C. glabrata*. Una combinación similar de estas técnicas conforma el nuevo método cromogénico-fluorogénico para la identificación de dicha especie. No obstante, otras pruebas rápidas, como la de citocromo oxidasa, pueden aplicarse, siendo *C. glabrata* la única especie del género reportada como negativa (Kumar *et al.*, 2000).

Se destaca, como ventaja del nuevo método cromogénico-fluorogénico, la identificación y diferenciación simultánea al aislamiento del mayor número de especies de *Candida* entre todos los diagnosticadores conocidos en el mercado y, especialmente, la de *C. parapsilosis*.

La evaluación de la exclusividad del método (Tabla 3.54) demostró que las especies de otros géneros de levaduras (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* y *Cryptococcus*) no mostraron reacciones de interferencia con respecto al género de interés y evidenció la capacidad del medio para reconocer no sólo las especies de *Candida*, sino también algunas de las especies de levaduras que pueden estar involucradas en las infecciones micóticas.

Con el sistema Vitek sólo se identifica, de modo correcto, el 55% de las levaduras no comunes, como el caso de *Trichosporon*, género al cual pertenece *T. asahii*, descrito como un patógeno emergente, aunque poco común en las UCI (Rivera *et al.*, 2003; Téllez-Castillo *et al.*, 2008).

**Tabla 3.54.** Características de las especies de otros géneros de levaduras diferentes del género *Candida* utilizando el método alternativo

Especie	Cantidad	CromoCen CND-F		
		Requisito		Resultado
		Color y morfología colonial	Fluorescencia a 366 nm	
<i>R. glutinis</i>	1	rosado <sup>a</sup> , diámetro 0,5 mm (a 30°C)	+	conforme
<i>R. mucilaginosa</i>	2	rosado naranja <sup>a</sup> , diámetro 0,5 mm (a 30°C)	+	conforme
<i>S. cerevisiae</i> <sup>IP</sup>	2	blanco <sup>a</sup> , con precipitado biliar	-	conforme
<i>S. uvarum</i> <sup>IP</sup>	1	blanco <sup>a</sup> , con precipitado biliar	-	conforme
<i>T. asahii</i>	1	verde <sup>b</sup> , opaca, diámetro 1 mm	+	conforme
<i>T. inkin</i>	1	verde claro <sup>b</sup> , opaca, diámetro 1 mm	+	conforme
<i>C. humicolus</i>	1	azul intenso, mucoide	+	conforme
<i>C. neoformans</i>	1	rosado pálido, mucoide, inhibido	+	conforme

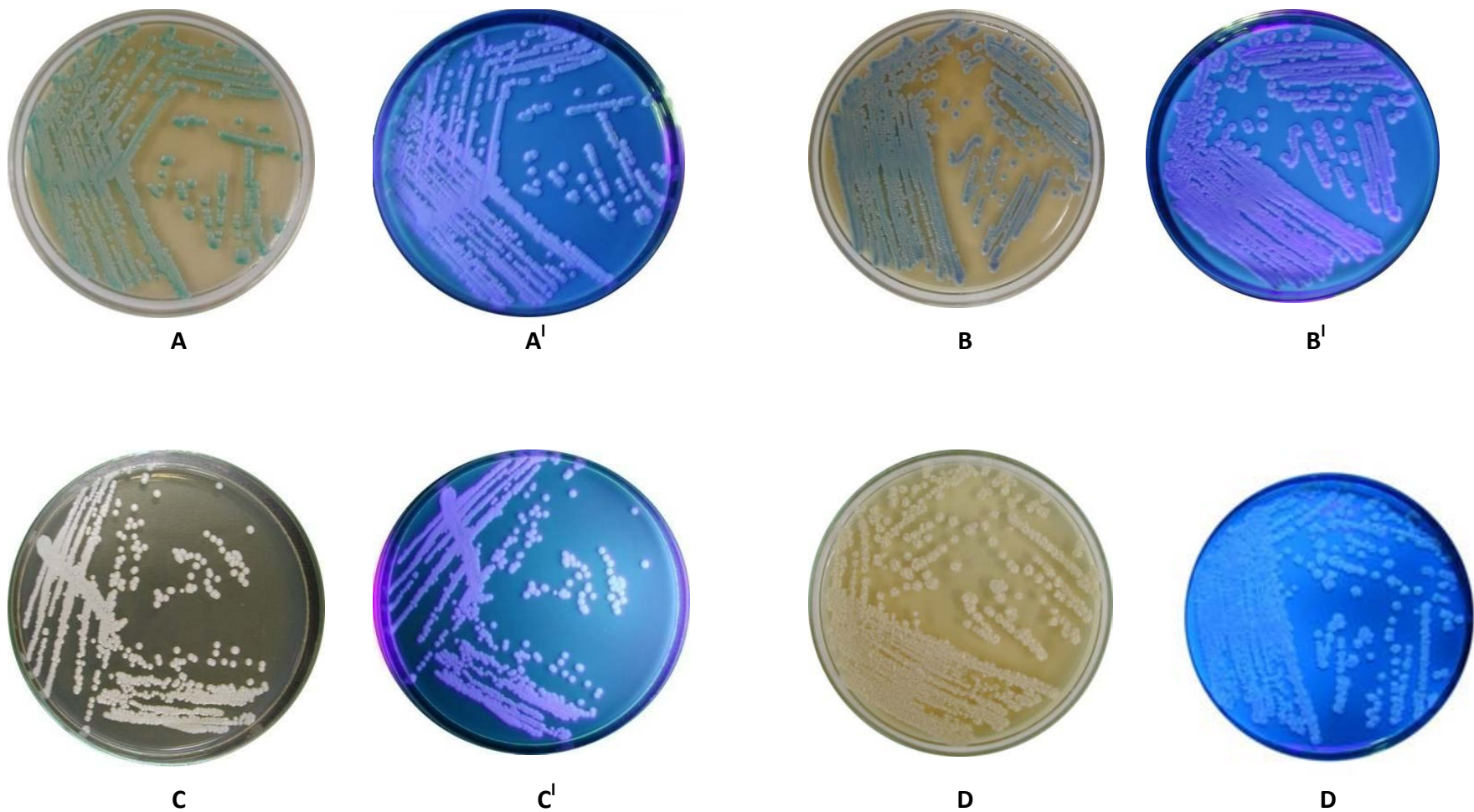
(<sup>IP</sup>): especies que requieren otras pruebas adicionales para una correcta diferenciación, (<sup>a</sup>): morfología redonda, lisa, abultada, (<sup>b</sup>): morfología rugosa, con micelios, seca, estrellada

Entre las características culturales desarrolladas por las especies representativas de los géneros de levaduras evaluados, se observó que las colonias de *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Trichosporon* mostraron fluorescencia. No obstante, su color y morfología son características distintivas que permitieron realizar una discriminación inicial entre estos géneros. A pesar de que las especies de *Rhodotorula* crecieron en el medio de cultivo, este último no garantizó las condiciones apropiadas para lograr su desarrollo exuberante, lo cual pudiera deberse a la presencia de sustancias inhibidoras en la composición. En cuanto a *Saccharomyces*, su coloración resultó blanca, sin fluorescencia y las colonias redondas y lisas, rodeadas por un halo de precipitado biliar, por lo que en el método se recomienda su diferenciación mediante las pruebas complementarias de asimilación de la rafinosa y la sacarosa, típicas de este género. Las imágenes características de las diferentes especies evaluadas se muestran en las figuras 3.11, 3.12 y 3.13.

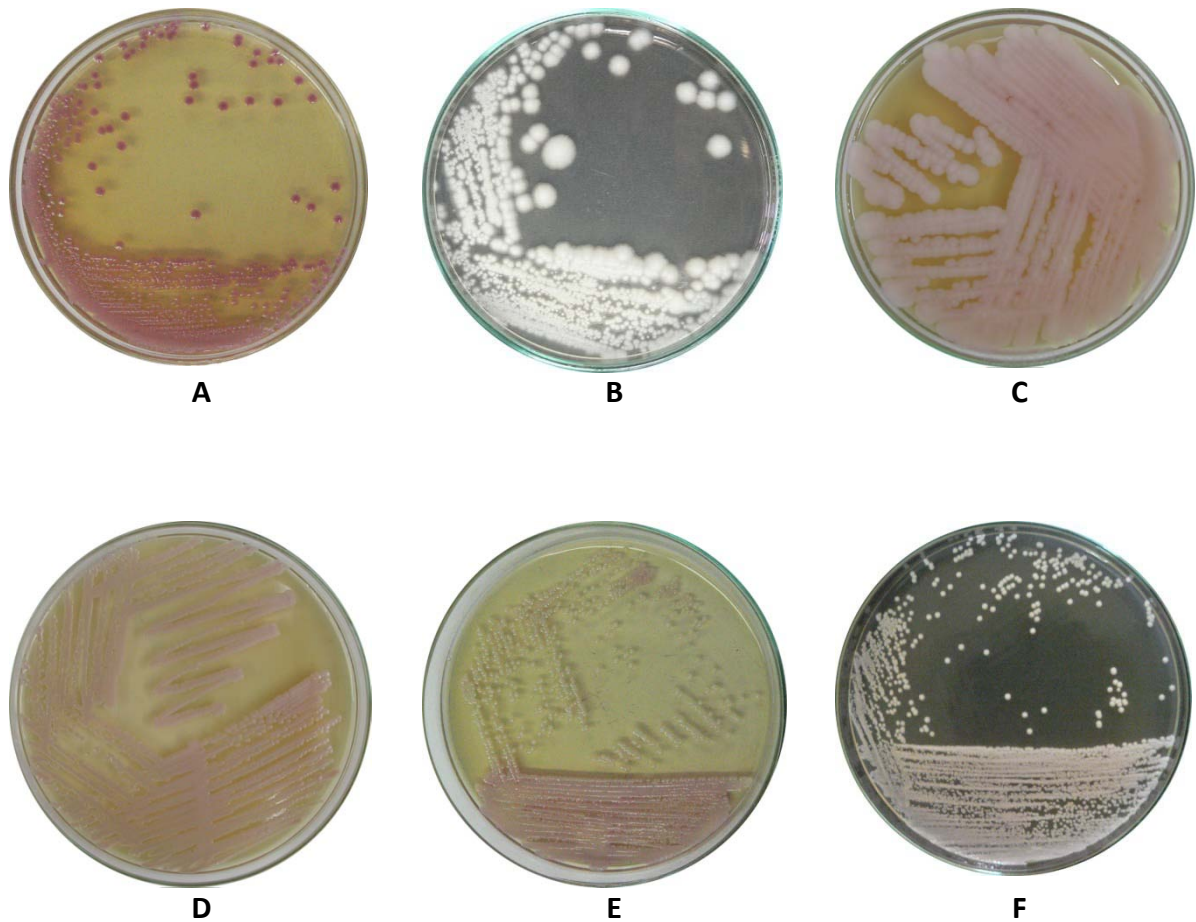
En general, se manifestó el elevado poder inhibitorio de CromoCen CND-F sobre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas evaluadas (Tabla 3.55), exceptuando *P. aeruginosa* y una cepa de *E. coli* que crecieron, mostrando una apariencia plana, traslúcida, con bordes no regulares y olores característicos que diferencian estas especies con facilidad de las del género de interés. Al-Asaaf y Farhan (2000), al estudiar muestras procedentes de pacientes con otitis media, encontraron una frecuencia de aislamientos encabezada por *P. aeruginosa* (39%), seguida de *Aspergillus* spp. (27%), *C. albicans* (18%) y *S. aureus* (18%), demostrando así la prevalencia de bacterias en muestras clínicas en las que aparecen también especies de *Candida*. Es, por tanto, una ventaja adicional del método el poder aislar y detectar *P. aeruginosa* en determinadas muestras, sin interferir en el aislamiento de las especies de interés.

#### **3.5.2.2 Evaluación de la capacidad diagnóstica del medio CromoCen CND-F a partir de cepas microbianas aisladas de diferentes orígenes**

La valoración del desempeño diagnóstico del método cromogénico-fluorogénico con respecto al de referencia, utilizando 460 cepas aisladas pertenecientes a diferentes géneros microbianos (Tabla 3.56), mostró que ambos lograron la recuperación de 339 (73,7%) cepas pertenecientes al género *Candida*. La concordancia entre los resultados positivos y negativos obtenidos mostró la coherencia entre los dos procedimientos, por lo que los parámetros de sensibilidad,



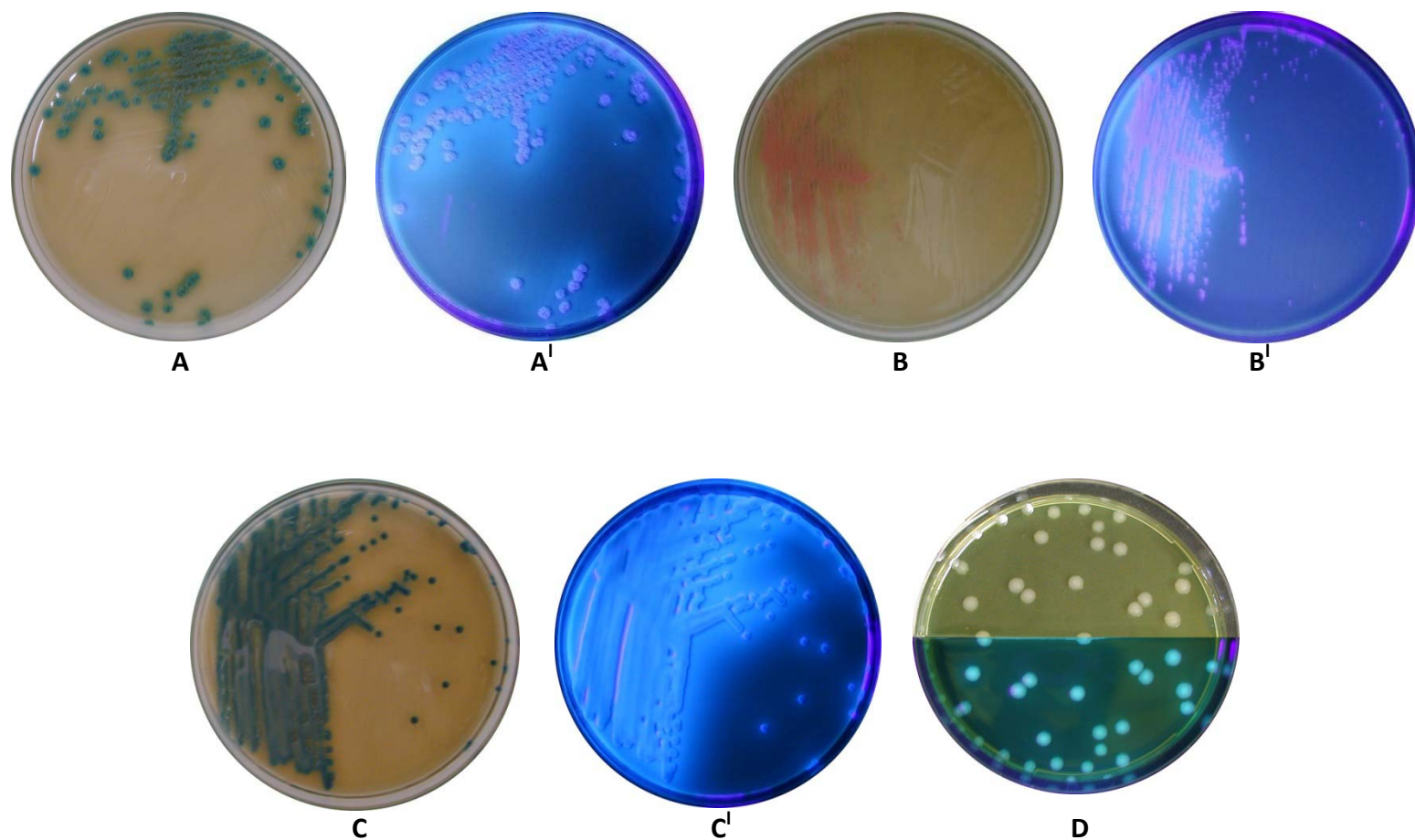
**Figura 3.11.** Reacciones cromogénicas y fluorogénicas de las especies de *Candida* que son identificadas en el medio ChromoCen CND-F  
A y A': *C. albicans*, colonias verde o verde azules con fluorescencia bajo luz UV; B y B': *C. tropicalis*, colonias azules con fluorescencia bajo luz UV; C y C': *C. parapsilosis*, colonias blancas, lisas, con fluorescencia bajo luz UV; D y D': *C. parapsilosis*, colonias blancas, rugosas, con fluorescencia bajo luz UV; (luz UV a 366 nm)



**Figura 3.12.** Reacciones cromogénicas de otras especies de *Candida* que pueden ser identificadas y/o detectadas en ChromoCen CND-F

A: *C. kefyr*, colonias rosado violáceo; B: *C. krusei*, colonias blanco opaco, planas, superficie algodonosa; C: *C. inconspicua* colonias rosadas, planas, superficie algodonosa; D: *C. famata* colonias de color rosado pálido; E: *C. guilliermondii*, colonias de color rosado pálido; F: *C. glabrata*, colonias blanco crema





**Figura 3.13.** Características de otras especies microbianas diferentes de *Candida*

A y A': *Trichosporon asahii* colonias verdes opacas morfología rugosa, con micelios, seca, estrellada, fluorescentes bajo luz UV; B y B': *Rhodotorula glutinis* colonias de rosado a rosado-naranjas, diámetro 0,5 mm (a 30°C) morfología redonda, lisa, abultada y fluorescentes bajo luz UV; C y C': *Cryptococcus humicolus* colonias de color azul intenso, mucoides y fluorescentes bajo luz UV; D: *P. aeruginosa*, biplaca que muestra colonias de color crema-verdoso semitransparente, plana, irregular con fluorescencia bajo luz UV; (luz UV a 366 nm)



**Tabla 3.55.** Características de otros microorganismos no levaduriformes al utilizar los métodos de referencia y el alternativo

Microorganismo	Referencia agar dextrosa de Sabouraud			Alternativo CromoCen CND-F		
	Requisito		Resultado	Requisito		Resultado
	Crecimiento	Color y morfología colonial		Crecimiento	Color y morfología colonial	
<i>E. aerogenes</i>	escaso	crema, translúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>E. faecalis</i>	escaso	crema, translúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>E. coli</i>	escaso	crema, translúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>E. coli</i> (aislada)	escaso	crema, translúcida con precipitado biliar	conforme	de inhibido a escaso	crema, translúcida con precipitado biliar y sin fluorescencia	conforme
<i>K. pneumoniae</i>	escaso	crema, mucoide	conforme	inhibido	-	conforme
<i>P. vulgaris</i>	escaso	crema, translúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>P. aeruginosa</i>	bueno	crema verdoso, semitransparente, plana, irregular y fluorescencia verde a 366 nm	conforme	bueno	crema verdoso, semitransparente, plana, irregular y fluorescencia verde a 366 nm	conforme
<i>S. Typhimurium</i>	escaso	crema, translúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>S. flexneri</i>	escaso	crema, translúcida	conforme	inhibido	-	conforme
<i>S. aureus</i>	escaso	crema	conforme	inhibido	-	conforme

especificidad y exactitud relativas resultaron iguales al 100% (IC=99-100%). Al considerar la equivalencia entre los métodos y la ausencia de discrepancias el índice Kappa mostró un valor de 1, y ello representa, según la norma ISO 16140 (2003), que la fortaleza del método cromogénico-fluorogénico para promover el cultivo y la recuperación de las especies de *Candida*, con respecto al método de referencia, es “casi perfecta”. La selectividad para el método alternativo resultó -0,13 y, por tanto, se puede afirmar que la señal detectada está dada sólo por el microorganismo de interés.

El análisis de las metodologías, en cuanto a la capacidad de recuperar y detectar las especies de *Candida*, clasificadas de acuerdo a su origen (Tabla 3.57), mostró la concordancia entre los resultados positivos y negativos obtenidos y el cálculo de la ExR resultó del 100% (IC=99-100%). En la tabla 3.58 se muestra la identificación de 12 especies de *Candida* entre las cepas aisladas utilizando el método de referencia, distribuidas de la siguiente manera: *C. albicans* n=142 (42%), *C. parapsilosis* n=50 (15%), *C. glabrata* n=45 (13,2%), *C. guilliermondii* n=34 (10%), *C. tropicalis* n=25 (7%), *C. krusei* n=22 (6,5%), *C. lusitaniae* n=12 (3,5%), *C. kefyr* n=5 (1,4%), *C. inconspicua* n=1 (0,3%), *C. famata* n=1 (0,3%), *C. dubliniensis* n=1 (0,3%) y *C. rugosa* n=1 (0,3%).

Varios investigadores, al estudiar el desempeño de dos medios fluorogénicos, determinaron que la frecuencia de aislamientos de *C. albicans* resultó, aproximadamente, del 47 al 73% (Manafi y Willinger, 1991; Willinger *et al.*, 1994), cifra que coincide con la observada para esta especie entre las cepas de origen clínico incluidas en el presente estudio. La eficiencia declarada en dichos estudios (del 96,3 al 99,5%) es ligeramente inferior a la encontrada para el nuevo método desarrollado.

Utilizando un método de filtración por membrana y combinando en dos etapas el empleo de cuatro sustratos fluorogénicos (para la actividad N-acetyl-D-galactosaminidasa, fosfatasa ácida, pirofosfatasa y galactosidasa), Bauters y Nelis (2002) lograron identificar, en el primer paso, en muestras clínicas, tres especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) con una elevada sensibilidad del 96 al 100% y, en el segundo paso, fue posible distinguir las especies *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *Candida maris*, *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae*. El método resulta complejo, pues necesita de equipamiento especial, que no se utiliza en la rutina de los laboratorios de microbiología clínica.

**Tabla 3.56.** Parámetros diagnósticos del CromoCen CND-F para promover el cultivo de cepas aisladas del género *Candida*

Referencia		Alternativo	
SP	339	339	
SN	121	121	
	AP	DP	AN
	339	0	121
			DN
			0
SR, %	100,00		
EsR, %	100,00		
ExR, %	100,00		
E, %	100,00	IC: 99,00 – 100,00%	
Kappa	1,00	Casi perfecta	
F	-0,13		

**Tabla 3.57.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas del CromoCen CND-F con cepas aisladas de varios orígenes

Análisis por origen				
	Vaginal	Ótico	Hemocultivo	Otros
AP	195	48	25	71
AN	107	0	0	14
SR, %	100,00	100,00	100,00	100,00
EsR, %	100,00	-	-	100,00
ExR, %	100,00	100,00	100,00	100,00
	IC: 99,00 – 100,00%			

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, AP: acuerdos positivos, DP: desvíos positivos, AN: acuerdos negativos, DN: desvíos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, E: eficacia, F: selectividad, IC: intervalo de confianza

**Tabla 3.58.** Total de especies de *Candida* identificadas utilizando el método de referencia

Microorganismo	SN	SP	ExR, %
<i>C. albicans</i>	0	142	100,00
<i>C. parapsilosis</i>	0	50	100,00
<i>C. glabrata</i>	0	45	100,00
<i>C. guilliermondii</i>	0	34	100,00
<i>C. tropicalis</i>	0	25	100,00
<i>C. krusei</i>	0	22	100,00
	<b>318</b>		
		<b>21</b>	
<b>Total</b>		<b>339</b>	

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, ExR: exactitud relativa

Se evidenció, en esta etapa de la investigación, que el total de cepas identificadas por ambos métodos (n=339) (Tabla 3.59) concordó con la cifra de recuperadas a partir de las muestras clínicas por los dos procedimientos (Tabla 3.56).

El método cromogénico-fluorogénico logró la identificación, en menos de 48 h, de cinco especies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, coincidiendo el número de cepas tipificadas, con el obtenido por el método de referencia.

La valoración de los acuerdos y desviaciones entre los procedimientos evaluados reflejó indicadores de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas del 100% cada uno (IC=99-100%) y el cálculo del índice Kappa arrojó un valor igual a 1.

Para las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis* se determinó la selectividad del método alternativo, siendo la misma -0,5 y -0,95, respectivamente, ambas mayores que -1, valor recomendado como límite inferior según la norma ISO 16140 (2003).

En la tabla 3.60 se presenta la cantidad de cepas pertenecientes a las cinco especies de *Candida* identificadas (en 48 h) y agrupadas según su procedencia en exudados vaginales, exudados óticos, hemocultivos y otros. Se aprecia que, siendo *C. albicans* la especie de mayor incidencia, la misma se encontró presente en el 34,4% (n=104) de los exudados vaginales, el 22,9% (n=11) de los óticos, el 12% (n=3) de los hemocultivos y el 28,2% (n=24) de otros orígenes. *C. parapsilosis*, que le sigue en orden de frecuencia, se halló en el 41,7% (20) de los exudados óticos, el 20% (n=5) de los hemocultivos, el 10,6% (n=9) en la categoría de otros orígenes y en sólo el 5,3% (n=16) de los exudados vaginales. La especie *C. tropicalis* se localizó en el 4,6% (n=14) de los exudados vaginales y en el 12,9% (n=11) en la categoría de otros. *C. krusei* se registró en el 6% (n=18) y el 6,3% (n=3) de los exudados vaginales y óticos, respectivamente y en el 1,2% (n=1) del conjunto de otros orígenes. Por último, *C. kefyr*, sólo se encontró en un 5,9% (n=5) de muestras procedentes de la categoría de otros orígenes. El cálculo de los parámetros diagnósticos de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, al considerar los acuerdos encontrados por ambas metodologías, resultó igual a 100% (IC=99-100%).

Por otro lado, se demostró que el método alternativo fue capaz de detectar dos grupos de especies. Uno de ellos comprendió un total de 46 cepas con colonias blancas, sin fluorescencia, típicas de las especies *C. glabrata* y *C. rugosa*; y otro grupo estuvo representado por 47 cepas

**Tabla 3.59.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, índice Kappa y selectividad para identificar especies a partir de cepas aisladas del género *Candida*

<i>C. albicans</i>					<i>C. tropicalis</i>				<i>C. kefyr</i>				<i>C. parapsilosis</i>				<i>C. krusei</i>			
Referencia		Alternativo			Referencia		Alternativo		Referencia		Alternativo		Referencia		Alternativo		Referencia		Alternativo	
SP	142	142			25	25			5	5			50	50			22	22		
SN	318	318			435	435			455	455			410	410			438	438		
	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN
	142	0	318	0	25	0	435	0	144	0	316	0	50	0	410	0	25	0	435	0
SR, %		100,00			100,00				100,00				100,00				100,00			
EsR, %		100,00			100,00				100,00				100,00				100,00			
ExR, %		100,00			100,00				100,00				100,00				100,00			
IC: 99,00 – 100,00%																				
Kappa		1,00			1,00				1,00				1,00				1,00			
F		-0,5			*				*				-0,95				*			

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, AP: acuerdos positivos, DP: desvíos positivos, AN: acuerdos negativos, DN: desvíos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, F: selectividad, (\*) El número mínimo de resultados para calcular la selectividad para las 460 muestras es 46, por lo tanto se pudo calcular para *C. albicans* y *C. parapsilosis*

**Tabla 3.60.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas utilizando cepas identificadas de varios orígenes

<i>C. albicans</i>					<i>C. tropicalis</i>				<i>C. kefyr</i>				<i>C. parapsilosis</i>				<i>C. krusei</i>			
	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR
AP	104	11	3	24	14	0	0	11	0	0	0	5	16	20	5	9	18	3	0	1
AN	198	37	22	61	288	48	25	74	302	48	25	80	286	28	20	76	284	45	25	84
SR, %	100,00				100,00				100,00				100,00				100,00			
EsR, %	100,00				100,00				100,00				100,00				100,00			
ExR, %	100,00				100,00				100,00				100,00				100,00			
IC: 99,00 – 100,00%																				

AP: acuerdos positivos, AN: acuerdos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, VAG: vaginales, OTI: óticos, HEM: hemocultivos, OTR: otros

que mostraron un color de rosado a rosado pálido, con fluorescencia que caracteriza a las especies *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. famata*. El método prevé un conjunto de pruebas adicionales que posibilitan lograr la discriminación entre las especies, mostrando en la tabla 3.61, a modo de ejemplo, la identificación de 34 de las 47 cepas del grupo 2, específicas de *C. guilliermondii*.

Al efectuar el análisis de los grupos de especies detectados según su procedencia (Tabla 3.62), se observó que las cepas del grupo 1 mostraron un 8,3% (n=25) en muestras vaginales, un 22,9% (n=11) en óticos y un 11,8% (n=10) agrupado en otros orígenes, mientras que se encontró para las especies características del grupo 2, una frecuencia del 5% (n=15) en vaginales, el 6,3% (n=3) en óticos, 68% (n=17) en hemocultivos y 14,1% (n=12) en el conjunto de otros orígenes. Al culminar la identificación de todas las especies clasificadas en el grupo 2, se encontró que *C. guilliermondii* fue la responsable del total de cepas aisladas en los hemocultivos.

No se encontraron resultados de estudios divulgados en la literatura científica que aborden, con profundidad y detalle, la identificación de especies de *Candida*, su frecuencia de aislamiento y la exactitud diagnóstica de métodos fluorogénicos por tipos u orígenes de las muestras ensayadas. Los resultados alcanzados corroboraron que el método cromogénico-fluorogénico con el empleo del CromoCen CND-F puede ser recomendado para el cultivo, detección e identificación de las especies de *Candida* más frecuentes en muestras clínicas.

### **3.5.2.3 Exactitud relativa del medio CromoCen CND-F a partir de exudados vaginales**

La evaluación del desempeño diagnóstico del método cromogénico-fluorogénico, en paralelo con el método tradicional, como técnica de cultivo de aislamiento primario frente a las 410 muestras de exudados vaginales, demostró la presencia de *Candida* spp. en el 30,24% del total de muestras estudiadas. El medio CromoCen CND-F mostró resultados satisfactorios en el cultivo, aislamiento, detección e identificación simultánea de las especies de *Candida*, responsables de la infección (Figura 3.14). Las especies aisladas e identificadas por ambas metodologías mostraron el siguiente orden de incidencia: *C. albicans* 73 (58,9%), *C. glabrata* 18 (14,5%), *C. parapsilosis* 9 (7,3%), *C. krusei* 7 (5,6%), *C. guilliermondii* 6 (4,8%), *C. tropicalis* y *C. lusitaniae*, igual cantidad, 5 (4%) y *C. inconspicua* 1 (0,8%). La exactitud relativa resultó del 100% (IC=99-100%). El índice Kappa se mostró igual a 1 y la selectividad igual a -0,27.

**Tabla 3.61.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, índice Kappa y selectividad para detectar dos grupos de especies de acuerdo a sus características cromáticas a partir de cepas aisladas del género *Candida*

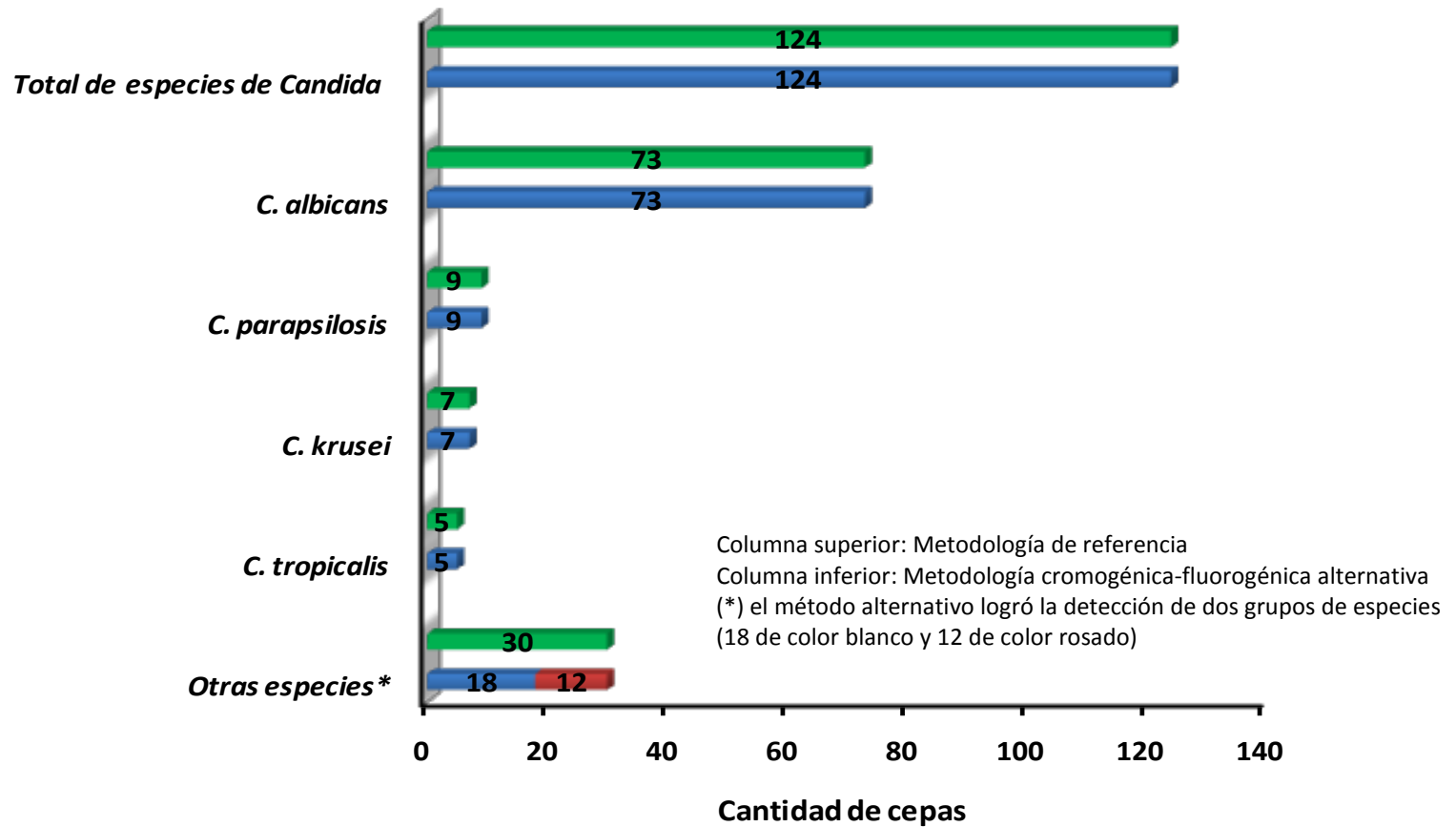
Grupo 1 (colonias blancas)					Grupo 2 (colonias rosado pálido)					<i>C. guilliermondii</i>				
Referencia		Alternativo			Referencia		Alternativo			Referencia		Alternativo		
SP	46	46			47	47			34	34				
SN	414	414			413	413			426	426				
	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN	AP	DP	AN	DN		
	46	0	414	0	47	0	413	0	34	0	426	0		
SR, %		100,00			100,00			100,00			100,00			
EsR, %		100,00			100,00			100,00			100,00			
ExR, %		100,00			100,00			100,00			100,00			
IC: 99,00 – 100,00%														
Kappa		1,00			1,00			1,00			1,00			
F		-1			-0,99									

SP: suma de resultados positivos, SN: suma de resultados negativos, AP: acuerdos positivos, DP: desvíos positivos, AN: acuerdos negativos, DN: desvíos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, F: selectividad

**Tabla 3.62.** Sensibilidad, especificidad y exactitud relativas para detectar los grupos de cepas aisladas con características similares

Grupo 1 (colonias blancas)					Grupo 2 (colonias rosado pálido)				C. guilliermondii			
	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR	VAG	OTI	HEM	OTR
AP	25	11	0	10	15	3	17	12	6	2	17	9
AN	277	37	25	75	287	45	8	73	296	46	8	76
SR, %		100,00			100,00				100,00			
EsR, %		100,00			100,00				100,00			
ExR, %		100,00			100,00				100,00			
IC: 99,00 – 100,00%												

AP: acuerdos positivos, AN: acuerdos negativos, SR: sensibilidad relativa, EsR: especificidad relativa, ExR: exactitud relativa, VAG: vaginales, OTI: óticos, HEM: hemocultivos, OTR: otros



**Figura 3.14.** Resultados comparativos de la identificación de cepas de *Candida* procedentes de exudados vaginales utilizando el método de referencia y el cromogénico-fluorogénico alternativo



Estos indicadores evidenciaron que el método puede ser utilizado con seguridad para detectar la presencia de especies de *Candida* como agentes patógenos en muestras vaginales.

El conjunto de resultados obtenidos evidencia las ventajas del nuevo método sobre otros que utilizan sustratos fluorogénicos, como es el caso del propuesto por Bauters y Nelis (2002), que sólo logra identificar *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* y, además, requiere del empleo de cuatro sustratos, un medio basal cromogénico, un agente permeabilizante, personal entrenado en una técnica no usual en los laboratorios clínicos, equipamiento costoso y una ejecución compleja y prolongada en dos etapas.

Sobresale, como ventajas esenciales del nuevo método para el diagnóstico rápido y el tratamiento temprano y efectivo, la posibilidad de identificar en un período máximo de 48 h cerca del 77% de las especies responsables de la infección vaginal por *Candida*, además de detectar infecciones mixtas presentes en tres (2,4%) de las muestras estudiadas.

#### **3.5.2.4 Recuperación relativa total del CromoCen CND-F con respecto al agar dextrosa de Sabouraud y al CromoCen CND-C**

La recuperación relativa total del medio CromoCen CND-F con respecto al ADS y con relación al CromoCen CND-C mostró resultados superiores al 100%, siendo de 113,15 y 111,88%, respectivamente (Tabla 3.63). El recobrado eficiente de las unidades formadoras de colonias de varias especies a diferentes concentraciones de inóculo determinó las posibilidades del empleo del medio cromogénico-fluorogénico para el recuento de especies de *Candida*.

#### **3.5.2.5 Equivalencia de los recuentos del CromoCen CND-F con el medio agar dextrosa de Sabouraud y con el medio CromoCen CND-C**

El análisis estadístico, a partir de los recuentos obtenidos utilizando varios métodos microbiológicos, se refleja en la tabla 3.64. El ensayo demostró la equivalencia entre los métodos (i) CromoCen CND-F/ ADS y (ii) CromoCen CND-F/CromoCen CND-C, ya que los valores de los límites inferior y superior, al considerar la incertidumbre expandida de la diferencia de los recuentos entre los métodos, se encontraron dentro del lapso establecido para el análisis (-20 a 20), considerando un 10% de la desviación máxima aceptable, tal como recomienda la norma ISO 17994 (2004).

**Tabla 3.63.** Análisis de la recuperación relativa total del método cromogénico-fluorogénico con respecto al método de referencia y al método cromogénico

No.	Muestra*	Xm	Ym	Zm	RR (%)	RR (%)
		ADS	CND-C	CND-F	CND-F/ADS	CND-F/CND-C
1	CD2	8,7	9,0	14,0	160,9195	155,5556
2	CA	15,7	18,3	26,0	165,6051	142,0765
3	CRR1-1	22,3	24,0	30,3	135,8744	126,2500
4	CL	23,0	15,7	17,7	76,9565	112,7389
5	CRT1-1	23,3	24,0	30,0	128,7554	125,0000
6	CKF	29,0	19,7	24,3	83,7931	123,3503
7	CT	34,7	29,3	30,0	86,4553	102,3891
8	CD1	80,3	90,7	93,7	116,6874	103,3076
9	CP	85,0	86,7	102,7	120,8235	118,4544
10	CIR	97,0	134,7	115,3	118,8660	85,5976
11	CGL	101,7	89,3	74,3	73,0580	83,2027
12	CIT	130,0	154,3	141,7	109,0000	91,8341
13	CRR1	170,3	183,0	181,3	106,4592	99,0710
14	CRT1	196,0	202,7	197,7	100,8673	97,5333
<b>Recuperación relativa total</b>					<b>113,15%</b>	<b>111,88%</b>

Xm ADS: media de los recuentos utilizando agar dextrosa de Sabouraud, Ym CND-C: media de los recuentos utilizando CromoCen CND-C, Zm CND-F: media de los recuentos utilizando CromoCen CND-F, RR: recuperación relativa, (\*): las muestras fueron codificadas de acuerdo a la cepa utilizada y la concentración del inóculo

**Tabla 3.64.** Determinación de la equivalencia del recuento del método cromogénico-fluorogénico con respecto al método de referencia y al método cromogénico

No.	Muestra*	ADS		CND-C		CND-F		CND-F y ADS		CND-F y CND-C	
		$X_{PR}$	$\ln(X_{PR-R})$	$X_{PR-CA}$	$\ln(X_{PR-CA})$	$X_{PR-FA}$	$\ln(X_{PR-FA})$	$X_{IP}, \%$	$(X_{IP}-X_{MP})^2$	$X_{IP}, \%$	$(X_{IP}-X_{MP})^2$
1	CRT1-1	23,3	3,1499	24,0	3,1781	30,0	3,4012	-25,1314	493,949	-22,3144	412,340
2	CKF	29,0	3,3673	19,7	2,9806	24,3	3,1918	17,5449	418,257	-21,1229	365,370
3	CT	34,7	3,5458	29,3	3,3776	30,0	3,4012	14,4581	301,527	-2,3610	0,124
4	CD1	80,3	4,3862	90,7	4,5076	93,7	4,5397	-15,3558	154,987	-3,2185	1,465
5	CP	85,0	4,4427	86,7	4,4625	102,7	4,6315	-18,8836	255,270	-16,9034	221,866
6	CIR	97,0	4,5747	134,7	4,9031	115,3	4,7478	-17,3116	207,509	15,5224	307,320
7	CGL	101,7	4,6217	89,3	4,4920	74,3	4,3086	31,3140	1171,038	18,3442	414,220
8	CIT	130,0	4,8675	154,3	5,0389	141,7	4,9535	-8,5942	32,351	8,5422	111,310
9	CRR1	170,3	5,1378	183,0	5,2095	181,3	5,2003	-6,2580	11,233	0,9149	8,545
10	CRT1	196,0	5,2781	202,7	5,3117	197,7	5,2866	-0,8467	4,242	2,5145	20,455
								$X_{MP}=-2,9064$		$X_{MP}=-2,00819$	
								SDC=3050,363		SDC=1863,016	
								$S_0=18,4100$		$S_0=14,3876$	
								$Sx_m=5,8218$		$Sx_m=4,5497$	
								$U=11,6435$		$U=9,0995$	
								<b>LI: -14,5500    LS: 8,7371</b>		<b>LI: -11,1077    LS: 7,0913</b>	
Si $(-20 \leq \text{Lím. inferior} \leq 0)$ y $(0 \leq \text{Lím. superior} \leq 20)$ Los métodos:								<b>No son diferentes</b>		<b>No son diferentes</b>	

$X_p$ : recuento promedio de las réplicas de la muestra (UFC/placa),  $X_{ip}$ : porcentaje de la diferencia relativa del logaritmo de los recuentos promedios,  $X_{MP}$ : valor medio de  $X_{ip}$ , SDC: suma de la diferencia de cuadrados,  $S_0$ : desviación estándar de  $X_{MP}$ ,  $Sx_m$ : desviación estándar de la media, U: incertidumbre expandida, (\*): las muestras fueron codificadas de acuerdo a la cepa utilizada y la concentración del inóculo

Este parámetro corroboró que el medio CromoCen CND-F fue capaz de garantizar el cultivo y la recuperación de las especies de *Candida* y, además, confirmó que la enumeración de las mismas en él se correlacionó directamente con la lograda en los medios ADS y CromoCen CND-C.

### **3.5.2.6 Equivalencia del recuento colonial de *Candida parapsilosis* con y sin fluorescencia en el medio CromoCen CND-F**

El estudio de los recuentos de las UFC/placa, bajo luz visible y luz ultravioleta (366 nm), demostró la equivalencia, es decir, reflejó que no existen diferencias significativas entre ambos, mostrando valores del límite inferior de -1,0545 y del límite superior de 1,3464, comprendidos dentro del intervalo de -2 a 2, valores asumidos como aceptables, al considerar una desviación máxima permisible del 1% (Tabla 3.65). El análisis estadístico confirmó que el recuento de las colonias es equivalente para cualquiera de las condiciones de iluminación evaluadas y, por tanto, se puede inferir, que todos los parámetros de robustez de los recuentos obtenidos para el CromoCen CND-C son aplicables al CromoCen CND-F.

## **3.6. Factibilidad de producción y empleo de los nuevos diagnosticadores**

### **3.6.1 Funcionalidad biológica de CromoCen CND-C con respecto a los medios agar dextrosa de Sabouraud, CHROMagar Candida y Candida ID**

Los resultados de la evaluación microbiológica mostraron que todas las formulaciones cromogénicas evaluadas (CromoCen CND-C, CHROMagar Candida y Candida ID) lograron la identificación de *C. albicans*. *C. tropicalis* fue identificada sólo en los medios CromoCen CND-C y CHROMagar Candida, sin embargo, en Candida ID las colonias resultaron del mismo color (rosado) que otras especies evaluadas, tales como *C. kefyr* y *C. guilliermondii*. Exclusivamente, *C. kefyr* se distinguió en CromoCen CND-C. *C. krusei* se diferenció por su morfología colonial típica, manifestando una coloración rosa pálida en CHROMagar Candida, mientras que en los demás medios resultó de color blanco. La especie *C. parapsilosis* mostró colonias de color de blanco a blanco rosa con morfotipo rugosa y estrellada en todos los medios. Otras especies, como *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, no se colorearon en CromoCen CND-C, ni en Candida ID, exhibiendo igual color (lila) en CHROMagar Candida (Tabla 3.66).

Los resultados encontrados en el presente estudio, con respecto a las especies identificadas por los medios cromogénicos, sus características morfológicas y los colores de las cepas, concuerdan

**Tabla 3.65.** Equivalencia de los recuentos coloniales de *C. parapsilosis* con y sin fluorescencia en el medio CromoCen CND-F

No.	Muestra*	Luz visible		Luz UV (366 nm)		X <sub>ip</sub> , %	(X <sub>ip</sub> -X <sub>MP</sub> ) <sup>2</sup>
		X <sub>PR</sub>	Ln(X <sub>PR</sub> )	X <sub>PA</sub>	Ln(X <sub>PA</sub> )		
1	CPT1	108	4,6821	108	4,6821	0,0000	0,021
2	CPT2	113	4,7274	116	4,7536	-2,6202	7,652
3	CPT3	87	4,4659	88	4,4773	-1,1429	1,661
4	CPT1-1	108	4,6821	108	4,6821	0,0000	0,021
5	CPT2-1	114	4,7362	114	4,7362	0,0000	0,021
6	CPT3-1	87	4,4659	90	4,4998	-3,3902	12,504
7	CRT1	108	4,6821	106	4,6634	1,8692	2,970
8	CRT2	114	4,7362	113	4,7274	0,8811	0,540
9	CRT3	88	4,4773	86	4,4543	2,2990	4,635
10	CRT1-1	107	4,6728	109	4,6913	-1,8519	3,991
11	CRT2-1	113	4,7274	116	4,7536	-2,6202	7,652
12	CRT3-1	86	4,4543	89	4,4886	-3,4289	12,780
13	CCT1	107	4,6728	107	4,6728	0,0000	0,021
14	CCT2	117	4,7622	110	4,7005	6,1694	36,282
15	CCT3	87	4,4659	86	4,4543	1,1561	1,020
16	CCT1-1	107	4,6728	106	4,6634	0,9390	0,629
17	CCT2-1	117	4,7622	112	4,7185	4,3675	17,822
18	CCT3-1	87	4,4659	87	4,4659	0,0000	0,021
						X <sub>MP</sub> =0,1459	SDC=84,853
							S <sub>0</sub> =2,5466
							Sx <sub>m</sub> =0,6002
							U=1,2005
Lím. inferior=-1,0545				Lím. superior=1,3464			
Si (-2≤ Lím. inferior ≤0) y (0≤ Lím. superior ≤2) Los métodos no son diferentes							

$X_p$ : recuento promedio de las réplicas de la muestra (UFC/placa),  $X_{ip}$ : porcentaje de la diferencia relativa del logaritmo de los recuentos promedios,  $X_{MP}$ : valor medio de  $X_{ip}$ ,  $SDC$ : suma de la diferencia de cuadrados,  $S_0$ : desviación estándar de  $X_{MP}$ ,  $Sx_m$ : desviación estándar de la media,  $U$ : incertidumbre expandida, (\*): las muestras fueron codificadas de acuerdo a la cepa utilizada y la concentración del inóculo

**Tabla 3.66.** Resultados comparativos de la funcionalidad biológica del CromoCen CND-C, con respecto a los medios agar dextrosa de Sabouraud, CHROMagar Candida y Candida ID

Especie	Código	CromoCen CND-C	agar dextrosa de Sabouraud	CHROMagar Candida	Candida ID
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	verde	blanco	verde	azul
<i>C. albicans</i>	ATCC 17111	verde	blanco	verde	azul
<i>C. tropicalis</i>	C1-UH/Ct	azul bordes claros	blanco	azul gris con halo	rosado
<i>C. kefyr</i>	C1-UH/Ckf	rosado violáceo	blanco	rosado beige	rosado
<i>C. guilliermondii</i>	I-1	rosado claro	blanco	rosado pálida	rosado pálida
<i>C. krusei</i>	C1-UH/Ckr	blanco, opaca	blanco, opaca	rosado, opaca	blanco, opaca
<i>C. parapsilosis</i>	C1-UH/Cp	blanco	blanco	blanco rosa	blanco
<i>C. glabrata</i>	C1-UH/Cgl	blanco beige	blanco	lila	blanco
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 9763	blanco	blanco	lila	blanco

Cepas certificadas: ATCC- *American Type Culture Collection*, C-UH- Colección de la Universidad de la Habana; Cepa aislada: I-Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

con los divulgados por otros autores (Letscher-Bru *et al.*, 2002; Ruiz-Aragón *et al.*, 2003; Ballesté *et al.*, 2005; Ghufrana *et al.*, 2010; Baradkar *et al.*, 2010).

Todas las especies crecieron favorablemente en el medio de cultivo ADS, sin embargo, no fue posible la identificación de las especies por el color de las colonias, debido a que las mismas mostraron características similares.

En resumen, el estudio demostró que el medio CromoCen CND-C permitió la discriminación de un mayor número de especies de *Candida* que el medio Candida ID. Se destaca que *C. kefyr* sólo se logró identificar en CromoCen CND-C y, por ende, este medio supera al CHROMagar Candida en el número de especies a identificar.

### **3.6.2 Resultados de la evaluación de los medios CromoCen CND-C, CromoCen CND-F, CHROMagar Candida y agar Nickerson para el diagnóstico diferencial de especies de *Candida***

Los resultados del ensayo comparativo entre los cuatro medios cromogénicos se muestran en la tabla 3.67. El análisis de los datos reflejó que el medio CromoCen CND-C identificó las especies *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. inconspicua* y *C. krusei*, y, a su vez, detectó a *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. CromoCen CND-F sumó a los resultados obtenidos por CromoCen CND-C la identificación de *C. parapsilosis*, en tanto, el medio CHROMagar Candida facilitó la tipificación de *C. tropicalis* y *C. krusei*, y detectó las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis* que mostraron características fenotípicas similares. El medio de Nickerson, también conocido como el medio selectivo para *Candida*, permitió el reconocimiento de las especies del género por su crecimiento abundante y la capacidad de degradar el sulfito de bismuto presente en la composición, generando con ello el desarrollo de un color marrón de intensidades diferentes, excepto para *C. glabrata*, que manifestó una coloración blanca beige. Las demás especies evaluadas, pertenecientes a otros géneros de levaduras, diferentes de *Candida*, y algunas bacterias exhibieron un crecimiento de moderado a inhibido y las características culturales (color y morfología) de las colonias, que lograron crecer, no mostraron reacciones de interferencia con el género de interés.

El método cromogénico de identificación de *Candida* con el empleo del medio CromoCen CND-C se evaluó con resultados satisfactorios en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología y Parasitología del IPK (Anexo J).

**Tabla 3.67.** Comparación de cuatro medios cromogénicos para el diagnóstico diferencial de *Candida* spp.

Especie	Cantidad	CromoCen CND-C	CromoCen CND-F		CHROMagar Candida	agar Nickerson
<i>C. albicans</i>	17	verde a verde azul	verde a verde azul	F+	verde a verde azul <sup>a</sup>	marrón claro
<i>C. dubliniensis</i>	1	verde	verde	F+	verde oscuro	marrón claro
<i>C. tropicalis</i>	3	azul	azul	F+	azul gris	marrón oscuro <sup>b</sup>
<i>C. kefyr</i>	2	rosado violáceo	rosado	F-	beige	marrón
<i>C. krusei</i>	2	blanco, opaca <sup>c</sup>	blanco, opaca <sup>c</sup>	F-	rosado, opaca <sup>c</sup>	marrón oscuro <sup>b</sup>
<i>C. inconspicua</i>	1	rosado, opaca <sup>c</sup>	rosado, opaca <sup>c</sup>	F-	blanco, opaca <sup>c</sup>	marrón oscuro
<i>C. parapsilosis</i>	10	blanco <sup>d</sup>	blanco <sup>d</sup>	F+	blanco beige a rosado claro	marrón oscuro <sup>e</sup>
<i>C. glabrata</i>	2	blanco beige	beige rosa	F-	lila mate	blanco beige
<i>C. guilliermondii</i>	1	rosado pálido	rosado pálido	F+	rosa malva	marrón claro
<i>C. lusitaniae</i>	4	rosado pálido	rosado pálido	F+	lila a malva rosada	marrón oscuro
<i>E. coli</i>	2	crema <sup>f</sup>	crema <sup>f</sup>	F-	no creció	no creció
<i>P. aeruginosa</i>	1	beige verdoso <sup>g</sup> (F+)	beige verdoso <sup>g</sup>	F+	no creció	no creció
<i>R. mucilaginosa</i>	2	rosado naranja <sup>h</sup>	rosado naranja <sup>h</sup>	F+	rosado <sup>h</sup>	no creció
<i>S. cerevisiae</i>	2	blanco crema <sup>i</sup>	blanco crema <sup>i</sup>	F-	lila mate	marrón <sup>h</sup>
<i>T. asahii</i>	1	verde, opaca <sup>j</sup>	verde, opaca <sup>j</sup>	F+	verde azul <sup>j</sup>	marrón claro <sup>j</sup>
<i>T. inkin</i>	1	verde pálido <sup>j</sup>	verde pálido <sup>j</sup>	F+	verde azul <sup>j</sup>	marrón claro <sup>j</sup>

F+: fluorescente bajo luz UV; F-: no fluorescente; (<sup>a</sup>): variabilidad de la intensidad del color; (<sup>b</sup>): opaco o mate, (<sup>c</sup>): morfología plana, superficie algodonosa y bordes irregulares; (<sup>d</sup>): morfología lisa o rugosa; (<sup>e</sup>): algunas cepas desarrollan un velo blanco sobre la superficie que atenúa el color; (<sup>f</sup>): morfología plana, bordes traslúcidos y precipitado biliar; (<sup>g</sup>): morfología plana, bordes irregulares y traslúcida; (<sup>h</sup>): crecimiento de moderado a escaso a 30°C; (<sup>i</sup>): halo de precipitado biliar alrededor de las colonias; (<sup>j</sup>): morfología rugosa abultada, superficie algodonosa y seca



Ilkit y col. (2007) divulgaron los resultados de un estudio comparativo entre los medios cromogénicos Albicans ID2 y agar Biggy, demostrando que ambos eran efectivos para el aislamiento de levaduras; sin embargo, también encontraron que no eran suficientes por sí mismos para la diferenciación confiable de levaduras hasta nivel de especie y que era necesario, para lograr ese objetivo, emplear como complemento, otros métodos tradicionales, tales como el subcultivo en agar arroz y técnicas de asimilación de sustancias carbonadas.

En resumen, la evaluación funcional de los medios cromogénicos desarrollados (CromoCen CND-C y CromoCen CND-F) reveló un conjunto de ventajas que superan los esquemas de identificación micológicos que existen en la práctica. Con relación al método de referencia, los nuevos métodos cromogénicos y fluorogénicos facilitaron el aislamiento selectivo, la detección y la diferenciación simultánea de especies de *Candida*, simples o asociadas en cultivos mixtos, con una elevada exactitud diagnóstica y en un período mínimo de 36 h. Se añaden, a su vez, como otros elementos valiosos para la eficiencia y rapidez en el diagnóstico diferencial, la sencillez de su preparación, que no requiere de la esterilización por autoclave, el empleo de menor cantidad de materiales (placas y tubos), así como la fácil interpretación de los resultados, que permitió la detección de un mayor número de especies de *Candida*, atribuido a las características culturales que exhiben las colonias en el medio de cultivo.

### **3.6.3 Valoración económica y análisis de la sostenibilidad productiva de los nuevos productos**

Durante el proceso de I+D se tuvo en cuenta la búsqueda y selección de tecnologías de producción nacional, sobre la base de instalaciones existentes, para la elaboración de bases nutritivas utilizando sustratos autóctonos de origen vegetal y bacteriano; y los nuevos medios de cultivo, de modo que garanticen un margen adecuado de ganancias para su comercialización y la sustitución de importaciones.

A partir del precio de venta de los nuevos diagnosticadores, el valor de la placa preparada con CromoCen CND-C y CromoCen CND-F resultó de 0,35 y 0,42 CUC, respectivamente. Al comparar estas cifras con el precio de las placas de los medios de cultivo más comercializados a nivel internacional, se observó que los precios de los medios CromoCen resultan entre 4 y 7 veces menores que el de estos productos (Anexo B).

En la tabla 3.68 se muestra un resumen del costo total para un ensayo de identificación, hasta el nivel de especie de *Candida*, considerando los gastos por consumo de medios de cultivo, reactivos, energía y de la fuerza laboral, requeridos para ejecutar las técnicas establecidas en cada método microbiológico.

El valor total de estos gastos, al utilizar el método de referencia, resultó de 35,56 CUC, mientras que para los métodos alternativos se obtuvieron valores de 10,51 CUC (método cromogénico) y 10,58 CUC (método cromogénico-fluorogénico). Al evaluar comparativamente los costos por diferentes partidas se evidenció que los gastos por concepto de energía y fuerza de trabajo resultaron significativos, repercutieron positivamente en la rentabilidad y fueron inferiores en un 70 % al emplear los nuevos métodos.

Además de las ventajas económicas encontradas, resaltan los beneficios operacionales de los nuevos procedimientos, los cuales requieren menor cantidad de materiales y de experimentos, con la posibilidad realizar el diagnóstico en un reducido período de tiempo.

Resultados similares han sido reportados por otros autores, demostrando que los métodos cromogénicos son más económicos que el método bioquímico tradicional y que algunos de los sistemas de identificación rápida, tales como el ATB ID 32 C, el Fungiscreen 4H y Vitek System YBC (Li-Ung *et al.*, 2001; Quindós *et al.*, 2001). En conclusión, los esquemas de trabajo y las técnicas que los conforman, junto con su valor económico, inciden en la eficiencia de los métodos alternativos.

Momani (2000) publicó un estudio comparativo del costo-beneficio entre el CHROMagar *Candida* con respecto a la metodología de referencia, incluyendo entre las partidas de gastos no sólo los reactivos y materiales, sino, además, el tiempo y la fuerza de trabajo requerida para el diagnóstico de las especies de *Candida*. El autor consiguió la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* con tres días de antelación al aplicar el medio cromogénico con respecto al método tradicional, y resaltó un ahorro por este concepto del 40%, lo que posibilita la selección de una terapia antifúngica apropiada y, a su vez, un tiempo adicional disponible para que el analista lo dedique al trabajo del laboratorio.

Aunque en Cuba se ha constatado un mayor número de fungemias y un predominio de especies diferentes de *C. albicans* con aumento de resistencia al fluconazol, asociada a una mortalidad

**Tabla 3.68.** Costo total de un ensayo para la identificación de especies de *Candida* utilizando tres métodos microbiológicos

Indicador		Medio empleado	Importe del método microbiológico (CUC)		
			referencia	cromogénico	cromogénico-fluorogénico
Medio preparado	cultivo y aislamiento	agar dextrosa de Sabouraud	0,08	-	-
		CromoCen CND-C	-	0,35	-
		CromoCen CND-F	-	-	0,42
	tubo germinativo	suero estéril	0,016	-	-
	micro-cultivo	agar harina de maíz/ tween 80	0,24	0,24	0,24
	pigmentación	ADS+TTC	0,084	-	-
	resistencia a actidiona	ADS+ACT	0,23	-	-
	asimilación de carbohidratos	auxonograma modificado	0,38	0,10	0,10
Mano de obra (CUP)*			33,53	9,52	9,52
Energía (CUP)*			1,00	0,30	0,30
<b>Total</b>			<b>35,56</b>	<b>10,51</b>	<b>10,58</b>

(\*): se consideró la equivalencia de 1,0 CUC = 1,0 CUP; CUC: peso cubano libremente convertible, CUP: peso cubano (moneda nacional), TTC: 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio suplementado en 0,05 g/L en ADS; ACT: actidiona o cicloheximida suplementado en 0,5 g/L en ADS

elevada (50%) (Perurena *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2007), no se logra una cobertura total del diagnóstico hasta el nivel de especie, pues no todos los servicios cuentan con los recursos para ejecutar todo el procedimiento analítico.

Los nuevos métodos desarrollados son sencillos, no requieren equipamiento especial, su costo es menor que el de los comercializados en el mercado, y son factibles de ser distribuidos en los laboratorios de microbiología.

El juego desarrollado por el CENSA para el diagnóstico rápido de vaginitis por *Trichomonas vaginalis*, *Candida* spp. y *Gardnerella vaginalis*, basado en la agregación de partículas de látex acopladas a anticuerpos específicos, ha mostrado su utilidad en la atención primaria de salud en Cuba (Betancourt *et al.*, 2009). Los medios desarrollados en el presente trabajo pueden constituir un complemento significativo al posibilitar la identificación de las especies de mayor relevancia, pues dicho juego no permite la diferenciación entre especies.

Otras perspectivas de aplicación de los métodos cromogénico y cromogénico-fluorogénico obtenidos se abren para el aislamiento primario y la identificación hasta nivel de especie en otras muestras clínicas, en las cuales se ha revelado una elevada incidencia. Salazar y col. (2006) han divulgado que entre los gérmenes nosocomiales más frecuentes en la UCI, en Cuba, *Candida* spp. ocupa el séptimo lugar entre los microorganismos aislados a partir de secreciones bronquiales, el quinto entre los hemocultivos y el primero en los urocultivos.

Las micosis oportunistas son más frecuentes y graves mientras mayores son las alteraciones en los diversos niveles de los mecanismos de defensa del hospedero y mayor el factor de virulencia del hongo. Entre las poblaciones más sensibles se encuentran los pacientes con VIH, siendo la infección por *Candida* muy frecuente. En un estudio de 211 autopsias de fallecidos seropositivos al VIH, en el país, se observó que el 44,1% de los mismos estaban infectados por micosis invasivas y el 31,1% presentó *Candida* spp., con predominio de manifestaciones bucofaríngeas (Arteaga *et al.*, 1998). Se describe que las principales manifestaciones clínicas son localizadas en la cavidad bucal y el esófago (Pardi y Cardozo, 2002; Prieto *et al.*, 2006). La casi totalidad de los pacientes VIH sida, en Cuba, está colonizada por *Candida* y entre el 75 y el 95% desarrollan, al menos, un episodio de candidiasis bucal en el curso de la evolución de la enfermedad,

divulgándose, entre las especies más reincidentes, *C. albicans* (54,1%), *C. tropicalis* (8,1%) y *C. glabrata* (2%) (Martínez *et al.*, 1997; Morán y Ferreiro, 2001).

Así mismo, se reporta que la infección más común en la cavidad oral durante la radioterapia es la candidiasis y el uso de dosis tumoricidas de radiación aumenta la infección por *Candida* en un 30% (Siré *et al.*, 1998). Estas alteraciones del estado normal de la mucosa oral inducen la pérdida del gusto y, con ello, el interés de alimentarse, contribuyendo finalmente a la malnutrición y a la deshidratación del paciente, con un desenlace fatal de la enfermedad.

El impacto social de los resultados puede, potencialmente, incidir en la reducción de la morbilidad y mortalidad causada por infecciones fúngicas en pacientes inmunodeprimidos, al identificar en sólo 36 h las diferentes especies, incluso en cultivos mixtos y en una amplia variedad de muestras clínicas y, por tanto, orientar mejor el tratamiento antifúngico.

El extracto de batata, el suplemento glicerol y los medios CromoCen CND-C y CromoCen CND-F, desarrollados según las Buenas Prácticas y normas internacionales ISO 9001:2000, constituyen fondos exportables con una elevada calidad y fiabilidad funcional, amparadas por los amplios estudios de validación ejecutados y sus impactos, económico y social, posibilitan el suministro estable y sostenido de productos destinados al diagnóstico clínico y a la vigilancia epidemiológica.

A partir del análisis del conjunto de resultados que demuestran la factibilidad, fiabilidad y robustez de los métodos desarrollados, el Sistema Nacional de Salud puede contar con herramientas útiles, de procedencia nacional y de menor costo, para el diagnóstico temprano de infecciones por *Candida* spp. y orientar mejor el tratamiento, con su consecuente impacto en la salud y en la economía.

## CONCLUSIONES

- Los medios cromogénicos y fluorogénicos desarrollados permiten el cultivo, el aislamiento primario, la identificación y enumeración simultánea del mayor número de especies de *Candida* de relevancia clínica, en un mínimo de 36 h, con el máximo de exactitud relativa, contando el país con productos nacionales para su diagnóstico.
- El extracto vegetal de *Ipomoea batatas* promueve el crecimiento de las especies de *Candida* de importancia clínica, permite la detección simultánea de reacciones cromogénicas y fluorogénicas y puede ser utilizado para la formulación de medios sólidos.
- El método cromogénico posibilita la detección y enumeración de cinco especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. inconspicua*) en menos de 48 h y, adicionalmente, la diferenciación y recuento de *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. famata* y *C. lusitaniae* con las pruebas complementarias.
- El método cromogénico-fluorogénico permite la identificación y enumeración de 10 especies de *Candida*, incluyendo a *C. parapsilosis*, y resulta apropiado para el diagnóstico de las candidiasis sistémicas.
- Los métodos son robustos, precisos y equivalentes a la metodología de referencia por lo que garantizan la fiabilidad de los resultados.
- La producción nacional de la base nutritiva, de los medios CromoCen CND-C y CromoCen CND-F y del suplemento glicerol resulta sostenible, consistente, económicamente factible y los tres últimos diagnosticadores son reconocidos por el CECMED; su empleo en los laboratorios disminuye los costos de la técnica y constituye una solución al diagnóstico de las candidiasis en Cuba.

## RECOMENDACIONES

- Ampliar la evaluación funcional de los medios de cultivo CromoCen CND-C y CromoCen CND-F con otras especies de *Candida* para definir su posible identificación y detección.
- Continuar el estudio de estabilidad de los medios en polvo y las placas listas para el uso con vistas a prolongar su período de validez.
- Introducir a escala industrial la composición sintética libre de carbono para la prueba de asimilación de sustancias carbonadas, como herramienta para la identificación de las levaduras hasta el nivel de especie.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adams ED, Cooper BH. 1974.** Evaluation of a modified Wickerham medium for identifying medically important yeasts. *Am J Med Technol*, 40:377-88.
- Adler-Moore J, Proffitt RT. 2002.** Ambisome: Liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother*, 49(1):21-30.
- Adou-Bryn K, Douchet C, Ferrer A, Grimaud L, Robert R, Richard-Lenoble D. 2003.** Morphologic features of *Candida dubliniensis* modified Pal's medium: primary study. *J Mycol Med*, 13:99-103.
- Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. 2004.** Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. *J Clin Microbiol*, 53: 633-7.
- Al-Asaaf SM, Farhan MJ. 2000.** Otitis externa in a localized area at the South of Jordan. *Saudi Med J*, 21(10):928-30.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodríguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A. 2005.** Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*, 43:1829-35.
- Al-Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. 2003.** Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar. *J Clin Microbiol*, 41(10):4787-9.
- Al-Mosaid A, Sullivan DJ, Salkin IF, Shanley D, Coleman DC. 2001.** Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar. *J Clin Microbiol*, 39(1):323-7.
- Alonso-Vargas R, Iglesias JJ, Ruesga MT, Ullibarri B, Barrenetxea G, Pontón J, Quindós G. 2000.** Utility of a DNA hybridisation test (AFFIRM VP11) for the rapid diagnosis of *Candida* vaginitis. *Rev Iberoam Micol*, 17:S136.
- Alvarado D, Díaz MC, Silva V. 2002.** Identificación y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. aisladas de micosis invasora. Influencia del porcentaje de inhibición del crecimiento para la determinación de CIM. *Rev Med Chile*, 130(4):416-23.
- Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. 2000.** Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 13:167-95.
- AOAC. 1995.** Official method of analysis, 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- Araujo C. 1997.** Diagnóstico de laboratorio de levaduras. En: Araujo C. Manual de procedimientos para el diagnóstico etiológico de enfermedades de transmisión sexual. Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual. Mérida: Facultad de Farmacia Universidad de los Andes; p.12-35.



- Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, Schønheyder HC, Tvede M. 2005.** Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol*, 43:4434-40.
- Arikan S, Rex JH. 2000.** New agents for treatment of systemic fungal infections. *Emerg Drugs*, 5:135-60.
- Arikan S, Rex JH. 2001.** Lipid-based antifungal agents: current status. *Curr Pharm Des*, 7:393-415.
- Arteaga Hernández E, Capó de la Paz V, Pérez Fernández-Terrán ML. 1998.** Mucosis oportunistas invasivas en el SIDA. Un estudio de 211 autopsias. *Rev Iberoam Micol*, 15:33-5.
- Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. 2000.** Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:2081-5.
- Audisio T, Penacino M, Cannistraci R, Bertolotto P. 2005.** Detection of bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis* infection, and vaginal *Candida* infection: a comparative study of methods of extracting exudates, with and without a speculum, during pregnancy. *J Low Genit Tract Dis*, 9(4):213-5.
- Ballesté R, Arteta Z, Fernández CM, Mousqués N, Xavier B, Cabrera JM, Acosta G, Combol A, Gezele E. 2005.** Evaluación del medio cromógeno CHROMagar Candida™ para la identificación de levaduras de interés médico. *Rev Med Uruguay*, 21:186-93.
- Baradkar VP, Mathur M, Kumar S. 2010.** Hichrom candida agar for identification of *Candida* species. *Indian J Pathol Microbiol*, 53:93-5.
- Barney MC, Kot EJ, Chicoye E, inventors; Miller Brewing Company (Milwaukee, WI), assignee. 1990.** Culture medium for detection of beer spoilage microorganisms. US Patent 4,906,573. Mar 06.
- Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. 2002.** Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, E-test, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:1781-4.
- Bauters TG, Nelis HJ. 2002.** Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 40(5):1838-9.
- Bauters TG, Peleman R, Dhont M, Vanhaesebrouck P, Nelis HJ. 2003.** Enzymatic differentiation of *Candida parapsilosis* from other *Candida* spp. in a membrane filtration test. *J Microbiol Meth*, 53(1):11-5.
- Bauters TG, Peleman R, Moerman M, Vermeersc H, de Looze D, Noens L, Nelis HJ. 1999.** Membrane filtration test for rapid presumptive differentiation of four *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 37(5):1498-1502.
- Benetucci A, Tiraboschi IN, Fernández N, Perazi B, Lasala MB. 2008.** Factores de riesgo asociados a candidemias causadas por múltiples especies. *Rev Argent Microbiol*, 40:30-6.

- Bennett JE. 1995.** Mycoses. En: Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infections diseases, 4<sup>th</sup> ed. New York, Churchill Livingstone, p.2331-40.
- Betancourt Bravo A, Sánchez Miranda L, Fernández Lima O, Villoch Cambas A, Lorenzo Hernández M, Álvarez JM. 2009.** Validation of an immunologic diagnostic kit for infectious vaginitis by *Trichomonas vaginalis*, *Candida* spp., and *Gardnerella vaginalis*. *Diag Microbiol Infect Dis*, 63(3):257-60.
- Bobey DG, Ederer GM. 1981.** Rapid detection of yeast enzymes by using 4-methylumbelliferyl substrates. *J Clin Microbiol*, 13:393-4.
- Boktour MH, Kontoyiannis DP, Hanna HA, Hachem RY, Girgawy E, Bobey GP. 2004.** Multiple-species candidemia in patients with cancer. *Cancer*, 101:1860-5.
- Boldo XM, Villa-Tanaca L, Zúñiga G, Hernández-Rodríguez C. 2003.** Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by Randomly Amplified Polymorphic DNA and Multilocus Enzyme Electrophoresis Analyses. *J Clin Microbiol*, 41(10):4799-804.
- Bostock P. 2009.** A theory of sugar drying. A Paper for the British Society of Sugar Technologists Meeting (22 april-01 March). p.1-9. En: <http://www.sucrose.com/bsst/2009agm3.pdf>. Acceso: Mayo 2010.
- Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. 2006.** Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Jpn J Infect Dis*, 59:73-6.
- Bridson EY. 1994.** The development, manufacture and control of microbiological culture media. UK: Unipath Ltd, p.27-28, 39.
- Bridson EY. 1998.** The OXOID Manual. 8<sup>th</sup> ed. OXOID Limited. UK.: Wade Road, Basingstoke, p.389.
- Buchaille L, Freydiere AM, Guinet R, Gille Y. 1998.** Evaluation of six comercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17:479-88.
- Buzoleva LS, Somov GP. 2001.** Nutrient medium for culturing and quantitative estimation of *Yersinia* and *Listeria* in environment objects. RU Patent 2161655 C2. Jan 10.
- Galvagno MA, Cerrutti P. 2004.** Aumento de la actividad panificante de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación. *Rev Argent Microbiol*, 36(1)41-6. ISSN 0325-7541.
- Campbell C, Davey K, Holmes A, Szekely A, Warnock D. 1999.** Comparison of the API Candida system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *J Clin Microbiol*, 37(3):821-3.
- Canton E, Peman J, Carrillo-Muñoz A, Orero A, Ubeda, Viudes A, Gobernado M. 1999.** Fluconazole susceptibilities of bloodstream *Candida* sp. isolates as determined by National Committee for Clinical Laboratory Standards Method M27-A and two others methods. *J Clin Microbiol*, 37:2197-200.

- Cárdenes-Perera CD, Torres-Lana A, Alonso-Vargas R, Moragues-Tosantas MD, Pontón-San Emeterio J, Quindós-Andrés G, Arévalo-Morales MP. 2004.** Evaluation of API ID 32C® and VITEK-2® to identify *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 50(3):219-21.
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Cárdenes CD, Alonso R, Arévalo P, Brió S, Madariaga L. 2001.** Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*, 18:105-8.
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Cardenes CD, Alonso-Vargas R, Brió S, Arévalo P. 2003.** Performance of Bactocard Candida compared with the germ test tube for the presuntive identification of *Candida albicans*. *Mycoses*, 46:467-70.
- Castro Méndez C, Martín Mazuelos E. 2004.** Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. Control de la Calidad SEIMC En: [http://www.seimc.org/control/revi\\_Mico/Cdublinien.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Mico/Cdublinien.htm). Acceso: Diciembre 2008.
- Chaturvedi V, Ramani R, Rex JH. 2004.** Collaborative study of Antibiotic Medium 3 and Flow Cytometry for identification of amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *J Clin Microbiol*, 42(5):2252-4.
- Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulia-Barrett SL, La Fe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. 2000.** Identification of medically important yeasts using PCR-Based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol*, 38(6):2302-10.
- Clancy CJ, Nguyen MH. 1999.** Correlation between *in vitro* susceptibility determined by E-test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:1289-90.
- CLSI M27-A2 2002.** National Committee for Clinical Laboratory Standard. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 2<sup>th</sup> ed. Approved Standard M27-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- Colom MF, Jover A, Ferrer C. 2006.** Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. *Rev Iberoam Micol*, 23:26-8.
- Cook PW, inventor; Cascade Biologics, Inc. assignee. 2006.** Animal product-free cell culture media extracts, supplements and culture media supplement systems. US Application 2060094114. May 04.
- Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. 2002.** New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol*, 68(7):3622-7.
- Correia A, Sampaio P, Pais JA. 2004.** Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR Fingerprinting of *Candida* clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 42(12):5899-903.
- Corry JEL, Basil Jarvis B, Passmore S, Hedges A. 2007.** A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food Microbiol*, 24:230-53.

- Costa SO, de Lourdes Branco C. 1964.** Evaluation of a molybdenum culture medium as selective and differential for yeast. *J Pathol Bacteriol*, 87:428-31.
- Crist AE, Dietz TJ, Kampschroer K. 1996.** Comparison of the MUREX *C. albicans*, Abicans-Sure and BactiCard Candida test kits with the germ tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 34:2616-8.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Salvado M, Warnock DW, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL. 2005.** *In vitro* susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain 2002-2003. *J Antimicrob Chemother*, 55:194-9.
- Dalton MT, Haldane DJ, MacDonald J. 1989.** Rapid identification of *Candida albicans* using 4-methylumbelliferyl N-acetyl-beta-galactosaminide. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 12:521-3.
- Dave RI, Joshi NS, Patel JR, Thakar PN. 1991.** Protein hydrolysates- a review. *Indian J Dairy Science*, 44(9):557-64.
- Davey GK, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. 1998-a.** Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, 36:926-30.
- Davey GK, Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. 1998-b.** Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for *in vitro* susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother*, 42:439-44.
- De Champs C, Lebeau B, Ambroise-Thomas P, Grillot R. 1995.** Evaluation of Albicans ID plates. *J Clin Microbiol*, 33:2227-8.
- De Hoog GS, Guarro J, Tan CS, Winternmans RGF, Gené J. 1996.** Pathogenic fungi and common opportunists. En: De Hoog GS, Guarro J (Eds). *Atlas of Clinical Fungi*. Reus, Universitat Rovira i Virgili, p.1-238.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2009.** *Atlas of Clinical Fungi*. CD Pilot Version of the 3<sup>th</sup> ed.
- De Marco D, Perotti M, Ossi CM, Burioni R, Clementi M, Mancini N. 2007.** Development and validation of a molecular method for the diagnosis of medically important fungal infections. *The New microbiol*, 30(3):308-12. ISSN 1121-7138.
- Dealler SF. 1991.** *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 29:1081-2.
- Decker H, Jaenicke E. 2004.** Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Develop Comparat Immunol*, 28(7-8):673-87.
- Denning DW. 2002.** Echinocandins: A new class of antifungal. *J Antimicrob Chemother*, 49:889-91.

- Dicker LW, Mosure DJ, Steece R, Stone KM. 2007.** Testing for sexually transmitted diseases in U.S. Public health laboratories in 2004. *Sex Transm Dis*, 34(1):41-6.
- Druetta A, Freydiere AM, Guinet R, Gille Y. 1993.** Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 12(5):336-42.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME, Jones RN. 1996.** Interlaboratory evaluation of E-test method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using Casitone Agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucosa. *J Clin Microbiol*, 34:848-52.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, Ghannoum MA. 1999.** Multicenter comparison of the Sensititre® YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and other yeast-like organisms. *J Clin Microbiol*, 37:591-5.
- Favel A, Michel-Nguyen A, Chastin C, Trousson F, Penaud A, Regli P. 1997.** *In vitro* susceptibility pattern of *Candida lusitanae* and evaluation of E-test method. *J Antimicrob Chemother*, 39:591-6.
- Fenn JP, Billetdeaux E, Segal H, Skodack-Jones L, Padilla PE, Bale M, Carroll K. 1999.** Comparison of four methodologies for rapid and cost-effective identification of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*, 37(10):3387-9.
- Okulicz JF, Rivard RG, Conger NG, Nguyen MX, Hospenthal DR. 2007.** Primary isolation of *Candida* species from urine specimens using chromogenic medium. *Mycoses*, 51(2):141-6.
- Fernández Andreu CM, Martínez Machín G, Illnait Zaragoza MT, Perurena Lacha MR, Águila Sánchez A, Brito Galloso M. 2007.** Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. *Rev Cubana Med Trop*, 59(2):pp. 0-0. ISSN 0375-0760.
- Fernández O, Lantero MI. 2004.** Prevalence of *Candida albicans* and *Trichomonas vaginalis* in pregnant women in Havana City by an immunologic Latex Agglutination Test. *MedGenMed*, 6(4):50.
- Flores-Paz R, Rivera-Sánchez R, Ruix-Pérez NJ, Arriaga-Alba M. 2008.** Utilidad del sistema Affirm VPIII y de la prueba L-Pap para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26:338-42.
- Fosch S, Fogolín N, Azzaroni E, Pairetti N, D'ana L, Minacori H, Tita I, Redona M, Gribaudo G. 2006.** Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, aspectos clínicos y estudios microbiológicos. *Rev Argent Microbiol*, 38:202-5.
- Fowler JL, Clark WS, Foster JF, Hopkins A, 1978.** Analyst variation in doing the standard plate count as described in Standard Methods for the Examination of Dairy Products. *J Food Prot*, 41: 4-7.

- Fowler RS. 2007.** Expansion of altered vaginal flora states in vaginitis to include a spectrum of microflora. *J Reprod Med*, 52(2):93-9.
- Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM. 2002.** Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 1092-7.
- Freydiere AM, Guinet R. 1997.** Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeast. *Rev Iberoam Micol*, 14:85-9.
- Freydiere AM, Parant F, Chaux C, Gille Y. 2000.** Candida ID, a new cromogenic medium compared to Albicans ID2. *Clin Microbiol Infect*, 6(Suppl.1):181.
- Freydiere AM, Perry JD, Faure O, Willinger B, Tortorano AM, Nicholson A, Pemán J, Verweij PE. 2004.** Routine use of a commercial test, GLABRATA RTT, for rapid identification of *Candida glabrata* in six laboratories. *J Clin Microbiol*, 42(10):4870-2.
- Freydiere AM, Robert R, Ploton C, Marot-Leblond A, Monerau F, Vandenesch F. 2003.** Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. *J Clin Microbiol*, 41(8):3861-3.
- Fricker-Hidalgo H, Orensa S, Lebeau B, Pelloux H, Brenier-Pinchart MP, Ambrosie-Thomas P, Grillot R. 2001.** Evaluation of Candida ID, a new chromogenic medium for fungal isolation and preliminary identification of some yeast species. *J Clin Microbiol*, 39(4):1647-9.
- Gacser A, Schafer W, Nosanchuk S, Salomon S, Nosanchuk D. 2007.** Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*, 44:1336-41.
- Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll DR. 1999.** Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. *J Clin Microbiol*, 37(12):3804-8.
- García-Martos P, García-Agudo R, Domínguez I, Noval JA. 2001.** Otomicosis: aspectos clínicos y microbiológicos. *Rev Diagn Biol*, 50(1): 17-22.
- Gatica JL, Goic I, Martínez MA, Reid I, Céspedes P, Arias MC, Ovalle A y Muster H. 2002.** Utilidad del Agar Cromocandida para el diagnóstico diferencial de *Candida* spp. aisladas de muestras vaginales. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 67(4):300-4.
- Gavaldá J, Ruiz I. 2003.** Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección fúngica invasiva por *Candida* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(9):498-508.
- Gebhardt S, Thomas R. 2002.** Nutritive value of foods. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Home and Garden Bulletin No. 72, Nutrient Data Laboratory, Beltsville, Maryland, USA.
- Geraldo dos Santos O, Teixeira Ribeiro E, de Assis Baroni F. 2006.** An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 48(6):311-5.

- Ghannoum MA. 2000.** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13(1):122-43.
- Ghelardi E, Pichierri G, Castagna B, Barnini S, Tavanti A, Campa M. 2007.** Efficacy of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect*, 14(2):141-7.
- Ghufrana Nadeem S, Tabassum Hakim S, Urooj Kazmi S. 2010.** Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med*, 5: ISSN 1819-6357.
- Godoy P, Almeida LP, Lopes A. 2001.** Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. *Rev Iberoam Micol*, 18:197-9.
- Gómez J, Ortega N, Herrero JA. 2004.** Bases y nuevas perspectivas del uso racional de los antifúngicos. *Rev Esp Quimioterap*, 17(1):64-8.
- Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. 2000.** Evaluation of the VITEK 2 System for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol*, 38(5):1782-5.
- Guelfand L, Grisolia P, Bozzano C, Kaufman S. 2003.** Comparison of methods for the identification of the most common yeasts in the clinical microbiology laboratory. *Rev Argent Microbiol*, 35:49-53.
- Guinet R, Nerson D, Declosets F, Dupouy-Camet J, Kures L, Marjollet M, Poirot JL, Ros A, Texier-Maugein J, Volle PJ. 1988.** Collaborative evaluation in seven laboratories of a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *J Clin Microbiol*, 26:2307-12.
- Gundes SG, Gulenc S, Bingol R. 2001.** Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeast. *J Med Microbiol*, 50:1105-10.
- Hagenimana V, Simard RE, Vezina LPh, inventors; Universite Laval; Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec, CA), assignee. 1996.** Method for the hydrolysis of starchy materials by sweetpotato endogenous amylases. US patent 5,525,154. Jun 11.
- Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kähkölä P, Anttila VJ, Malmberg H, Richardson M, Ylikoski J. 2000.** Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol*, 38(11):4186-92.
- Hernández M, García L, Rojo DM y Olivares D. 2003.** Almendro de la India: potencial biológico valioso. *Rev Cubana Invest Biomed*, 22(1).
- Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. 2003.** Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. *J Clin Microbiol*, 41(6):2629-32.
- Hossain MA, Miyazaki T, Mitsutake K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kawamura S, Otsubo T, Hirakata Y, Tashiro T, Kohno S. 1997.** Comparison between Wako-WB003 and Fungitec G test for detection of (1-3)-beta-D-glucan in systemic mycosis. *J Clin Lab Anal*, 11:73-7.

- Hou WC, Chen YC, Chen HJ, Liu YH, Yang LL, Lee MH. 2001.** Antioxidant activities of a 33 KDa root storage protein of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57). J Agric Food Chem, 49:2978-81.
- Hou WC, Huang DJ, Lin YH. 2002.** An aspartic type protease degrades trypsin inhibitors, the major root storage protein of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57). Bot Bull Acad Sin, 43:271-6.
- Huang DJ, Lin CD, Chen HJ, Lin YH. 2004.** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam Tainong 57) constituents. Bot Bull Acad Sin, 45:179-86.
- Ieven M, Wouters Z, Vercauteren E, Goossens H. 2007.** Evaluation of 4 chromogenic media for detection and identification of clinically relevant yeasts. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. ICC, Munich, Germany, 31 Mar-04 Apr. Acta Physiol Congr. Abstract No. 1733-661.
- Iijima K, Suzuki K, Asano S, Kuriyama H, Kitagawa Y. 2007.** Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the horA and horC gene clusters. J Inst Brew 113: 96-101.
- Ilkit M, Hilmioglu S, Tasbakan M, Aydemir S. 2007.** Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. J Med Microbiol, 56: 762-5.
- In-Chang J, Soo-Young P, Kee-Yeun K, Suk-Yoon K, Jang-Guk K, Sang-Soo K. 2004.** Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chryanthemi*. Plant Physiol Biochem, 42(5):451-5.
- ISO 16140. 2003.** Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods, ISO, Geneva.
- ISO 17994. 2004.** Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods, ISO, Geneva.
- ISO 6490/1. 1983.** International Standard. Animal feeding stuffs - Determination of magnesium content - Part 1: Atomic absorption spectrometric method.
- ISO 6490/2. 1983.** International Standard. Animal feeding stuffs – Determination of calcium content - Part 2: Atomic absorption spectrometric method.
- ISO/IEC 17025. 1999.** General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva (revised 2005).
- ISO/TR 13843. 2000.** Water quality - Guidance on validation of microbiological methods, ISO, Geneva.
- ISO/TS 11133-2. 2003.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media, ISO, Geneva.
- Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AAMA, Merz WG, Falkler WA, Meiller TF. 2001.** Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. J Clin Microbiol, 39(5):2015-6.



- Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishida A. 2001.** Elevation of blood (1-3)-beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron*, 89:15-9.
- Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. 2004.** Tobacco Agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 42(10):4796-8.
- Kiska DL, Gilligan PH. 2003.** *Pseudomonas*. En Murray PR (Ed) Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington DC: ASM Press; p. 719-28.
- Konemam EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. 1997.** Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>th</sup> ed., Lippincott, Philadelphia, New York, pp.183-188.
- Kumar S, Arora BS, Mathur MD. 2000.** Identification of yeasts from clinical specimens by oxidase test. *Indian J Pathol Microbiol*, 43(4):429-31.
- Lacaz C, Porto E, Costa JE. 1991.** Técnicas micológicas e imunológicas. Técnicas de coloracao em micopatologia. Meios de cultivo. Manutencao de culturas. Cultivo en lámina. Preparo de antigenos micóticos. Técnicas micológicas e imunológicas de uso corriente. Cap 36. En: Lacaz C. Micología Médica Savier. Sao Paulo. p. 557-75.
- Land SW, Eschenauer GA, Carver PL. 2009.** Evolving role of early antifungals in the adult intensive care unit. *Crit Care Med*, 37:1580-93.
- Larone DH. 2002.** Medically important fungi: a guide to identification. 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC: ASM Press; p.115.
- Larrondo RJ, González AR, Hernández LM. 2001.** Micosis superficiales. Candidiasis y pitiriasis versicolor. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 17(6):567-71.
- Laupland KB, Bagshaw SM, Gregson DB, Kirkpatrick AW, Ross T, Church DL. 2005.** Intensive care unit-acquired urinary tract infections in a regional critical care system. *Crit Care Med*, 9(2):60-5.
- Lazarde LJ, Pacheco A. 2001.** Identificación de especies de *Candida* en un grupo de pacientes con candidiasis atrófica crónica. *Act Odont Ven*, 39(1):13-8.
- Lees E, Barton RC. 2003.** The use of niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 46(1):13-7.
- Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP Carlet J, Reynes J, Rosenheimk M, Regnier B, Lortholary O, Amar Cand Study Group. 2009.** Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in clinical care: a multicenter, prospective observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*, 37:1612-8.
- Letscher-Bru V, Meyer MH, Galois AC, Waller J, Candolfi E. 2002.** Prospective evaluation of the new chromogenic medium Candida ID, in comparison with Candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. *J Clin Microbiol*, 40(4):1508-10.
- Leuschner RGK, Bew J, Bertin G. 2003.** Validation of an official control method for enumeration of authorised probiotic yeast in animal feed. *Systematic Appl Microbiol*, 26(1):147-53.
- Lightfoot NF, Maier EA. 1998.** Microbiological analysis of food and water. Guidelines for quality assurance. Eds. Elsevier, Amsterdam.

- Linares MJ, Charriel G, Solís F, Casal M. 2003.** CHROMagar Candida más fluconazol: comparación con técnicas de microdilución. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(10):493-7.
- Linares MJ, Solís F. 2001.** Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds) Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao, Rev Iberoam Micol, 11.1-11.18.
- Lipperheide V, Andrakas L, Pontón J, Quindós G. 1993.** Evaluation of the Albicans ID® plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. *Mycoses*, 36:417-20.
- Lipperheide V, Andrakas L, San Millán R, Pontón J, Quindós G. 1992.** Evaluación de 2 nuevos métodos de identificación rápida de levaduras de interés médico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 10(2):139-40.
- Li-Ung H, Chi-Hsiang C, Chu-Fang C, Jang-Jih L, Wei-Ming C, Wei-Hwa L. 2001.** A comparison of methods for yeast identification including CHROMagar Candida, Vitek System YBC and a traditional biochemical method. *Chin Med J*, 64:568-74.
- Lomelin JM, Vaqueiro, MC, inventors; Imit A.C. (México), assignee. 1991** Process for dehydrating tomatoes. US Patent 5,035,909. Jul 30.
- López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. 2005.** Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol*, 37:16-21.
- López J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich AC, Pacot A, Cuisenier B, Vagner O, Bonnin A. 2001.** Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. *J Clin Microbiol*, 39(3):1172-4.
- Lumbreras C, Lizasoain M, Aguado JM. 2003.** Antifúngicos de uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(7):366-80.
- Luo G, Mitchell TG. 2002.** Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 40(8):2860-5.
- Mackenzie DWR. 1962.** Serum germ tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*, 15:563-5.
- Maeshima M, Sasaki T and Asahi T. 1985.** Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry*, 24:1899-902.
- Manafi M, Willinger B. 1991.** Rapid identification of *Candida albicans* by Fluoroplate Candida Agar. *J Microbiol Meth*, 14:103-7.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. (Ed.). 2003.** Brock. Biología de los Microorganismos. 10<sup>ma</sup> ed. Pearson Prentice Hall. Capítulo 14 Biología de la célula eucariótica y microorganismos eucarióticos. p, 482. ISBN 84-205-3679-2.
- Martínez Machín G, Perurena Lancha M, Núñez Carvajal J, Fernández Andreu CM, Bandera Tirado F. 1997.** Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. *Rev Cubana Med Trop*, 49(3):174-80.

- McGinnis MR. 1980.** Laboratory Handbook of Medical Mycology. Nueva York: Academia Press, p. 357-9.
- Mendoza M. 2005.** Importancia de la identificación de levaduras. Rev Soc Ven Microbiol, 25(1):15-23.
- Merchant IA y Packer RA. 1975.** Bacteriología y Virología Veterinarias. 1ra Reimpresión. Zaragoza: Acribia, 45-87.
- Merck Microbiology Manual. 2006.** 12<sup>th</sup> ed. Darmstadt: Merck, pp. 688.
- Merlino J, Tambois E, Veal D. 1998.** Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. J Clin Microbiol, 32:1923-9.
- Mesa J, Rivas P, Cuervo S, Mejía M. 2006.** Diagnóstico histopatológico de micosis invasivas en el paciente inmunocomprometido del Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Rev Colomb Cancerol, 10(3):207-11.
- Mesa LM, Arcaya NM, Pineda MS, Beltrán-Luengo H, Calvo BM. 2005.** Candidemia en el Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela 2000-2002. Rev Soc Ven Microbiol, 25(2):109-13.
- Michel-Nguyen A, Darde ML, Penaud A, Bouteille B. 1997.** Evaluation of the colorimetric kit Fungifast I Twin for the identification of ten pathogenic yeasts. J Mycol Med, 7(2):81-6.
- Millan Rodríguez F, Bautista Palomas J, Olías Jiménez JM, inventors; Universidad de Seville, assignee. 2002.** Process for obtaining plant peptones with a high hydrolysis degree and applications thereof. WO patent 9,823,170. april 16.
- Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. 2005.** Flow Cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin. J Clin Microbiol, 43(6):2586-9.
- Momani OM. 2000.** Cost-effectiveness and efficacy of CHROMagar™ *Candida* medium in clinical specimens. East Medit Health J, 6(5/6):968-78.
- Montes de Oca Mejías E, Payan M, Pérez de Ávila M, Loyola Domínguez M. 2005.** Comportamiento clínico epidemiológico de la infección vaginal en gestantes de dos consultorios. Archivo Médico de Camagüey, 9(3):p.9. ISSN 1025-0255.
- Moore JE, Murphy A, Cherie Millar B, Loughrey A, Rooney PJ, Stuart Elborn J, Goldsmith CE. 2009.** Improved cultural selectivity of medically significant fungi by suppression of contaminating bacterial flora employing gallium (III) nitrate. J Microbiol Meth, 76(2):201-3.
- Morán López E, Ferreiro Marín A. 2001.** La candidiasis como manifestación bucal en el sida. Rev Cubana Estomatol, 38(1). ISSN 0034-7507.
- Morris Quevedo HJ, Almarales Arceo A, Romero Viamonte K y Vidal Colás M. 2002.** Validación de un método potenciométrico para la determinación de nitrógeno amínico en hidrolizados proteicos de microalgas. Rev Cubana Farm, 36(1):56-61.

- Mosca CO, Moragues MD, Llovo J, Al-Mosaid A, Coleman DC, Pontón J. 2003.** Casein Agar: a usefull medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol, 40:414-20.
- Murray MP, Zinchuk R, Larone DH. 2005.** CHROMagar Candida as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the Rapid-Assimilation-of-Trehalose Test. J Clin Microbiol, 43(3):1210-2.
- Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Walker JM, Elborn JS, Rendall J, Moore JE. 2008.** Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). J Cyst Fibros, 7(6):566-72.
- Nagano Y, Stuart Elborn J, Cherie Millar B, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, Moore JE. 2010.** Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. Med Mycol, 48(1):166-76.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003.** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev, 67(3):400-28.
- Nanmori T, Shinke R, inventors; Showa Denka KK (Tokio, JP); assignee. 1993.** Thermostable amylase. US patent 5,188,956. Feb 23.
- Navas PB, Carrasquero A, Mantilla J. 1999.** Avances en la caracterización química de la harina de batata (*Ipomoea batatas*) var. Carolina. Rev Fac Agron (LUZ), 16:11-8.
- Nelson SM, Cartwright CP. 2003.** Detection of fluconazole-resistant isolates of *Candida glabrata* by using an agar screen assay. J Clin Microbiol, 41(5):2141-3.
- Nguyen M, Favel A, Fallague K, Penaud A. 2004.** Évaluation du milieu Candichrom II: isolement des levures et identification présomptive de *Candida albicans*. J Mycol Med, 14(3):155.
- Nickerson WJ. 1953.** Reduction of inorganic substances by yeasts. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. J Infect Dis, 93:45-56.
- Nielsen PM, Eriksen S, Hansen OR, Kristensen SE, Hwass P, inventors; Novo Nordisk A/S, assignee. 1998.** Method for production of a vegetable protein hydrolysate with proteases. US patent 5,716,801. feb 10.
- Niimi K, Shepherd MG, Cannon RD. 2001.** Distinguishing *Candida* species by  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidase activity. J Clin Microbiol, 39(6):2089-97.
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. 1991.** Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol, 29:297-301.
- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. 2004.**  $\beta$ -d-Glucan as a diagnostic adjunct for IFI: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. J Clin Infect Dis, 39:199-205.
- Odds FC, Bernaerts R. 1994.** CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol, 32:1923-9.

- Oliveira GS, Ribeiro ET, Baroni FA. 2006.** An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 48(6):311-5.
- Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. 2009.** Enzymatic substrates in microbiology. Review. *J Microbiol Meth*, 79:139-55.
- Oxoid. 1995.** Manual. Unipath Limited, basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, England, p. 277-91.
- Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. 2010.** Performance of Chromogenic Candida Agar and CHROMagar Candida in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Med Mycol*, 48(1):29-34.
- Pagano J, Levin JD, Trejo W. 1958.** Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. *Antibiot Ann*, 137-43.
- Page BT, Kurtzman CP. 2005.** Rapid identification of *Candida* species and other clinically important yeast species by Flow Cytometry. *J Clin Microbiol*, 43(9):4507-14.
- Panchón J, Cisneros JM, Collado-Romacho AR, Lomas-Cabezas JM, Lozano de León-Naranjo F, Parra-Ruiz J, Rivero-Román A. 2006.** Tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24:254-63.
- Pardi G, Cardozo EI. 2002.** Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Act Odont Ven*, 40(1):9-17.
- Patterson TF, Revankar SG, Kirkpatrick WR, Did O, Fothergill AW, Redding SW, Sutton DA, Rinaldi MG. 1996.** A simple method for detecting fluconazole resistant yeasts with chromogenic agar. *J Clin Microbiol*, 34:1794-7.
- Paugam A, Benchetrit M, Fiacre A, Tourte-Schaefer, Dupoy-Camet J. 1999.** Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeast identification by colour-producing reactions. *Med Mycol*, 37(1):11-7.
- Peeler JT, Leslie JE, Danielson JW, Messer JW. 1982.** Replicate counting errors by analysts and bacterial colony counters. *J Food Prot*, 45:238-40.
- Peltroche-Llacsahuanga H, Schnitzler N, Lutticken R, Haase G. 1999.** Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dispstick to detect trehalase-generated glucose. *J Clin Microbiol*, 37:202-5.
- Pemán J, Aparisi N, García-Esteban C, Gobernado M. 2004.** Utilidad de una nueva técnica comercial, GLABRATA RTT, para la identificación rápida de *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol*, 21:82-4.
- Pemán J, Cantón E, Gobernado M. 2005.** Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolates from blood: results of a 2-years multicenter study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24:23-30.
- Peralta IE, Spooner DM. 2007.** History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). En: Razdan MK, Mattoo AK (Eds) Genetic improvement of *Solanaceous* crops, Vol. 2: Tomato. Science Publishers, Enfield, USA. pp 1-27.

- Pérez C, Goitía K, Mata S, Hartung C, Colella MT, Reyes H, Hernández C, Villanueva M, Ontiveros J, Magaldy S, Suárez R. 2002.** Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la ureasa como prueba en el diagnóstico de las levaduras. *Rev Soc Ven Microbiol*, 22(2): 136-40.
- Pérez-Blázquez E. 2006.** Fondo de ojo en paciente crítico no neutropénico: endoftalmitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol*, 23:16-9.
- Perry JL, Miller GR, Carr DL. 1990.** Rapid, colorimetric identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 28:614-5.
- Perurena Lancha M, Rodríguez Soto M, Fernández Andreu C, Martínez Machín G, Flores Caro M. 2003.** Determinación de morfotipos de *Candida* spp. en exudados vaginales. *Rev Cubana Med Trop*, 55(3):217-20.
- Pfaller MA, Arikan S, Lozano-Chiu M, Chen YS, Coffman S, Messer SA, Rennie R, Sand C, Heffner T, Rex JH, Wang J, Yamane N. 1998-a.** Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol*, 36:2609-12.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. 2003.** Evaluation of the E-test and disk-diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol*, 41:1875-80.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis R J, Messer SA. 2001-a.** SENTRY Participant Group: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol*, 39:3254-9.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Plavan H, Killian SB, Knapp CC. 1998-b.** Multisite reproducibility of MIC results by the Sensititre® Yeas One Colorimetric antifungal susceptibility panel. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 31:543-7.
- Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. 2000.** Evaluation of E-test method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates *Candida* species by using three different agar media. *J Clin Microbiol*, 38:3715-7.
- Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. 2001-b.** Evaluation of E-test method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 39:4387-9.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. 2005.** Evaluation of a (1-3)- $\beta$ -D-glucan assay for diagnostic of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*, 43(12):5957-62.
- Pinjon E, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Moran G, Coleman DC, Sullivan DJ. 2005.** Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased CdCDR1 and CdCDR2 expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(4):1312-8.
- Polachek I, Melamed M, Bercovier H, Salking IF. 1987.**  $\beta$ -Glucosidase in *Candida albicans* and its application in yeast identification. *J Clin Microbiol*, 25:907-10.

- Pontón J, García ME, López Medrano R. 2001.** Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds) Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao, Rev Iberoam Micol, 14.1-14.21.
- Pontón J, Moragues MD, Quindós G. 2002.** Non-culture based diagnostics. In: Calderone R (Ed.) *Candida* and Candidiasis. Washington DC: ASM Press; p.395-425.
- Posterano B, Romano L, Sanguinetti M, Masucci L, Morace G, Fadda G. 2000.** Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. *Diag Microbiol Infect Dis*, 38:29-36.
- Prieto Santa Anna LM, Illnait Zaragoza MT, Ramos Rodallegas EG, Lazcano Herrero B, Márquez Sánchez N, Cantelar de Francisco N, Manzur Katriba J, Martínez Machín G. 2006.** Candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA. Aspectos clínicos, micológicos y terapéuticos. *Rev Cubana Med Trop*, 58(3):173-80.
- Puerto JL, García-Martos P, Márquez A, García-Agudo L, Mira J. 2001.** Candidiasis orofaríngea. *Rev Diagn Biol*, 50(4):177-81.
- Qian Q, Sinkeldam I, Roberts GD. 1999.** Comparison of a colorimetric microdilution method and the NCCLS macrodilution method for antifungal susceptibility testing of yeasts. *J Mycol Med*, 9:181-4.
- Quesada Gómez C, Murillo Hidalgo L, Ureña Varela M, Vargas Mongle E. 2007.** *Candida dubliniensis*: (Caracterización, diagnóstico, importancia en pacientes inmunocomprometidos y diferenciación de *C. albicans*) (Revisión bibliográfica). *Rev Med Costa Rica Centroam*, LXIV(578):43-8.
- Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Martín-Mazuelos E, Negroni R. 2001.** Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. *Rev Iberoam Micol*, 18:23-8.
- Quindós G, Lipperheide V, Pontón J. 1993.** Evaluation of two commercialized systems for the rapid identification of medically important yeasts. *Mycoses*, 36:299-303.
- Quindós G, Salesa R, Carrillo-Muñoz AJ, Lipperheide V, Jaudenes L, San Millán R, Torres-Rodríguez JM, Pontón J. 1994.** Multicenter evaluation of ATB fungus: a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *Chemotherapy*, 40:245-51.
- Quindós G, San Millán R, Robert R, Bernard C, Pontón J. 1997.** Evaluation of Bichro-latex Albicans a new method for rapid identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 35:1263-5.
- Ramani R, Chaturvedi V. 2000.** Flow Cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(10):2752-8.
- Raut SH, Varaiya A. 2009.** Differentiation of *Candida dubliniensis* on CHROMagar and Pal's Agar. *Indian J Med Microbiol*, 27(1):55-8.

- Regulación No. 20. 2004.** Buenas Prácticas para la Producción de los Diagnosticadores. CECMED, pp. 44.
- Regulación No. 8. 2001.** Requisitos generales para el registro de los diagnosticadores. CECMED, pp. 22.
- Rezusta López A, Sánchez Sousa A, Gil Tomás J. 2001.** Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds) Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao, Rev Iberoam Micol, 3.1-3.17.
- Rimek D, Singh J, Kappe R. 2003.** Cross-reactivity of the PLATELIA CANDIDA antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts. J Clin Microbiol, 41(7):3395-8.
- Rippon JW. 1990.** Candidiasis y levaduras patógenas. En: Interamericana Mc Graw Hill (Ed). Tratado de Micología Médica, 3<sup>ra</sup> ed, p. 611-4.
- Rivera P, Hernández F, Santamaría S, Salas I, García J. 2003.** Diagnóstico diferencial de infecciones sistémicas por *Trichosporon beigelii*. Rev Costarric Cienc Med, 24(1):63-70.
- Robert V, Evrard P, Hennebert GL. 1997.** BCCM™/Allev 2.00 an automated system for the identification of yeasts. Mycotaxon, 64:455-63.
- Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdova S, Canteros CE, Saporiti A y participantes del grupo EMIFN. 2005.** Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. Rev Argent Microbiol, 37:189-95.
- Rodríguez C, Mayo O. 2009.** Paquete de hojas de cálculo SmartVal Versión 1.0/09, BioCen.
- Rodríguez C, Zhurbenko R. 2002.** PNO 15.005. Diseño y Desarrollo de Prototipos. Edición No. 02, BioCen, Cuba, pp. 43.
- Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñiz V, Lobaina Rodríguez T, Tsoraeva A, Díaz Pérez M, Durán Vila A, Varela Llanes AE. 2004.** Manual de Medios de Cultivo. 3<sup>ra</sup> ed. Habana (Cuba): ISBN 959-7160-25-0, BioCen. p.265.
- Ronald M. Atlas. 2005.** Handbook of Microbiological Media. Taylor & Francis Group, CRC Press 2<sup>th</sup> ed. p. 664. ISBN 0-8493-3560-4.
- Rouabhia M, Schaller M, Corbucci C, Vecchiarelli A, Prill SK, Giasson L, Ernst JF. 2005.** Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyl transferases. Infect Immun, 73(8):4571-80.
- Rouselle PA, Freydiere AM, Couillerot PJ, Montclos H, Gille Y. 1994.** Rapid identification of *Candida albicans* using Albicans ID and Fluoroplate agar plates. J Clin Microbiol, 32:3034-6.
- Ruiz-Aragón J, García-Martos P, Puerto JL, Marín P, Saldarreaga A, Moya P. 2003.** Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de levaduras. Rev Diagn Biol, 52(1):19-22.
- Runova VF, Bendas LG, Maksimova GA, Preobrazhenskaya EI, Raskin BM, Mielnikov VA. 1977.** Metodicheskie ukazania po primienieniyu fiziko-khimicheskikh metodov kontrolya pitatielnikh sried. Moscú, p.5-10.



- Sader HS, Miranda EA. 1999.** Limitações dos métodos automatizados em Microbiologia; São Paulo: Jornada de Iniciação Científica, 4, Botucatu, PEM - UNIFESP, Anais, p.14-6.
- Salas I, García J, Miranda K. 2000.** Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. Rev Costarric Cienc Med, 21(1):43-9.
- Salavert M, Jarque I, Pemán J. 2006.** Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapéuticas. Enferm Infecc Microbiol Clin, 24(1):36-45.
- Salazar González T, Morejón Carbonell D, Alonso Díaz T, Ayala Pérez JL, López Palomares M, Castillo López B. 2006.** Gérmenes nosocomiales más frecuentes en la unidad de terapia intensiva. Rev Cubana Int Emerg, 5(1):302-11.
- Schaller M, Kortling HC, Borelli C, Hamm G, Hube B. 2005.** *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an *in vitro* model of vaginal candidiasis. Infect Immun, 73(5):2758-65.
- Schmalreck AF, Kottmann I, Reiser A, Ruffer U, Scharr E, Vanca E. 1995.** An evaluation of seven methods of *in vitro* susceptibility testing of clinical yeast isolates against fluconazole. Mycoses, 38(1):55-63.
- Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. 2003.** Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. J Clin Microbiol, 41(12):5660-4.
- Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, Klingspor L, Grandjean M, Bonnin A, Poulain D. 2003.** Contribution of the Platelia *Candida*-Specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. J Clin Microbiol, 41(10):4551-8.
- Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. 1999.** New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol, 37:1510-7.
- SIGMA. 2000.** Biochemicals and Reagents for Life Science Research, pp. 1534.
- Silva Beldares Y, Oranday Cárdenas A, Verde Star J, Cruz Vega DE, Rivas Morales C y Carranza Rosales P. 2003.** Fracciones con actividad antimicrobiana de los extractos de *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. Rev Salud Púb Nutric, Edición Especial No. 2.
- Silva JO, Franceschini SA, Labrador MA, Cândido RC. 2004.** Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. Mycopathologia, 157(1):29-36.
- Siré Gómez A, Albornoz López del Castillo C, Fuentes LE, Queipo Caballero G. 1998.** Consecuencias de la radioterapia en las afecciones de cabeza y cuello. Archivo Médico de Camagüey, 2(1). ISSN 1025-0255.
- Smitka CM, Jackson SJ. 1989.** Rapid fluorogenic assay of differentiation of *Candida parapsilosis* group from *Candida* spp. J Clin Microbiol, 27:203-6.

- Soni LM, Burattini MN, Pignatari AC, Gompertz OF, Colombo AL. 1999.** Comparative study of agar diffusion test and the NCCLS macrobroth method for *in vitro* susceptibility testing of *Candida* spp. *Mycopathologia*, 145:131-5.
- Sood P, Mishra B, Dogra V, Mandal A. 2000.** Comparison of Vitek Yeast Biochemical Card with conventional methods for speciation of *Candida*. *Indian J Path Microbiol*, 43:143-5.
- Staib P, Morschhauser J. 1999.** Chlamidospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*, 42:521-4.
- St-Germain G, Beauchesne D. 1991.** Evaluation of the MicroScan rapid yeast identification panel. *J Clin Microbiol*, 29:2296-9.
- Stockman L, Roberts G. 1985.** Rapid screening method for the identification of *C. glabrata*. In Abstracts of the 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1985, Washinton, DC: ASM Press, Abstr. F-80, p.377.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennet DE, Coleman DC. 1995.** *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterisation of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 141:1507-21.
- Swinne D, Raes-Wuytack C, Van Looveren K, Desmet P. 1999.** Comparative evaluation of Fungitest®, Neo-Sensitabs® and M27T-NCCLS broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*, 42:231-7.
- Tan GL, Peterson EM. 2005.** CHROMagar Candida medium for direct susceptibility testing of yeast from blood cultures. *J Clin Microbiol*, 43(4):1727-31.
- Tecator. 1987.** Determination of Kjeldahl nitrogen content with Kjeltex System 1026. Application Note. Sweden.
- Tekeli A, Arikan O, Koyuncu E, Dolapci I, Uysal S. 2006.** Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001 and 2004. *Mycoses*, 49(1):60-4.
- Téllez-Castillo CJ, Gil-Fortuño M, Centelles-Sales I, Sabater-Vidal S, Pardo-Serrano F. 2008.** Infección fatal por *Trichosporon asahii* en una recién nacida pretérmino. *Rev Chil Infect*, 25(3):213-5.
- Torres K, Soto A, Sandrea D, Villalobos M, Rodríguez A. 2005.** Candidiasis vaginal en primigestas. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 65(2):55-8.
- Trépanier H, Jean V, Boily MJ, Clairoux N, Boissinot M, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 2001.** One-hour detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in blood samples using the Smart Cycler®. Congress 101<sup>st</sup> General Meeting, ASM.
- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. 2008.** *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(4):606-25.
- Umabala P, Satheeshkumar T, Lakshmi V. 2002.** Evaluation of Fungichrom 1: A new yeast identification system. *Indian J Med Microbiol*, 20:160-2.

- United States Pharmacopoeial Convention and National Formulary. USP XXXI. 2008.** The United States Pharmacopoeia. 31 ed. Rockville Md: Mck Printing, pp. 1438-2046.
- Valencia M, Torres A. 2004.** Distribución global y evolución de diferentes especies de *Candida* causando candidiasis invasiva. En: <http://www.antibioticoterapia.com/modules.phpname=News&file=article&sid=399&num=2004-03-01>. Acceso: Marzo 2009.
- Villanal Cajoto I, Rodríguez Otero L, García-Zabarte Casal MA, Villacián Vicedo MJ. 2010.** Fungemia por *Candida rugosa*: Un nuevo caso de infección emergente. Rev Chil Infect, 27(1):87-8.
- Viudes A, Pemán J, Cantón E, Salavert M, Úbeda P, López-Ribot JL, Gobernado M. 2002.** Two cases of fungemia due to *C. lusitaniae* and a literatura review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 21:294-9.
- Waller J, Koenig H, Debruyne M, Contant G. 1993.** Evaluation d'un nouveau milieu d'isolement des levures et de diagnostique rapide de *Candida albicans*. Rev Fr Lab, 252:89-92.
- Walter WM, CollinsWW, Purcell AE. 1984.** Sweet Potato Protein: a review. J Agric Food Chem, 32(4):695-9.
- Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. 1995.** Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standard broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother, 39:2520-2.
- Wansley DL, Baneerjee S, McGeady P. 2003.** Separation of the filamentous and celular yeast forms of *C. albicans* following serum induction. J Microbiol Meth, 55:321-3.
- White PL, Archer AE, Barnes RA. 2005.** Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. J Clin Microbiol, 43(5):2181-7.
- Willinger B, Apfalter P, Hirschl AM, Makristathis A, Rotter M, Seibold M. 2000.** Susceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution methods with Fungitest®. Diagn Microbiol Infect Dis, 38:11-5.
- Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. 2001.** Performance of Candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar Candida. J Clin Microbiol, 39(10):3793-5.
- Willinger B, Manafi M, Rotter ML. 1994.** Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting *Candida albicans*. Lett Appl Microbiol, 18:47-9.
- Willinger B, Wein S, Hirschl AM, Rotter ML, Manafi M. 2005.** Comparison of a new commercial test, GLABRATA RTT, with a Dipstick Test for rapid identification of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol, 43(1):499-501.

- Witthuhn F, Toubas D, Beguinot I, Aubert D, Rouger C, Remy G, Pinon JM. 1999.** Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infect patients: study of azole drug susceptibility. *J Clin Microbiol*, 37:864-6.
- Wong B, Brauer KL. 1988.** Enantioselective measurement of fungal D-Arabinitol in the sera of normal adults and patients with candidiasis. *J Clin Microbiol*, 26(9):1670-4.
- Wong SF, Tan BC, Rohani bt Abdul Hadi S, Peng Ng K, Chong PP. 2006.** Rapid diagnosis of *Candida albicans* vaginitis directly from high vaginal swabs. *Int J Mol Med Adv Sci*, 2(3):239-44.
- Yucesoy M, Esen N, Yulug N. 2001.** Use of Chromogenic tube and Methyl Blue Sabouraud Agar for the identification of *Candida albicans* strains. *Kobe J Med Sci*, 47:161-7.
- Zhurbenko R, Rodríguez C, Díaz M, Duran A, López OD, Viera DR. 2006.** Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *Rev Cubana Med Trop*, 58(2): pp. 0-0. ISSN 0375-0760.
- Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. 2008.** Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 1 – Procesos tecnológicos. *Salud(i)Ciencia*, 16(4):420-5.
- Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. 2009.** Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 2 – Principales indicadores de calidad. *Salud(i)Ciencia*, 16(6):645-51.
- Zhurbenko R. 2005.** Metodología para el aprovechamiento de los subproductos de la industria alimenticia y otras proteínas en la evaluación de la calidad sanitaria de los alimentos (Tesis doctoral). La Habana: Universidad de La Habana, pp. 125.

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS****Patentes relacionadas con el tema:**

1. Zhurbenko R, López O, Rodríguez C, **Lobaina T**, Viera D. Método de obtención de mezcla nutritiva a partir del tomate para el cultivo de microorganismos y producto obtenido. Patente Cubana No. 23308. OCPI. Julio 1, 2008.
2. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, García Marichal JM, Zayas Ruiz Y. Medio nutritivo para el cultivo de levaduras. Patente Cubana No. 23499. OCPI. Febrero 4, 2010.
3. Rodríguez Martínez C, **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R, García Marichal JM. Base nutritiva a partir de raíz reservante de *Ipomoea batatas* y método para su obtención. Patente Cubana No. 23507. OCPI. Febrero 26, 2010.
4. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Composición para el aislamiento e identificación de especies fúngicas. Patente Cubana No. 23509. OCPI. Marzo 1, 2010.
5. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, García Marichal JM, Zayas Ruiz Y. Nutrient medium for yeast culture. 2006. Solicitud de patente: World Intellectual Property Organization WO/2007/071204. (Informe del examen de búsqueda preliminar recibido y contestado en Enero 2010).

**Publicaciones relacionadas con el tema:**

1. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. 2007. Characterization of *Ipomoeas batatas* extract to be used as nutrient basis for culture media. Rev Cubana Med Trop, 59(3). ISSN 0375-0760.
2. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, **Lobaina Rodríguez T**, Quesada Muñiz VJ, Díaz Blanco E, y López Hernández OD. 2008. Influencia de los parámetros de secado sobre los indicadores físico-químicos y biológicos de un hidrolizado de proteínas. Rev Cubana Farm, 42(1). ISSN 0034-7515.
3. **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Rodríguez Rodríguez A, Zayas Ruiz Y. 2010. Identificación de especies de *Candida* utilizando un nuevo método de auxonograma del carbón. Rev Cubana Med Trop, 62(1):66-81. ISSN 0375-0760.

**Otras publicaciones del autor:**

1. **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R, Rodríguez C, Quesada Muñiz VJ, Ribeiro da Silva R, Wolf B. 2005. Determinación de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria por métodos cromogénicos y fluorogénicos. *en: Métodos Analíticos y de Detección. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria*. Editado por: Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México.
2. Parra Ortega, B, **Lobaina Rodríguez, T**, Villa Tanaca ML. 2006. Resultados de la evaluación del CromoCen CDA para el diagnóstico microbiológico con diferentes especies de levaduras. Informe técnico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.; p. 28.
3. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, García Marichal JM. 2006. Aplicación de un extracto nutritivo de origen vegetal para el cultivo de microorganismos de interés biotecnológico. *en: Memorias del IV Congreso Internacional, XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*. Editado por: Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos A. C. Morelia-Michoacan, México, D.F.; p. 1456-62
4. Rodríguez Martínez C, **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R, García Marichal JM. 2006. Nueva Base Nutritiva a partir de raíz reservante de *Ipomoea batatas*. *en: Memorias del IV Congreso Internacional, XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*. Editado por: Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos A. C. Morelia-Michoacan, México, D.F.; p. 1435-44.
5. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, García Marichal JM, Zayas Ruiz Y. Nutrient medium for yeast culture. 2006. World Intellectual Property Organization Publication number: EP1970450 (A1).
6. **Lobaina T**, Zhurbenko R, Rodríguez C, Zayas Y. 2007. Identification of *Candida* species using a new auxanographic procedure. Biotechnology Havana 2007. Biomanufacturing from technological development to large-scale production. *Elfos scientiae; Proceedings*, GP-60; p. 154-6. ISSN-1027-2860.
7. **Lobaina T**, Rodríguez C, Zhurbenko R, Kosky R. 1998. Formulación básica para el cultivo de vitroplantas. Libro "Producción de cultivos en condiciones tropicales". ISBN 959-7111-04-7. Instituto de Investigaciones Hortícolas. MINAGRI p. 214-7.

8. **Lobaina T**, Rodríguez C, Zhurbenko R, Kosky R. 1998. Desarrollo y obtención de medios de cultivo deshidratados para el cultivo de plantas. Libro "Producción de cultivos en condiciones tropicales". ISBN 959-7111-04-7. Instituto de Investigaciones Hortícolas. MINAGRI pp. 217-20.
9. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñiz V, **Lobaina Rodríguez T**, Tsoraeva A, Díaz Pérez M, Durán Vila A, Varela Llanes AE. 2004. Manual de Medios de Cultivo. Tercera Edición. ISBN 959-7160-25-0, BioCen, Habana, Cuba, p. 265.
10. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñiz VJ, Tsoraeva A, Ribeiro da Silva R, **Lobaina T**, Wolf B. 2005. Identificación de patógenos en alimentos por el método simultáneo con el empleo de sustratos cromogénicos. Métodos Analíticos y de Detección. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. UANL (Universidad Autónoma de Nuevo León).
11. Zhurbenko R, Quesada Muñiz VJ, Rodríguez Martínez C, **Lobaina Rodríguez T**, Tsoraeva A, Ribeiro da Silva R, Wolf B. 2005. Detección de *Salmonella* en alimentos con el empleo de un nuevo medio cromogénico. Métodos Analíticos y de Detección. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. UANL (Universidad Autónoma de Nuevo León).
12. Zhurbenko R, Quesada Muñiz VJ, Rodríguez Martínez C, **Lobaina Rodríguez T**, Tsoraeva A, Ribeiro da Silva R, Wolf B. 2006. Detección de *Salmonella* en alimentos con el empleo de un nuevo medio cromogénico. Alfa Editores Técnicos <http://www.alfaeditores.com>. en: Memorias del IV Congreso Internacional, XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Editado por: Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos A. C. Morelia-Michoacan, México, D.F.; p. 1445-55.

**Eventos de carácter nacional:****1. XXIII Conferencia Científica del CIMEQ. XVIII Jornada de Enfermería y Tecnólogos de la Salud. 2006.**

- Medio cromogénico para la identificación de especies de *Candida* con mayor incidencia en la clínica. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Zayas Y.

## 2. XVI Forum de Ciencia y Técnica. Segunda etapa. 2006.

- Desarrollo de un medio de cultivo para la recuperación de hongos. Torres Y, Zhurbenko R, **Lobaina T**, Zayas Y. Categoría Destacado Nivel de Base.
- Nuevo extracto nutritivo a partir de *Ipomoea batatas* para el cultivo *in vitro*. **Lobaina T**, Rodríguez C, Zhurbenko R, Zayas Y. Categoría Destacado Nivel Provincial.

## 3. XVI Forum de Ciencia y Técnica. Primera etapa. 2007.

- Procedimiento rápido, sencillo y económico para la prueba de asimilación de carbohidratos en la identificación de levaduras. **Lobaina Rodríguez T**, Zayas Ruiz Y, Zhurbenko R, Cabrera González AL. Categoría Destacado Nivel Provincial.
- Medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos de nueva generación para el diagnóstico de patógenos Gram-negativos. Rodríguez C, Quesada VJ, Tsoraeva A, Zhurbenko R, **Lobaina T**, Díaz M, Durán A, Zayas Y. Categoría Mención Nivel Nacional.

## 4. Primera Jornada Científica de BioCen. 17-18 de enero del 2007.

- Diagnosticador rápido, de la línea CromoCen, para diferenciar especies de levaduras en micología. **Lobaina T**, Rodríguez C, Zhurbenko R, Zayas Y.

## 5. TECMED 2008. 1-3 de diciembre del 2008.

- Evaluación de diferentes sustratos para la prueba del tubo germinativo en la identificación de especies de *Candida*. Cabrera González AL, Zayas Ruiz Y, **Lobaina Rodríguez T**. Categoría Mención.
- Estudio de la funcionalidad de diferentes medios de cultivo para la producción de clamidosporas en *Candida albicans*. Zayas Ruiz Y, **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R.

## 6. XVI Forum de Ciencia y Técnica. Segunda etapa 2008

- Implantación de la técnica DALMAU para la identificación microscópica de especies de *Candida*. Zayas Ruiz Y, **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R. Mención Nivel de Base
- Implantación de la técnica de tubo germinativo para la identificación preliminar de *Candida albicans* en el Laboratorio de Investigaciones Biológicas. Cabrera AL, **Lobaina T**, Zayas Y. Mención Nivel de Base.



### 7. XVI Forum de Ciencia y Técnica. Tercera etapa. 2009.

- Impacto de la extensión del período de validez de las bases nutritivas de producción nacional en BioCen y en otras producciones del país. Zhurbenko R, Abreut Y, Zayas Y, Govín Y, Rodríguez C, **Lobaina T**, Viera DR. Categoría Relevante Nivel Municipal.
- Escalado industrial del suplemento glicerol, aditivo indispensable para la funcionalidad biológica de varios medios de cultivo BioCen. **Lobaina T**, Zhurbenko R, Rodríguez C, Varela A, Zayas Y, Abreut Y, Osorio S, González M, Ortega M. Categoría Relevante Nivel Municipal.

### **Eventos de carácter internacional:**

#### 1. IV Congreso Internacional y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. DF, México. 2006.

- Aplicación de un extracto nutritivo de origen vegetal para el cultivo de microorganismos de interés biotecnológico. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, García Marichal JM.
- Nueva base nutritiva a partir de raíz reservante de *Ipomoea batatas*. Rodríguez Martínez C, **Lobaina Rodríguez T**, Zhurbenko R, García Marichal JM.

#### 2. Biotecnología Habana 2007.

- Identification of *Candida* species using a new auxonographic procedure. **Lobaina T**, Zhurbenko R, Rodríguez C, Zayas Y.

#### 3. II Congreso de Microbiología Clínica. Valencia. España. Julio 9-11, 2008.

- Evaluación de un nuevo medio cromogénico para la identificación de especies de *Candida* de interés clínico. **Lobaina Rodríguez T**, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Muñoz JL.

#### 4. Congreso de Cuba Farmacia 2008.

- Utilización de un nuevo método auxonográfico para la identificación de especies de *Candida* de mayor incidencia en la clínica. **Lobaina T**, Zhurbenko R, Zayas Y, Rodríguez C.

#### 5. V Taller de Procesamiento Aséptico. Proceasep 2009. La Habana, Cuba, 15-18 junio 2009.

- Método rápido para la identificación de levaduras contaminantes en los procesos biofarmacéuticos. **Lobaina T**, Zayas Y, Rodríguez C, Zhurbenko R.

6. Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba, 1-4 junio 2009.

- Evaluación de la utilidad del medio CromoCen CND-C para el aislamiento y diferenciación de especies de *Candida* presentes en infecciones fúngicas. **Lobaina T**, Rodríguez C, Zhurbenko R, Zayas Y, Cabrera AL, Fernández C, Muñoz JL, Halley MC, Fernández E, Paneque I.

7. Biotecnología Habana 2009. Aplicaciones Médicas de la Biotecnología. La Habana, Cuba, 2-5 noviembre 2009.

- Identificación de las especies de *Candida* con los medios cromogénicos-fluorogénicos CromoCen<sup>®</sup> CND-C y CromoCen<sup>®</sup> CND-F. **Lobaina T**, Rodríguez C, Zhurbenko R, Zayas Y, Viera DR, Cabrera AL, Muñoz JL.

#### **Tesis universitarias tuteladas relacionadas con el tema:**

1. Evaluación de un método cromogénico para la identificación de las especies de *Candida* de mayor frecuencia en la clínica. 2010. Trabajo de Diploma Autor: Ivonne Alfonso Valdés. Tutor: **Tamara Lobaina Rodríguez**. Facultad de Biología, UH, Ciudad de la Habana.

#### **Proyectos de Investigación-Desarrollo**

1. Desarrollo de medios de Cultivo para la micropropagación “*in vitro*” de plantas de interés. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente. 1996. Centro Nacional de Biopreparados e Instituto de Biotecnología de las plantas- Jefa de Proyecto: Ing. **Tamara Lobaina Rodríguez**.
2. Desarrollo de nuevos productos para microbiología. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente. 1998. Centro Nacional de Biopreparados. Integrante.
3. Desarrollo de los sistemas de identificación rápida de microorganismos. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente. 1999. Centro Nacional de Biopreparados. Integrante.

**Anexos**

---

## Anexo A. Principales constituyentes y propiedades físico-químicas de las materias primas seleccionadas para la obtención de extractos nutritivos

Acápites: 2.1.1 y 2.1.2

**Tabla A.1.** Análisis químico de los cultivos seleccionados en calidad de materia prima vegetal

Indicador	Cantidad (g/100 g)	
	batata	tomate
Agua	70,4 ± 2,69	94,07 ± 0,93
Cenizas	0,85 ± 0,21	0,29
Lípidos	0,30 ± 0,14	0,21
Hidratos de carbono	28,3 ± 3,82	3,75 ± 0,25
Proteínas	1,35 ± 0,49	0,94 ± 0,06
Referencia	Navas <i>et al.</i> , 1999; Hou <i>et al.</i> , 2001; 2002	Gebhardt y Thomas, 2002; Peralta y Spooner, 2007

**Tabla A.2** Propiedades físico-químicas de ALSAK 403 (alfa-amilasa)

Propiedad	Requisito
Forma de presentación	líquida
Color	café de claro a oscuro
Olor	libre de olores desagradables
Solubilidad	miscible en agua
Actividad	340 000 MWU/mL
Referencia	Especificación del fabricante Alsak, S.A. de C.V., México

MWU: unidad modificada de Wolhgemuth, representa la cantidad de enzima que dextriniza 1 mg de almidón soluble hasta una dextrina de tamaño definido en 30 min

## Anexo B. Referencias y operaciones fundamentales para la evaluación económica de los productos desarrollados por BioCen

Acápites: 2.7.3 y 3.6.3

**Tabla B.1.** Precio de venta de los productos de BioCen

Nombre del producto	Presentación	Precio de venta (CUC)
Agar dextrosa de Sabouraud	frasco x 500 g	32,00
Base de medio CromoCen CND-C	frasco x 500 g	152,00
Base de medio CromoCen CND-F	frasco x 500 g	189,00
Suplemento Glicerol	bulbo x 5 mL	1,50

Fuente: Ficha de costo-plan. Departamento de Costos y Precios. Dirección Economía, acceso: enero 2010, CUC: peso cubano convertible

**Tabla B.2.** Precios de reactivos y materiales adquiridos por BioCen

Reactivo	Firma	Presentación	Precio (CUC)
Suero estéril de conejo	CENPALAB, Cuba	Frasco x 100 mL	1,57
Agar harina de maíz	BBL, EEUU	Frasco x 500 g	231,14
Tween 80	Merck, Alemania	Frasco x 1000 mL	66,95
2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio	Merck	Frasco x 10 g	43,87
Actidiona	Merck	Frasco x 25 g	382,20

Fuente: Ofertas comerciales recibidas de los diferentes proveedores (año 2005-2006)

**Tabla B.3.** Precio de una placa de medios cromogénicos importados para *Candida*

Medio de cultivo	Firma	Precio (CUC/placa)
CHROMagar Candida	CHROMagar Society	2,03
Candida ID	bioMérieux	2,27
Chromoalbicans agar	Biolife	2,36
Fluoroplate Candida	Merck	1,32

Fuente: Ofertas comerciales recibidas de los diferentes proveedores (años 2004-2005)

**Tabla B.4.** Precio de una placa con medio de cultivo listo para el uso

Producto	Precio del frasco de 500 g (CUC)	Dosis (g/L)	Cantidad de:		Precio de la placa (CUC)
			litros*	placas	
Agar dextrosa de Sabouraud	32,00	60,0	8,33	417	0,08
CromoCen CND-C <sup>a</sup>	152,00	47,2	10,60	530	0,35
CromoCen CND-F <sup>a</sup>	189,00	47,1	10,60	530	0,42

(\*)-1 L de medio representa 50 placas de 20 mL, (<sup>a</sup>)- tiene incorporado el suplemento glicerol

**Tabla B.5.** Cálculo del gasto de la fuerza de trabajo que requiere cada metodología

Mano de obra	Salario (CUP/h)	Cantidad (h-h)	
		método de referencia	método alternativo
Técnico A de Laboratorio	2,76	12 h y 15 min.	3 h y 45 min.
<b>Importe (CUP)</b>		<b>33,53</b>	<b>9,52</b>

CUP: moneda nacional (peso cubano), h-h: horas hombre,

**Tabla B.6.** Estimado del gasto de energía por concepto de esterilización para cada metodología

Equipo	Energía eléctrica (kW-h)	Tiempo de funcionamiento	
		método de referencia	método alternativo
Autoclave	3,375	3 h y 30 min.	1 h
Consumo (kW)		11,137	3,375
<b>Importe=Consumo x 0,09 (CUP)</b>		<b>1,00</b>	<b>0,30</b>

**Anexo C. Compendio de las principales expresiones matemáticas para el cálculo de los parámetros seleccionados para la validación de los nuevos métodos microbiológicos**

---

Acápite: 2.8

### Acápites 2.6.1.2 Límite de detección

$LS = e^{(\text{Lím sup})}$	LS: límite superior $\text{Lím sup} = \log_{(50\%)} + 2,303 \times S \times t_{\text{teórica}}$ e: exponencial (e=2,7183)	$LI = e^{(\text{Lím inf})}$	LI: límite inferior $\text{Lím inf} = \log_{(50\%)} - 2,303 \times S \times t_{\text{teórica}}$
		$t_{\text{teórica}}$ : t de student, determinada con nivel de confianza y grados de libertad (gL) $\log_{(50\%)} = 2,303 \times \log M$	$\log M$ : logaritmo de la mediana $\log M = \Sigma x_T \times \Sigma Dp$
		Considerando todos los niveles	$\Sigma x_T$ : suma de todas las $x_T$ $\Sigma Dp$ : suma de todas las $Dp$
		Para cada nivel	$x_i = \lg_{10}(\text{UFC}/\text{nivel}_1)$ $x_{(i+1)} = \lg_{10}(\text{UFC}/\text{nivel}_2)$ $x_T = (x_i + x_{(i+1)})/2$ $p_i = np(\text{nivel}_1)/n$ $np$ : número de positivos $p_{(i+1)} = np(\text{nivel}_2)/n$ $n$ : número de placas $Dp = p_{(i+1)} - p_i$
	S: desviación estándar		$S = \sqrt{V}$
	Considerando todos los niveles		V: varianza $V = \Sigma(V_1 \times V_2)$
	Para cada nivel		$V_1 = p_i \times (1 - p_i)/n - 1$ $V_2 = (Dx/2)^2$ $Dx = X_i(\text{nivel}_2) - X_i(\text{nivel}_1)$

### Acápites 2.6.1.2 Prueba de hipótesis para determinar la igualdad de los niveles de detección

$P = PF_1/PF_2$	P: probabilidad $PF_1$ : producto de los factoriales constantes $PF_2$ : producto de los factoriales de la suma de positivos y negativos por ambos métodos
$PF_1 = F_{TP} \times F_{TN} \times F_{TR} \times F_{TA}$	$F_{TP}$ : factorial del total de los positivos $F_{TN}$ : factorial del total de los negativos $F_{TR}$ : factorial del total del método de referencia $F_{TA}$ : factorial del total del método alternativo
$PF_2 = F_{SPR} \times F_{SPA} \times F_{SNR} \times F_{SNA} \times F_{TT}$	$F_{SPR}$ : factorial de la suma de los positivos por el método de referencia $F_{SPA}$ : factorial de la suma de los positivos por el método alternativo $F_{SNR}$ : factorial de la suma de los negativos por el método de referencia $F_{SNA}$ : factorial de la suma de los negativos por el método alternativo $F_{TT}$ : factorial de todos los valores positivos y negativos por ambos métodos



#### Acápite 2.6.1.3 Nivel crítico y el límite de cuantificación

$$LC_R = 1,645 \times S_0$$

LC<sub>R</sub>: nivel crítico del método de referencia

$$LOQ_R = 10 \times S_0$$

LOQ<sub>R</sub>: límite de cuantificación del MR

S<sub>0</sub>: desviación estándar

V<sub>0</sub>: varianza de los recuentos

$$LC_A = 1,645 \times S_0 + X_0$$

LC<sub>A</sub>: nivel crítico del método alternativo

$$LOQ_A = 10 \times S_0 + X_0$$

LOQ<sub>A</sub>: límite de cuantificación del MA

$$S_0 = \sqrt{V_0}$$

$$V_0 = SDC / (n-1)$$

SDC: suma de las diferencias de cuadrados (DC)

$$DC = (X_i - X_m)^2$$

X<sub>i</sub>: recuento de UFC por placa

X<sub>m</sub>: media de los recuentos

X<sub>0</sub>: mediana de los 10 valores del nivel mínimo, capaz de cuantificar el crecimiento microbiano

#### Acápite 2.6.1.4 Límite de determinación

$$LD = 1 / (RSD^2 - u^2)$$

LD: límite de determinación

RSD: desviación estándar relativa del LOQ

u: factor de sobredispersión

$$RSD = \sqrt{1 / LOQ}$$

$$u = \sqrt{S_0^2 - (X_m / X_m^2)}$$

#### Acápite 2.6.1.5 Robustez de los métodos a diferentes temperaturas de incubación

$$t_{(T_1, T_2)} = (|PM_{T_1} - PM_{T_2}| - D_1) / \sqrt{\{V_{A(T_1, T_2)} \times [(1/PM_{T_1}) + (1/PM_{T_2})]\}}$$

PM<sub>T</sub>: valor medio de la media de los recuentos de cada temperatura

$$D = 0,03 \times PM_T$$

V<sub>A</sub>: promedio de la varianza agrupada para el conjunto de valores del par de temperaturas

#### Acápite 2.6.1.6 Robustez de los métodos a diferentes períodos de incubación

$$CV = (V / X_m) \times 100$$

CV: coeficiente de variación

V: varianza de los recuentos en cada intervalo

$$V = [(X_{H1} - X_m)^2 + (X_{H2} - X_m)^2] / 2$$

X<sub>H</sub>: recuento para cada intervalo de tiempo

#### Acápites 2.6.1.7 Robustez de los métodos utilizando diferentes volúmenes de inoculación (Proporcionalidad)

$$G_{n-1}^2 = 2 \times \{ \sum R - [\sum T_X \times \ln(\sum T_X / \sum V_R)] \}$$

$G_{n-1}^2$ : índice de proporcionalidad

R: variable de proporcionalidad

$$R = T_X \times \ln(T_R)$$

$$T_R = T_X / V_R$$

$T_X$ : suma del recuento de las réplicas

$T_R$ : recuento relativo respecto al volumen

$V_R$ : volumen relativo

#### Acápites 2.6.1.8; 2.6.1.9; 2.6.2.2 y 2.6.2.3 Indicadores del desempeño

$$SR = [AP / (AP + DN)] \times 100$$

SR: sensibilidad relativa

AP: acuerdos positivos

DN: desviaciones negativas

$$EsR = [AN / (AN + DP)] \times 100$$

EsR: especificidad relativa

AN: acuerdos negativos

DP: desviaciones positivas

$$ExR = [(AP + AN) / (AP + AN + DP + DN)] \times 100$$

ExR: exactitud relativa

$$E = ExR$$

E: eficiencia

$$F = \text{Log}[(AP + DP) / (AP + AN + DP + DN)]$$

F: selectividad

#### Acápites 2.6.1.10 y 2.6.2.4 Recuperación relativa del método alternativo

$$RR = (Y_m / X_m) \times 100$$

RR: recuperación relativa

$Y_m$ : media de los recuentos utilizando el método alternativo

$X_m$ : media de los recuentos utilizando el método de referencia

### Acápites 2.6.1.11; 2.6.2.5 y 2.6.2.6 Estudio de la equivalencia entre los métodos

$LI = X_{MP} - U$	LI: límite inferior		$LS = X_{MP} + U$	LS: límite superior
	$X_{MP}$ : valor medio de $X_{ip}$	$X_{ip} = [\ln(X_{PR}) - \ln(X_{PA})] \times 100$		
		$X_{ip}$ : porcentaje de la diferencia relativa del logaritmo de los recuentos promedios		
		$X_p$ : recuento promedio de las réplicas de la muestra para cada método		
	U: incertidumbre expandida	$U = 2 \times S_{x_m}$		
		$S_{x_m}$ : desviación estándar de $S_0$		$S_0 = \sqrt{V_0}$
		$V_0$ : varianza de los recuentos		$V_0 = SDC / (n-1)$
		SDC: suma de las diferencias de cuadrados (DC)		$DC = (X_{ip} - X_{MP})^2$

### Acápites 2.6.1.12 y 2.6.1.13 Repetibilidad individual (intra-laboratorio) y repetibilidad del ensayo (inter-laboratorios)

$RSD_I = \sqrt{RSD^2}$	$RSD_I$ : desviación estándar individual	$RSD_L = \sqrt{RSD^2}$	$RSD_L$ : desviación estándar entre los laboratorios
	RSD: desviación estándar relativa	$RSD = S_r / X_m$	
		$S_r$ : desviación estándar de la repetibilidad	$S_r = \sqrt{SDC}$
		SDC: suma de la diferencia de cuadrados	$SDC = (X_1 - X_m)^2 + (X_2 - X_m)^2$
			$X_1$ : primer recuento
			$X_2$ : segundo recuento
			$X_m$ : media de los recuentos

### Acápites 2.6.1.12 Análisis de varianza

Análisis dentro de las placas

$V_{SD} = \sum SDC / n$	$V_{SD}$ : varianza dentro de las placas	
	$SDC = (\ln X_1 - X_{ln})^2 + (\ln X_2 - X_{ln})^2$	SDC: suma de la diferencia de cuadrados de los logaritmos de los recuentos
		$\ln X$ : logaritmo del primer y del segundo recuento
		$X_{ln}$ : media puntual de los logaritmos de los recuentos

Análisis entre las placas

$V_{SE} = \sum SE / n - 1$	$V_{SE}$ : varianza entre placas
	$SE = (X_{ln} - M)^2$

M: media global de  $X_{ln}$

#### Acápito 2.6.1.14 Dispersión de los recuentos según la distribución de Poisson

$$\chi^2_{n-1} = (n \times \sum X_i^2 / \sum X_i) - \sum X_i$$

$\chi^2_{n-1}$ : chi cuadrado total  
n: número de réplicas (n=10)  
 $X_i$ : recuento por placa

#### Acápito 2.6.1.15 Sobredispersión de los recuentos paralelos

$$Y = V_0 / X_m$$

Y: la razón de Lexis, la relación entre la varianza ( $V_0$ ) y la media de los recuentos ( $X_m$ )

#### Acápito 2.6.1.16 Conformidad

$$A = \overline{Ppmr} \times 100$$

A: conformidad  
 $Ppmr = Ppp + Ppn$   
 $Ppmr$ : probabilidad de pares con los mismos resultados  
 $Ppp = (Pp)^2$   
 $Ppp$ : probabilidad de los pares de los positivos  
 $Pp$ : probabilidad de los positivos  
 $Pp = n^+ / N$   
 $n^+$ : número de resultados positivos  
N: total de réplicas (N=10)  
 $Ppn = (Pn)^2$   
 $Ppn$ : probabilidad de los pares de los negativos  
 $Pn$ : probabilidad de los negativos  
 $Pn = 1 - Pp$

#### Acápito 2.6.1.16 Concordancia

$$C = (\sum PR_{IL-IR} / \sum PR_{IL}) \times 100$$

C: concordancia  
 $PR_{IL-IR}$ : pares de las réplicas inter-laboratorios con iguales resultados  
 $PR_{IL}$ : pares de las réplicas inter-laboratorios

#### **Anexo D. Certificados de Autor de Invención concedidos a los productos desarrollados**

---

Acápites: 3.1.2; 3.1.6.2; 3.2.4 y 3.4.1



REPÚBLICA DE CUBA



La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente:

## CERTIFICADO DE AUTOR DE INVENCION

(72) Autor (es) o coautor (es):

CLAUDIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
TAMARA LOBAINA RODRÍGUEZ  
RAISA ZHURBENKO  
JOSÉ MIGUEL GARCÍA MARICHAL

(71) Solicitante (es):

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS, con domicilio legal en carretera de Beltrán km 1½, Bejucal, La Habana, República de Cuba.

(11) Certificado Nro.: 23507

Concedido por Resolución No. 406/2010

(54) Título: BASE NUTRITIVA A PARTIR DE RAÍZ RESERVANTE DE IPOMOEA BATATA

Dado en La Habana, a 26 de febrero de 2010.

  
M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial



REPÚBLICA DE CUBA



La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente:

## CERTIFICADO DE AUTOR DE INVENCION

(72) Autor (es) o coautor (es):

RAISA ZHURBENKO  
ORESTES DARÍO LÓPEZ HERNÁNDEZ  
CLAUDIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
TAMARA LOBAINA RODRÍGUEZ  
DIANA ROSA VIERA ORAMAS

(71) Solicitante (es):

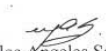
CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS, con domicilio legal en carretera de Beltrán, km 1½, Bejucal, La Habana, República de Cuba.

(11) Certificado Nro.: 23308

Concedido por Resolución No. 2415/2008

(54) Título: MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MEZCLA NUTRITIVA A PARTIR DEL TOMATE PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS Y PRODUCTO OBTENIDO

Dado en La Habana, a 1 de julio de 2008.

  
M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial



REPÚBLICA DE CUBA



La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente:

### CERTIFICADO DE AUTOR DE INVENCION

(72) Autor (es) o coautor (es):

TAMARA LOBAINA RODRÍGUEZ  
CLAUDIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
RAISA ZHURBENKO  
JOSÉ MIGUEL GARCÍA MARICHAL  
YORDANIA ZAYAS RUIZ

(71) Solicitante (es):

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS, con domicilio legal en carretera de Beltrán, Km 1 1/2, Bejucal, La Habana, República de Cuba.

(11) Certificado Nro. : 23499

Concedido por Resolución No. 201/2010

(54) Título: MEDIO NUTRITIVO PARA EL CULTIVO DE LEVADURAS

Dado en La Habana, a 4 de febrero de 2010.

M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial



REPÚBLICA DE CUBA



La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente:

### CERTIFICADO DE AUTOR DE INVENCION

(72) Autor (es) o coautor (es):

TAMARA LOBAINA RODRÍGUEZ  
CLAUDIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
RAISA ZHURBENKO

(71) Solicitante (es):

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS, con domicilio legal en carretera de Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, La Habana, República de Cuba.

(11) Certificado Nro. : 23509

Concedido por Resolución No. 431/2010

(54) Título: COMPOSICIÓN PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS

Dado en La Habana, a 1 de marzo de 2010.

M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

## **Anexo E. Documentos que certifican la liberación y aprobación del extracto de batata**

---

Acápite: 3.1.5



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	2842 Edición: 02 Fecha: 01.10.25 Hoja: 1 de 1
---	--

Acta de Aprobación de la Introducción

Prototipo: Extracto Vegetal

Código de Referencia: 1350

Institución que solicita: Bio Gen

Nombre del solicitante: María Zhurbenko

No. de Introducción: 6-005

Teniendo en consideración los resultados en las pruebas realizadas y la documentación generada en el proceso de introducción se aprueba la introducción del prototipo en el Centro Nacional de Biopreparados, dando conocimiento a las partes interesadas y autorizando la confección de la documentación necesaria para la producción, control de la calidad y comercialización del producto y la ejecución de los pasos para el registro sanitario del mismo.

Aprobado por:

Dirección Productiva:

Franklin Benoitoberto Murgu  
Nombre y Apellidos

Firma y cuño

06-03-20  
Fecha

Dirección de Aseguramiento de la Calidad:

Abelina Estrada Rodríguez  
Nombre y Apellidos

Firma y cuño

06-03-27  
Fecha



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	AC: 0291 EDIC: 05 FECHA: 00.12.15 HOJA 1 DE 1
---	--

**AUTORIZADO**

**NOTIFICACION DE LIBERACION DEL PRODUCTO**

No. 6-004-1

El producto: Extracto Vegetal

lote: 5020000 sublotos: -

presentación: Granel fortaleza: - vencimiento: 12/2007

código de referencia: 1350 No. de registro: -

tamaño de lote: 9 614 kg

CUMPLE ☒

NO CUMPLE ☐

con las especificaciones de calidad; avalado por el documento:

AO 2759(54954) y AO 2611(54954)

EL LOTE SE LIBERA ☒

NO SE LIBERA ☐

a la etapa de: Para el uso

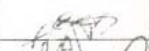
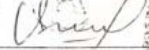
Observaciones:

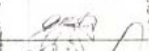

Aprobado por: Alcira R. Pecho Sando Firma:

Supervisado por: Vivian San Román Firma:

Fecha de emisión: 06-03-27



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD		AC: 0291 EDIC: 05 FECHA: 00.12.15 HOJA 1 DE 1
<b>AUTORIZADO</b>		
NOTIFICACION DE LIBERACION DEL PRODUCTO		No. <u>6-004-2</u>
El producto: <u>Extracto Vegetal</u>		
lote: <u>5030000</u> sublotos: <u>-</u>		
presentación: <u>Granel</u>	fortaleza: <u>-</u>	vencimiento: <u>12/2007</u>
código de referencia: <u>1350</u>	No. de registro: <u>-</u>	
tamaño de lote: <u>10.578 kg</u>		
CUMPLE <u>X</u>		NO CUMPLE <u>-</u>
con las especificaciones de calidad; avalado por el documento:		
<u>AC 2759(54954) y AC 2611(12/2007)</u>		
EL LOTE SE LIBERA <u>X</u>		NO SE LIBERA <u>-</u>
a la etapa de: <u>Para el uso</u>		
Observaciones:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> Aprobado por: <u>Helia R. Pardo Duro</u>  Supervisado por: <u>Vivian San Germán</u>  Fecha de emisión: <u>06-03-07</u> </div> <div> Firma:   Firma:  </div> </div>		

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD		AC: 0291 EDIC: 05 FECHA: 00.12.15 HOJA 1 DE 1
<b>AUTORIZADO</b>		
NOTIFICACION DE LIBERACION DEL PRODUCTO		No. <u>6-004-3</u>
El producto: <u>Extracto Vegetal</u>		
lote: <u>5040000</u> sublotos: <u>-</u>		
presentación: <u>Granel</u>	fortaleza: <u>-</u>	vencimiento: <u>12/2007</u>
código de referencia: <u>1350</u>	No. de registro: <u>-</u>	
tamaño de lote: <u>7.318 kg</u>		
CUMPLE <u>X</u>		NO CUMPLE <u>-</u>
con las especificaciones de calidad; avalado por el documento:		
<u>AC 2759(54958) y AC 2611(54958)</u>		
EL LOTE SE LIBERA <u>X</u>		NO SE LIBERA <u>-</u>
a la etapa de: <u>Para el uso</u>		
Observaciones:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> Aprobado por: <u>Helia R. Pardo Duro</u>  Supervisado por: <u>Vivian San Germán</u>  Fecha de emisión: <u>06-03-07</u> </div> <div> Firma:   Firma:  </div> </div>		

La base de medio CromoCen CND-C (Lote 8010000, BioCen) y base de medio CromoCen CND-F (Lote 9010000, BioCen) fueron seleccionadas para la preparación de los medios en las placas listas para el uso con las cuales se realizó el estudio de estabilidad.

**Preparación de las placas LPU:** se siguieron las indicaciones de los prospectos que acompañan a cada medio de cultivo, con la incorporación del suplemento glicerol en cantidad de 10 mL por cada litro de medio de cultivo. Una vez fundidos los productos, se colocaron en baño de María a temperatura de 45 a 50°C y bajo el ambiente de un flujo laminar se realizó la distribución de los medios en las placas Petri de 100 x 15 mm, teniendo especial cuidado de mantener un volumen de medio entre 20-25 mL, una altura en la placa de 3 a 4 mm y una superficie plana y nivelada para dejar solidificar las placas.

**Conservación de los medios en placas:** una vez solidificadas los medios en placas, las mismas se embalaron en grupos de 10 unidades, utilizando papel Kraft y se colocaron con la tapa hacia abajo, en cámara fría, a una temperatura estable entre 2 a 8°C.

**Comprobación de la esterilidad de los medios elaborados:** se seleccionó de forma aleatoria, el 2% del total de placas preparadas con cada medio de cultivo y se colocó en la incubadora a temperatura de 30°C durante siete días.

**Cronograma diseñado para el estudio de estabilidad:** el estudio se realizó evaluando un conjunto de características organolépticas, parámetros físico-químicos y microbiológicos, cada 7 días y durante 35 días de almacenamiento. Las placas preparadas conservadas en refrigeración, antes de ser utilizadas, se atemperaron en una incubadora a 30°C.

**Indicadores de calidad a evaluar y métodos empleados:** se evaluó el color del medio en las placas, el agua de condensación y su transparencia, mediante el método de evaluación visual, y el comportamiento del pH del medio preparado en placas mediante el método potenciométrico empleando la técnica de maceración.

La evaluación microbiológica se realizó, utilizando 6 cepas microbianas, provenientes del Cepario Central de BioCen, las especies de *Candida*: *C. albicans* ATCC 10231, *C. kefyr* C1-UH/Ckf, *C. tropicalis* C1-UH/Ct y *C. parapsilosis* C1-UH/Cp como controles positivos y se evaluó la capacidad inhibitoria con las cepas *E. coli* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 25922, como controles negativos. Las suspensiones de la especies de *Candida* se inocularon utilizando el método de estriado sobre la superficie, mientras que el poder inhibitorio se evaluó utilizando el método de inundación de la superficie con suspensiones bacterianas a una concentración correspondiente entre 1000-2000 UFC/mL.

**Condiciones de incubación e interpretación de los resultados:** las placas inoculadas se incubaron a temperatura de 35°C durante 48 h y se comprobó la funcionalidad biológica de los medios preparados y almacenados en cada período de ensayo.

## **Resultados**

### **Comprobación de la esterilidad de las placas listas para el uso de los medios CromoCen CND-C y CromoCen CND-F preparadas**

Se comprobó que la esterilidad de las placas preparadas con ambos medios de cultivo (CromoCen CND-C y CromoCen CND-F) resultó conforme, al no detectarse el desarrollo de colonias contaminantes en la superficie del medio. Ello verifica que el procedimiento, empleado para la elaboración y distribución de los medios en placas, se mantuvo bajo las condiciones y las recomendaciones que establecen las Buenas Practicas para la preparación de los medios de cultivo, comprobando con ello la efectividad de la limpieza, esterilización de los materiales de vidrio (placas Petri), la calidad del agua y el proceso de esterilización del producto, el cual no se realiza por autoclave.

### **Resultados de los indicadores físicos y organolépticos de las placas preparadas**

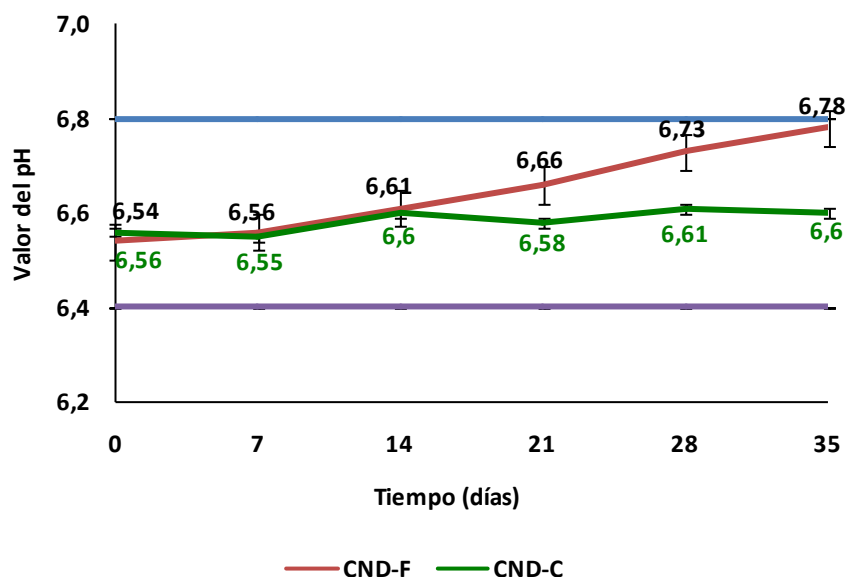
Los resultados de la evaluación de los indicadores de calidad de las placas preparadas con los medios de cultivo CromoCen CND-C y CromoCen CND-F, correspondiente a la hora cero, es decir, al inicio de la etapa de conservación, se muestran en la tabla F.1

En cada uno de los productos se encontraron características conforme con los requisitos de calidad establecidos en las especificaciones de cada uno. El medio preparado manifestó una coloración ámbar y su apariencia ligeramente opalescente debido a la presencia del agar.

**Tabla F.1** Resultados de los principales indicadores de calidad evaluados a las placas listas para el uso con los medios cromogénicos y fluorogénicos para *Candida*

Indicador de calidad	CromoCen CND-C	CromoCen CND-F
Color del medio en placas	Ámbar	Ámbar
Apariencia	Ligeramente opalescente	Ligeramente opalescente
Condensación en la tapa de la placa	Nivel aceptable	Nivel aceptable

Por otro lado, durante la preparación, el medio fundido se colocó en baño termostatado para homogeneizar su temperatura entre 45 y 50°C, con vistas de que, al alcanzar la temperatura de solidificación, al ser distribuido en las placas, minimizar la cantidad de agua por condensación que se adhiere en la tapa de la placa. Este aspecto se debe tener en cuenta a la hora de realizar los estudios de funcionalidad biológica debido a que puede dar lugar a resultados no deseables. Otro de los indicadores de calidad ensayados fue el valor del pH de los medios de cultivo. Según el prospecto, estos medios deben tener un valor del pH de  $6,6 \pm 0,2$ . En la figura F.1 se muestra el comportamiento del valor del pH de cada medio de cultivo preparado en placas y almacenado durante 35 días.



**Figura F.1** Comportamiento del pH de los medios CromoCen CND-C y CromoCen CND-F almacenado durante 35 días

Se observa que en el momento inicial de la preparación de los productos el pH está muy cercano al valor 6,6. Luego de la primera semana de conservadas las placas en refrigeración se mantiene el pH de forma estable. Sin embargo, a partir de la segunda semana se aprecia un incremento pequeño de este indicador más marcado para el medio CromoCen CND-F, el cual se mantiene en ascenso durante las siguientes semanas de evaluación, mientras que CromoCen CND-C no reporta incrementos superiores. No obstante, ambos productos, almacenados durante 35 días a temperaturas en 4 a 8°C, mantienen los valores de este parámetro dentro de los requisitos de calidad de las especificaciones donde se establece un rango entre 6,4 y 6,8 para que esté apto el mismo para su evaluación funcional.

El estudio del comportamiento de este parámetro es muy importante ya que interviene directamente en el funcionamiento del medio de cultivo y, a su vez, en el desarrollo de los microorganismos, los cuales requieren niveles de pH óptimos para su desarrollo. Además, estos productos contienen en su formulación ingredientes complejos, como son, los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, y está demostrado que la funcionalidad de los mismos está muy relacionada con el valor del pH del medio. Este elemento posee mayor relevancia ya que estos medios de cultivo basan su diseño en la identificación de diferentes especies de *Candida* de acuerdo al desarrollo de diferentes colores que manifiestan las colonias al reaccionar sus enzimas con los sustratos presentes en la formulación.

### **Resultados de los indicadores de calidad microbiológicos evaluados durante el período de almacenamiento**

La calidad microbiológica de un medio de cultivo se define por la capacidad que tiene de expresar la aplicación para el cual fue diseñado. En este caso, los medios CromoCen CND-C y CromoCen CND-F están diseñados para el cultivo, aislamiento, detección y la identificación de especies de *Candida* de mayor importancia en la clínica. Las cepas microbianas seleccionadas para la evaluación manifestaron diferencias culturales en cuanto al color y la morfología colonial, elementos que definen la identificación de cada especie.

La evaluación de sus indicadores microbiológicos reflejó, durante los 35 días de almacenamiento de las placas preparadas con los medios de cultivo cromogénico y cromogénico-fluorogénico, que se mantienen las propiedades de los productos que permiten el

cultivo y la diferenciación de las especies de *Candida* evaluadas. Se apreció que *C. albicans* creció manifestando colonias de color verde azul, redondas y lisas en el medio CromoCen CND-C, mientras que en CromoCen CND-F se evidenció, además, el desarrollo de fluorescencia de las colonias al visualizar las mismas bajo luz UV de 366 nm.

Las colonias de *C. tropicalis* resultaron de color azul y morfología redonda y lisa, pero con menor brillo en su superficie colonial. Una vez más se encontró que CromoCen CND-F mostró las mismas características que identifican a *C. tropicalis*, con la emisión de la fluorescencia que manifiesta esta especie. *Candida kefyr* reveló el desarrollo de un color rosado violáceo y no mostró fluorescencia. *C. parapsilosis* sólo se evaluó en CromoCen CNF-F y se identificó por desarrollar colonias blancas y lisas, que fluorescen bajo luz UV de 366 nm. Todas las características mostradas por las cepas de *Candida* evaluadas coinciden con la tabla de interpretación de los resultados de ambos medios de cultivo, que se presenta en el prospecto de cada producto.

La capacidad inhibitoria se ensayó en ambos medios de cultivo y se encontró que durante el período de almacenamiento las placas preparadas mantienen las propiedades inhibitorias descritas y evidencian la inhibición total de las especies ensayadas que correspondieron con *E. coli* y *S. aureus* inoculados a una concentración de  $2 \times 10^3$  UFC/mL.

#### **CONCLUSIÓN:**

- El período de validez de las placas preparadas con los medios CromoCen CND-C y CromoCen CND-F conservadas a temperatura de refrigeración (2-8 °C) y protegidas de la luz, supera los 30 días.

**Anexo G. Documentos que certifican la liberación y aprobación de la Base de Medio CromoCen CND-C**

---

Acápite: 3.2.5



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 2842  
Edición: 02  
Fecha: 01.10.25  
Hoja: 1 de 1

**AUTORIZADO**

Acta de Aprobación de la Introducción

Prototipo: BASE DE MEDIO CromoCen CND-C

Código de Referencia: 4447

Institución que solicita: BioCen

Nombre del solicitante: Tamara Lobaina

No. de Introducción: 8-002

Teniendo en consideración los resultados en las pruebas realizadas y la documentación generada en el proceso de introducción se aprueba la introducción del prototipo en el Centro Nacional de Biopreparados, dando conocimiento a las partes interesadas y autorizando la confección de la documentación necesaria para la producción, control de la calidad y comercialización del producto y la ejecución de los pasos para el registro sanitario del mismo.

Aprobado por:

Dirección Productiva:

Franklin Romariberto Márquez  
Nombre y Apellidos

Firma y cuño

2008-11-26  
Fecha

Dirección de Aseguramiento de la Calidad:

Antonio Yais Estrella Rodríguez  
Nombre y Apellidos

Firma y cuño

2008.12.03  
Fecha

**BioCen**

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 8, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Baltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144

INFORME DE ANÁLISIS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4447  
PAG: 1 DE 2

Base de Medio CromoCen CND-C  
(CromoCen CND-C Medium Base)

Granel (Batch): 8010000

NC: 86229

Lote (Lot): \_\_\_\_\_

Vence (Exp): \_\_\_\_\_

Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)	REQUISITO (REQUIREMENT)
Pérdida por desecación, % (Loss on drying).	<u>5.3</u>	≤ 7,0 %.
Color del polvo (Powder color).	<u>usparse</u>	Beige
Apariencia del polvo (Powder appearance).	<u>usparse</u>	Fino, deshidratado, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles (Fine, dehydrated, homogeneous, fluid, without clots or non soluble strange particles).
Color del medio preparado después de fundir (Color of prepared medium after meeting).	<u>usparse</u>	Ámbar (Amber).
Transparencia del medio preparado después de fundir (Transparency of prepared medium after meeting).	<u>usparse</u>	Ligeramente opalescente, con posible presencia de partículas blancas insolubles (Slightly opalescent, with possible presence of the white indissoluble particles).
pH del medio preparado después de fundir (pH of prepared medium after meeting).	<u>6.7</u>	6,6 ± 0,2



Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144

# INFORME DE ANÁLISIS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4447  
PAG: 2 DE 2

## Base de Medio CromoCen CND-C (CromoCen CND-C Medium Base)

Granel (Batch): 8010000  
Lote (Lot): \_\_\_\_\_  
Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 86229  
Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)			REQUISITO (REQUIREMENT)		
Microorganismo de ensayo (Test microorganism)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Morfología de las colonias aisladas (Appearance of the isolated colonies)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Morfología de las colonias aisladas (Appearance of the isolated colonies)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Verde a verde azul (Green or green blue)	Redondas y lisas (Round and flat)
<i>Candida tropicalis</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Azul (Blue)	Redondas y lisas (Round and flat)
<i>Candida kefyr</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Rosado (Pink)	Redondas y lisas (Round and flat)
<i>Candida krusei</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Bianco (White)	Planas, opacas de tamaño irregular (Smooth, opaque and irregular size)

Conforme (Conform): X

No Conforme: \_\_\_\_\_  
(Non Conform)

REFERENCIA (REFERENCE): ESP 4447 Ed. No. 01

Nombre (Name)	Firma (Signature)	Nombre (Name)	Firma (Signature)
Realizado (Performed): <u>[Firma]</u>	<u>[Firma]</u>	Supervisado (Supervised):	
Revisado (Revised): <u>[Firma]</u>	<u>[Firma]</u>	Aprobado (Approved):	
Fecha de emisión (Issuing date): <u>08.11.19</u>			

## CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC: 0291  
EDIC: 06

## NOTIFICACIÓN DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO

FECHA: 2007.10.31  
HOJA 1 DE 1

Nº 8-002-1

El producto: Base de Medio CromoCen CND-C

lote: 8010000 presentación: vasos x 100g vencimiento: 10/2010

código de referencia: 4447-A No. de registro: \_\_\_\_\_

tamaño de lote: 24 frascos

CUMPLE X

NO CUMPLE \_\_\_\_\_

con las Especificaciones de Calidad: avalado por el documento:

Ac 0160 (86229) y Ac 0652 (2008-10-16)

EL LOTE SE LIBERA X

NO SE LIBERA \_\_\_\_\_

a la etapa de: Estudio de Estabilidad

Observaciones:

Aprobado por: Vivian Eros Guzmán

Firma: [Firma]

Supervisado por: Albertina Y. Estrada

Firma: [Firma]

Fecha de emisión: 2008-12-03

BioCen

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144

INFORME DE ANÁLISIS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4447  
PAG: 1 DE 2

Base de Medio CromoCen CND-C  
(CromoCen CND-C Medium Base)

Granel (Batch): 8020000  
Lote (Lot): \_\_\_\_\_  
Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 86230  
Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)	REQUISITO (REQUIREMENT)
Pérdida por desecación, % (Loss on drying).	<u>5,1</u>	≤ 7,0 %.
Color del polvo (Powder color).	<u>responde</u>	Beige.
Apariencia del polvo (Powder appearance).	<u>responde</u>	Fino, deshidratado, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles (Fine, dehydrated, homogeneous, fluid, without clots or non soluble strange particles).
Color del medio preparado después de fundir (Color of prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ámbar (Amber).
Transparencia del medio preparado después de fundir (Transparency of prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ligeramente opalescente, con posible presencia de partículas blancas insolubles (Slightly opalescent, with possible presence of the white indissoluble particles).
pH del medio preparado después de fundir (pH of prepared medium after meeting).	<u>6,7</u>	6,6 ± 0,2

BioCen

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144

INFORME DE ANÁLISIS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4447  
PAG: 2 DE 2

Base de Medio CromoCen CND-C  
(CromoCen CND-C Medium Base)

Granel (Batch): 8020000  
Lote (Lot): \_\_\_\_\_  
Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 86230  
Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g

ENSAYO (TEST)		RESULTADO (RESULT)		REQUISITO (REQUIREMENT)		
Microorganismo de ensayo (Test microorganism)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Morfología de las colonias aisladas (Appearance of the isolated colonies)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Morfología de las colonias aisladas (Appearance of the isolated colonies)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Verde a verde azul (Green or green blue).	Redondas y lisas (Round and flat)
<i>Candida tropicalis</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Azul (Blue)	Redondas y lisas (Round and flat)
<i>Candida kefyr</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Rosado (Pink)	Redondas y lisas (Round and flat)
<i>Candida krusei</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Blanco (White)	Planas, opacas tamaño irregular (Smooth, opaque and irregular size)
Conforme (Conform): <u>X</u>				No Conforme: _____ (Non Conform)		
REFERENCIA (REFERENCE): ESP 4447 Ed. No. 01						
Nombre (Name)		Firma (Signature)		Nombre (Name)		Firma (Signature)
Realizado (Performed): <u>Paula García</u>		<u>[Signature]</u>		Supervisado (Supervised):		
Revisado (Revised): <u>Paula García</u>		<u>[Signature]</u>		Aprobado (Approved):		
Fecha de emisión (Issuing date): <u>08.11.19</u>						



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC: 0291  
EDIC: 06  
FECHA: 2007.10.31  
HOJA 1 DE 1

NOTIFICACIÓN DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO

Nº 8-002-2

El producto: Base de Medio CromoCen CND-C

Lote: 8021000 presentación: frasco x 100g vencimiento: 10/2010

código de referencia: 4447-A No. de registro: -

tamaño de lote: 23 frascos

CUMPLE ☒ NO CUMPLE ☐

con las Especificaciones de Calidad; avalado por el documento:  
AC 0160 (86230) y AC 0652 (2008.10.16)

EL LOTE SE LIBERA ☒ NO SE LIBERA ☐

a la etapa de: Estudio de Estabilidad

Observaciones:

Aprobado por: Vivian San Germán Firma: [Firma]

Supervisado por: Albertina L. Estrada Firma: [Firma]

Fecha de emisión: 2008.12.03



Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos (53-7) 33-1144 y 84-7133 Fax (53-7) 33-1144

# INFORME DE ANÁLISIS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4447  
PAG: 1 DE 2

## Base de Medio CromoCen CND-C (CromoCen CND-C Medium Base)

Granel (Batch): 8030000 NC: 86231  
Lote (Lot): -  
Vence (Exp): - Envase por (Pack size): - g

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)	REQUISITO (REQUIREMENT)
Pérdida por desecación, % (Loss on drying).	<u>5.3</u>	$\leq 7.0\%$
Color del polvo (Powder color).	<u>responde</u>	Beige.
Apariencia del polvo (Powder appearance).	<u>responde</u>	Fino, deshidratado, homogéneo, fluido sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles (Fine, dehydrated homogeneous, fluid, without clots or no: soluble strange particles).
Color del medio preparado después de fundir (Color of prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ámbar (Amber).
Transparencia del medio preparado después de fundir (Transparency of prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ligeramente opalescente, con posible presencia de partículas blancas insoluble (Slightly opalescent, with possible presence of the white indissoluble particles).
pH del medio preparado después de fundir (pH of prepared medium after meeting).	<u>6.7</u>	$6.6 \pm 0.2$

BioCen

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos (53-7) 33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7) 33-1144

INFORME DE ANÁLISIS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4447  
PAG. 2 DE 2

Base de Medio CromoCen CND-C  
(CromoCen CND-C Medium Base)

Granel (Batch): 8030000  
Lote (Lot): \_\_\_\_\_  
Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 86231  
Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)			REQUISITO (REQUIREMENT)		
Microorganismo de ensayo (Test microorganism)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Morfología de las colonias aisladas (Appearance of the isolated colonies)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Morfología de las colonias aisladas (Appearance of the isolated colonies)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Verde a verde azul (Green or green blue)	Redondas y lisas (Round and smooth)
<i>Candida tropicalis</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Azul (Blue)	Redondas y lisas (Round and smooth)
<i>Candida kefyr</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Rosado (Pink)	Redondas y lisas (Round and smooth)
<i>Candida krusei</i> sp.	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	Bueno (Good)	Blanco (White)	Planas, opacas, tamaño irregular (Smooth, opaque and irregular size)

Conforme (Conform): X

No Conforme: \_\_\_\_\_  
(Non Conform)

REFERENCIA (REFERENCE): ESP 4447 Ed. No. 01

Nombre (Name)	Firma (Signature)	Nombre (Name)	Firma (Signature)
Realizado (Performed): <u>Guillermo Utrera</u>	<u>[Signature]</u>	Supervisado (Supervised):	
Revisado (Revised): <u>Julio Félix</u>	<u>[Signature]</u>	Aprobado (Approved):	
Fecha de emisión (Issuing date): <u>28.11.19</u>			

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC: 0291  
EDIC: 06  
FECHA: 2007.10.31  
HOJA 1 DE 1

NOTIFICACIÓN DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO

Nº 8-002-3

El producto: Base de Medio CromoCen CND-C

lote: 8031000 presentación: frasco x 100g vencimiento: 10/2010

código de referencia: 4447-A No. de registro: \_\_\_\_\_

tamaño de lote: 23 frascos

CUMPLE X

NO CUMPLE \_\_\_\_\_

con las Especificaciones de Calidad; avalado por el documento:

AC 0160 (86231) y AC 0652 (2008.10.16)

EL LOTE SE LIBERA X

NO SE LIBERA \_\_\_\_\_

a la etapa de: Estudio de Estabilidad

Observaciones:

Aprobado por: Vivian San Germán

Firma: [Signature]

Supervisado por: Albertina Y. Estévez

Firma: [Signature]

Fecha de emisión: 2008.12.03

## **Anexo H. Certificado de los registros sanitarios de los nuevos productos**

---

Acápites: 3.2.6 y 3.4.3



REPÚBLICA DE CUBA  
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

## CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO

Se otorga el presente como constancia de que se ha autorizado la comercialización en el territorio nacional del producto que a continuación se describe, dando cumplimiento así a lo establecido en el Reglamento para el Registro Sanitario de Diagnosticadores vigente.

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>1. PRODUCTO</b>            | Perfil: Medios de Cultivo Cromogénicos y/o Fluorogénicos   |
| <b>1.1 Aplicación</b>         | Para uso microbiológico.   |
| <b>1.2 Presentación</b>       | Ver Anexo  |
| <b>1.3 Almacenamiento</b>     | De 15 a 30 °C.   |
| <b>1.4 Período de validez</b> | Ver Anexo.   |
| <b>2. TITULAR</b>             | Centro Nacional de Biopreparados <b>2.1 País CUBA</b>  |
| <b>2.2 Domicilio legal</b>    | Carretera a Beltrán, km 1 ½, Bejucal, La Habana, Cuba CP 32600, Apartado Postal 6048, La Habana 6. |
| <b>2.3 Razón social</b>       | Fabricante.  |
| <b>3. FABRICANTE</b>          | El TITULAR. <b>3.1 País -</b>  |
| <b>3.2 Domicilio legal</b>    | -  |
| <b>4. INSCRIPCIÓN No.</b>     | D0712-14 <b>4.1 Fecha 2007-12-24</b>   |

Este Certificado es válido única y exclusivamente para lo declarado en el Expediente de Registro del producto descrito, que obra en poder del CECMED, y cuya vigencia expira en la fecha **2012-12-24**

Calle 200 No. 1706 es/ 17 y 19, Rpto. Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, CUBA, C.P. 11900, A.P. 16885  
Tel.: (527) 2718645, 2718767, 2718822, 2718829 Fax: 2714023 e-mail: cecmed@cecmecid.minsa.cu



REPÚBLICA DE CUBA  
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

## Anexo: Relación de los productos incluidos en el perfil: Medios de Cultivo cromogénicos y/o fluorogénicos.

No.	Nombre	Presentación	Período de validez (meses)
D0712-14/1	CromoCen CC	Frasco por 15,2 g, 100 g y 500 g	60
D0712-14/2	Base de Medio CromoCen SC	Frasco por 15,7 g, 100 g y 500 g	60
D0712-14/3	Base de Medio CromoCen AGN	Frasco por 20,6 g, 100 g y 500 g	60
D0712-14/4	CromoCen ECCS	Frasco por 22 g, 100 g y 500 g	60
D0712-14/5	Caldo CromoCen CC	Frasco por 8,7 g, 100 g y 500 g	24
D0712-14/6	CromoCen ENT	Frasco por 19,03 g, 100 g y 500 g	36
D0712-14/7	Caldo CromoCen CCL	Frasco por 11,9 g, 100 g y 500 g	24
D0712-14/8	Base de Medio CromoCen CND-C	Frasco por 23,6 g, 100 g y 500 g	24
D0712-14/9	Base de Medio CromoCen CND-F	Frasco por 23,6 g, 100 g y 500 g	24



Calle 200 No. 1706 es/ 17 y 19, Rpto. Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, CUBA, C.P. 11900, A.P. 16885  
Tel.: (527) 2718645, 2718767, 2718822, 2718829 Fax: 2714023 e-mail: cecmed@cecmecid.minsa.cu



CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

## CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO

Se otorga el presente como constancia de que se ha autorizado la comercialización en el territorio nacional del producto que a continuación se describe, dando cumplimiento así a lo establecido en el Reglamento para el Registro Sanitario de Diagnosticadores vigente.

### 1. PRODUCTO

Perfil: Suplementos y reactivos para diagnóstico microbiológico (Ver Anexo).

#### 1.1 Aplicación

Para uso microbiológico.

#### 1.2 Presentación

Frasco por 5 mL.

#### 1.3 Almacenamiento

Ver Anexo.

#### 1.4 Período de validez

Ver Anexo.

### 2. TITULAR

Centro Nacional de Biopreparados

2.1 País CUBA

#### 2.2 Domicilio legal

Carretera a Beltrán, km 1 ½, Bejucal, La Habana, Cuba CP 32600, Apartado Postal 6048, La Habana 6.

#### 2.3 Razón social

Fabricante.

### 3. FABRICANTE

El TITULAR.

3.1 País -

#### 3.2 Domicilio legal

-

### 4. INSCRIPCIÓN No.

D1007-32

4.1 Fecha

2 JUL 2010

Este Certificado es válido única y exclusivamente para lo declarado en el Expediente de Registro del producto descrito, que obra en poder del CECMED, y cuya vigencia expira en la fecha 2015-07



Calle No. 1706 el 17 y 19, Rpto. Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, CUBA, C.P. 11600, A.P. 16065  
Tel.: (537) 2718645, 2718767, 2718622, 2718823 Fax: 2714023 e-mail: cecmed@cecmed.sld.cu



CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

Anexo: Relación de los productos incluidos en el perfil: Suplementos y reactivos para diagnóstico microbiológico.

No.	Nombre	Almacenamiento	Período de validez (meses)
D1007-32/1	Solución de urea estéril al 40 %	2 a 8 °C	48
D1007-32/2	Suplemento líquido PLG	15 a 30 °C	60
D1007-32/3	Suplemento glicerol	15 a 30 °C	48



Calle No. 1706 el 17 y 19, Rpto. Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, CUBA, C.P. 11600, A.P. 16065  
Tel.: (537) 2718645, 2718767, 2718622, 2718823 Fax: 2714023 e-mail: cecmed@cecmed.sld.cu



**Anexo I. Documentos que certifican la liberación y aprobación de la Base de Medio  
CromoCen CND-F**

---

Acápite: 3.4.2

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 2842  
Edición: 02  
Fecha: 01.10.25  
Hoja: 1 de 1

**AUTORIZADO**

Acta de Aprobación de la Introducción

Prototipo: Base de medio CromoCen CND-F

Código de Referencia: 4450

Institución que solicita: BioCen

Nombre del solicitante: RAISA Zhorbenko

No. de Introducción: 9-003

Teniendo en consideración los resultados en las pruebas realizadas y la documentación generada en el proceso de introducción se aprueba la introducción del prototipo en el Centro Nacional de Biopreparados, dando conocimiento a las partes interesadas y autorizando la confección de la documentación necesaria para la producción, control de la calidad y comercialización del producto y la ejecución de los pasos para el registro sanitario del mismo.

Aprobado por:

Dirección Productiva:

Franklin Barroetobino Márquez  
Nombre y Apellidos



2009-07-13  
Fecha

Dirección de Aseguramiento de la Calidad:

Albentoro Yari Estrada Rodríguez  
Nombre y Apellidos

[Firma]  
Firma y cuño

2009-07-28  
Fecha

**BioCen**

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144

INFORME DE ANÁLISIS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4450  
PAG: 1 DE 2

**Base de Medio CromoCen CND-F  
(CromoCen CND-F Medium Base)**

Granel (Batch): 9010000  
Lote (Lot): \_\_\_\_\_  
Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 93049

Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)	REQUISITO (REQUIREMENT)
Pérdida por desecación, % (Loss on drying).	<u>4,6</u>	≤ 7,0 %.
Color del polvo (Powder color).	<u>responde</u>	Beige.
Apariencia del polvo (Powder appearance).	<u>responde</u>	Fino, deshidratado, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles (Fine, dehydrated, homogeneous, fluid, without clots or non soluble strange particles).
Color del medio preparado después de fundir (Color of the prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ámbar (Amber).
Transparencia del medio preparado después de fundir (Transparency of the prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ligeramente opalescente, con posible presencia de partículas blancas insolubles (Slightly opalescent, with possible presence of the white indissoluble particles).
pH del medio preparado después de fundir (pH of the prepared medium after meeting).	<u>6,6</u>	6,6 ± 0,2

# BioCen

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144

## INFORME DE ANÁLISIS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4450  
PAG: 2 DE 2

### Base de Medio CromoCen CND-F (CromoCen CND-F Medium Base)

Granel (Batch): 9010000  
Lote (Lot): \_\_\_\_\_  
Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 83049  
Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

#### ENSAYO (TEST)

Microorganismo de  
ensayo  
(Test microorganism)

Crecimiento  
(Growth)

Color de las  
colonias aisladas  
(Color of the  
isolated colonies)

Fluorescencia azul  
a 366 nm  
(Blue fluorescence  
at 366 nm)

Crecimiento  
(Growth)

Color de las colonias  
aisladas  
(Color of the isolated  
colonies)

Fluorescencia azul  
a 366 nm  
(Blue fluorescence  
at 366 nm)

*Candida albicans*  
ATCC 10231

crecimiento responde +

Bueno  
(Good). Verde a verde azul  
(Green or green  
blue).

*Candida kefyr*

crecimiento responde -

Bueno  
(Good). Rosado a rosado  
violáceo  
(Pink or violet pink).

*Candida parapsilosis*

crecimiento responde +

Bueno  
(Good). Blanco  
(White).

*Staphylococcus*  
*aureus* ATCC 25923

inhibido - -

De inhibido a  
escaso  
(none/poor)

*Escherichia coli*  
ATCC 25922

inhibido - -

De inhibido a  
escaso  
(none/poor)

Conforme (Conform): X

No Conforme: \_\_\_\_\_  
(Non Conform)

REFERENCIA (REFERENCE): ESP 4450 Ed. No. 01

Nombre (Name)

Firma (Signature)

Nombre (Name)

Firma (Signature)

Realizado (Performed):

Paula Ríos

Supervisado (Supervised):

Victor San Germán

Revisado (Revised):

Paula Ríos

Aprobado (Approved):

Victor San Germán

Fecha de emisión (Issuing date):

2009-07-28



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC: 0291  
EDIC: 06  
FECHA: 2007.10.31  
HOJA 1 DE 1

### NOTIFICACIÓN DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO

Nº 9-002-1

El producto: Base de Medio CromoCen CND-F

lote: 9011000 presentación: frasco x 100g vencimiento: 05/2011

código de referencia: 4450 No. de registro: -

tamaño de lote: 20 frascos

CUMPLE X

NO CUMPLE -

con las Especificaciones de Calidad; avalado por el documento:

AC 0160 (93049).

EL LOTE SE LIBERA X

NO SE LIBERA -

a la etapa de: Estudio de estabilidad

Observaciones:

Aprobado por:

Samir Ríos Rodríguez

Supervisado por:

Victor San Germán

Fecha de emisión:

2009-07-28

Firma:

Firma:

**BioCen****Centro Nacional de Biopreparados**APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144**INFORME DE ANÁLISIS**  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDADAC 0160  
CR: 4450  
PAG: 1 DE 2**Base de Medio CromoCen CND-F**  
(CromoCen CND-F Medium Base)Granel (Batch): 902 0000

Lote (Lot): \_\_\_\_\_

Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 93050

Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)	REQUISITO (REQUIREMENT)
Pérdida por desecación, % (Loss on drying).	<u>4,6</u>	≤ 7,0 %.
Color del polvo (Powder color).	<u>responde</u>	Beige.
Apariencia del polvo (Powder appearance).	<u>responde</u>	Fino, deshidratado, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles (Fine, dehydrated, homogeneous, fluid, without clots or non soluble strange particles).
Color del medio preparado después de fundir (Color of the prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ámbar (Amber).
Transparencia del medio preparado después de fundir (Transparency of the prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ligeramente opalescente, con posible presencia de partículas blancas insolubles (Slightly opalescent, with possible presence of the white indissoluble particles).
pH del medio preparado después de fundir (pH of the prepared medium after meeting).	<u>6,6</u>	6,6 ± 0,2

**BioCen****Centro Nacional de Biopreparados**APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7)33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7)33-1144**INFORME DE ANÁLISIS**  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDADAC 0160  
CR: 4450  
PAG: 2 DE 2**Base de Medio CromoCen CND-F**  
(CromoCen CND-F Medium Base)Granel (Batch): 902 0000

Lote (Lot): \_\_\_\_\_

Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 93050

Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)			REQUISITO (REQUIREMENT)		
Microorganismo de ensayo (Test microorganism)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Fluorescencia azul a 366 nm (Blue fluorescence at 366 nm)	Crecimiento (Growth)	Color de las colonias aisladas (Color of the isolated colonies)	Fluorescencia azul a 366 nm (Blue fluorescence at 366 nm)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>+</u>	Bueno (Good).	Verde a verde azul (Green or green blue).	+
<i>Candida kefyr</i>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>-</u>	Bueno (Good).	Rosado a rosado violáceo (Pink or violet pink).	-
<i>Candida parapsilosis</i>	<u>responde</u>	<u>responde</u>	<u>+</u>	Bueno (Good).	Blanco (White).	+
G La	Inóculo de 1000 - 2000 UFC/placa (Inoculum 1000 - 2000 CFU/plate)			Inóculo de 1000 - 2000 UFC/placa (Inoculum 1000 - 2000 CFU/plate)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<u>inhibido</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	De inhibido a escaso (none/poor)	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<u>inhibido</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	De inhibido a escaso (none/poor)	-	-

Conforme (Conform): XNo Conforme: \_\_\_\_\_  
(Non Conform)

REFERENCIA (REFERENCE): ESP 4450 Ed. No. 01

Nombre (Name)	Firma (Signature)	Nombre (Name)	Firma (Signature)
Realizado (Performed): <u>[Signature]</u>	<u>[Signature]</u>	Supervisado (Supervised):	
Revisado (Revised): <u>[Signature]</u>		Aprobado (Approved):	

Fecha de emisión (Issuing date): 2009-07-03



CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC: 0291  
EDIC: 06  
FECHA: 2007.10.31  
HOJA 1 DE 1

NOTIFICACIÓN DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO

Nº 9-002-2

El producto: Base de Medio CromoCen CND-F.

lote: 9021000 presentación: frases x 100g vencimiento: 05/2011

código de referencia: 4450 No. de registro: -

tamaño de lote: 21 frases

CUMPLE X NO CUMPLE -

con las Especificaciones de Calidad; avalado por el documento:  
AC 0160 (93050)

EL LOTE SE LIBERA X NO SE LIBERA -

a la etapa de: Estudios de Estabilidad

Observaciones:

Aprobado por: Emilio Ríos Rodríguez Firma: [Firma]

Supervisado por: Vivian San Germán Firma: [Firma]

Fecha de emisión: 2007-07-28



Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7) 33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7) 33-1144

# INFORME DE ANÁLISIS ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC 0160  
CR: 4450  
PAG: 1 DE 2

## Base de Medio CromoCen CND-F (CromoCen CND-F Medium Base)

Granel (Batch): 9030000

NC: 93051

Lote (Lot): -

Vence (Exp): -

Envase por (Pack size): - g.

ENSAYO (TEST)	RESULTADO (RESULT)	REQUISITO (REQUIREMENT)
Pérdida por desecación, % (Loss on drying).	<u>4,7</u>	≤ 7,0 %.
Color del polvo (Powder color).	<u>responde</u>	Beige.
Apariencia del polvo (Powder appearance).	<u>responde</u>	Fino, deshidratado, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles (Fine, dehydrated, homogeneous, fluid, without clots or non soluble strange particles).
Color del medio preparado después de fundir (Color of the prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ámbar (Amber).
Transparencia del medio preparado después de fundir (Transparency of the prepared medium after meeting).	<u>responde</u>	Ligeramente opalescente, con posible presencia de partículas blancas insolubles (Slightly opalescent, with possible presence of the white indissoluble particles).
pH del medio preparado después de fundir (pH of the prepared medium after meeting).	<u>6,6</u>	6,6 ± 0,2

**BioCen**

Centro Nacional de Biopreparados

APARTADO 6048, HABANA 6, CIUDAD DE LA HABANA, CUBA.  
Carretera a Beltrán, km 1 1/2, Bejucal, Provincia Habana.  
Teléfonos: (53-7) 33-1144 y 84-7133 Fax: (53-7) 33-1144**INFORME DE ANÁLISIS**  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDADAC 0160  
CR: 4450  
PAG: 2 DE 2**Base de Medio CromoCen CND-F**  
(CromoCen CND-F Medium Base)Granel (Batch): 9030000

Lote (Lot): \_\_\_\_\_

Vence (Exp): \_\_\_\_\_

NC: 93051

Envase por (Pack size): \_\_\_\_\_ g.

**ENSAYO (TEST)**Microorganismo de  
ensayo  
(Test microorganism)Crecimiento  
(Growth)Color de las  
colonias aisladas  
(Color of the  
isolated colonies)Fluorescencia azul  
a 366 nm  
(Blue fluorescence  
at 366 nm)**REQUISITO (REQUIREMENT)**Crecimiento  
(Growth)Color de las colonias  
aisladas  
(Color of the isolated  
colonies)Fluorescencia azul  
a 366 nm  
(Blue fluorescence  
at 366 nm)*Candida albicans*  
ATCC 10231respuestarespuesta+Bueno  
(Good).Verde a verde azul  
(Green or green  
blue).*Candida kefyr*respuestarespuesta-Bueno  
(Good).Rosado a rosado  
violáceo  
(Pink or violet pink).*Candida parapsilosis*respuestarespuesta+Bueno  
(Good).Blanco  
(White).*Staphylococcus*  
*aureus* ATCC 25923inhibido--De inhibido a  
escaso  
(none/poor)  
De inhibido a  
escaso  
(none/poor)*Escherichia coli*  
ATCC 25922inhibido--Conforme (Conform): XNo Conforme: -  
(Non Conform)

REFERENCIA (REFERENCE): ESP 4450 Ed. No. 01

Nombre (Name)

Firma (Signature)

Nombre (Name)

Firma (Signature)

Realizado (Performed):

Santhi afacín

Supervisado (Supervised):

Revisado (Revised):

mf fexeris

Aprobado (Approved):

Fecha de emisión (Issuing date): 2009-07-03**CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS**  
ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

AC: 0291

EDIC: 06

FECHA: 2007.10.31

HOJA 1 DE 1

**NOTIFICACIÓN DE LIBERACIÓN DEL PRODUCTO**Nº 9-002-3El producto: Base de Medio CromoCen CND-F.lote: 9031000presentación: frasco x 100gvencimiento: 05/2011código de referencia: 4450No. de registro: -tamaño de lote: 21 frascosCUMPLE XNO CUMPLE -

con las Especificaciones de Calidad; avalado por el documento:

AC 0160 (93051)EL LOTE SE LIBERA XNO SE LIBERA -a la etapa de: Estudio de Estabilidad

Observaciones:

Aprobado por:

David Pérez Rodríguez

Supervisado por:

Vivian Son Duran

Fecha de emisión:

2009-07-28

**Anexo J. Evaluación del desempeño del método cromogénico en el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología y Parasitología del IPK**

---

Acápite: 3.6.2





# INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

"PEDRO KOURÍ"

Ministerio de Salud Pública

## Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS

Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica  
y control biológico de vectores y huéspedes intermediarios  
Para el estudio de las Enfermedades Viricas  
En Tuberculosis y Micobacterias  
Para el estudio del Dengue y su vector



INSTITUTO  
Pedro Kourí

La Habana, 12 de agosto de 2010

Ing. Tamara Lobaina  
Centro Nacional de Biopreparados  
La Habana


Estimada Ing. Lobaina:

Por este medio deseamos informarle que los resultados del estudio comparativo del medio **CromoCND-C** con el **CHROMagar Candida** realizado en el Laboratorio de Micología del IPK, fueron muy satisfactorios a favor del medio cromogénico producido por el Centro Nacional de Biopreparados.

La posibilidad de disponer de un medio cromogénico de producción nacional que permita la identificación rápida y específica de las principales especies patógenas del género *Candida* será de gran impacto en diagnóstico micológico en los laboratorios de Microbiología de la red nacional de salud. Es conocido que este diagnóstico se ha encontrado deprimido durante mucho tiempo por lo que consideramos que la introducción de este medio cromogénico tendrá resultados muy positivos en el diagnóstico y tratamiento oportunos de las infecciones por *Candida* en nuestro país.

Le adjuntamos el informe del mencionado estudio.

Le saluda atentamente,

  
Dr. Carlos M. Fernández Andreu  
Investigador Titular  
Laboratorio de Micología,  
Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK)





## ESTUDIO COMPARATIVO DE MEDIOS CROMOGÉNICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *CANDIDA*.

Mayda Rosa Perurena Lancha; Carlos Manuel Fernández Andreu; Yoldrey Pérez Muñoz; Gerardo Martínez Machín; María Teresa Illnait Zaragozaí.

Laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK).

### INTRODUCCIÓN

Las levaduras del genero *Candida* se encuentran entre las principales especies patógenas del hombre, pudiendo causar cuadros clínicos muy diversos, algunos de ellos de una elevada mortalidad, por lo que resulta imprescindible el desarrollo de todos aquellos procedimientos que contribuyan a un diagnóstico más rápido, específico y de bajo costo.

En los últimos años se ha promovido el uso de medios de cultivo cromogénicos basados en reacciones enzimáticas específicas que favorecen una identificación rápida, aunque, en la mayoría de los casos, presuntiva de las principales especies patógenas.

Uno de los medios más ampliamente utilizado en la identificación de estos patógenos ha sido el CHROMagar *Candida*, en cuya composición intervienen sustratos cromogénicos que brindan una pigmentación característica a las colonias de las principales especies patógenas del género (Odds y Bernaerts, 1994). Con estos mismos fines, en el Centro Nacional de Biopreparados (Biocen) de nuestro país se ha desarrollado el medio CromoCen CND-C, el cual, basado en principios similares, brinda una identificación rápida de las especies de *Candida* de mayor interés clínico (Lobaina, 2008).

En el presente informe se presentan los resultados de un estudio comparativo para la identificación de aislamientos clínicos de distintas especies de *Candida* en ambos medios cromogénicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestras:** Se realizó un estudio comparativo de 53 aislamientos de levaduras del género *Candida* obtenidos a partir de exudados vaginales de mujeres que se presentaron con signos y síntomas de vulvovaginitis en las consultas externas del Hospital Ginecobstétrico “Eusebio Hernández”, Marianao, Ciudad de La Habana y del Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de Banes, Holguín, en el período comprendido entre enero y abril de 2009.

**Identificación:** Todos los aislamientos habían sido identificados previamente hasta el nivel de especie mediante métodos convencionales (pruebas morfológicas y bioquímicas) (McGinnis, 1980). Como controles se emplearon las cepas *C. albicans* ATCC 10231 y *C. krusei* ATCC 6258 (LMIPK 0213 y LMIPK 0283 de la colección de cultivos de hongos del IPK, respectivamente).

**Comparación entre los medios cromogénicos CHROMagar *Candida* (Francia) y CromoCen CND-C (Biocen, Cuba):** A partir de cada aislamiento previamente identificado y con 3-4 días de crecimiento, se preparó una suspensión en 5 mL de agua destilada estéril hasta alcanzar una turbiedad equivalente a la del tubo 0.5 de la escala de McFarland. De cada suspensión se tomaron alícuotas de 10 µL y se sembraron en paralelo en los medios CHROMagar *Candida* y CromoCen CND-C respectivamente y se incubaron a 37°C durante 48 horas. La preparación de los medios de cultivo, así como las correspondientes lecturas se realizaron según las instrucciones de los respectivos fabricantes (Odds y Bernaerts, 1994; Lobaina, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos al sembrar los aislamientos en el medio CHROMagar *Candida*. De los 41 aislamientos de *C. albicans*, 37 (90.24%) desarrollaron color verde, otros tres mostraron

color verde-azul y uno con pigmentación azul. Los dos aislamientos de *C. krusei* (100%) mostraron color rosado mientras que las colonias de *C. tropicalis* (un aislamiento) se observaron de color azul.

Al evaluar el comportamiento del medio por especies, se observa que la coloración desarrollada por las colonias de *C. albicans*, se corresponde con la descrita por los fabricantes para la especie. Resultados similares fueron obtenidos por Ballesté *et al.*, los cuales realizaron una evaluación de este medio para la identificación de 127 cepas de *Candida*, donde 77 fueron identificadas como *C. albicans* y de ellas 68 (88.31%) tuvieron crecimiento de color verde.

Tanto *C. tropicalis* (un aislamiento) como *C. krusei* (dos aislamientos) mostraron colonias con los colores descritos para cada una de ellas (azul metálico y rosado, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados por otros autores, donde el 100% de las cepas de *C. tropicalis* y *C. krusei* presentaron los colores correspondientes (Yücesoy y Marol, 2003; Hospenthal *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Resultados obtenidos al sembrar los 53 aislamientos estudiados en el medio CHROMagar *Candida*.

CHROMagar <i>Candida</i>							
	Color de las colonias						
Especies	V	VA	A	B	M	RV	R
<i>C. albicans</i> (n=41)	37	3	1	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (n=5)	0	0	0	0	4	0	1
<i>C. krusei</i> (n=2)	0	0	0	0	0	2	0
<i>C. parapsilosis</i> (n=2)	0	0	0	2	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0	0	1	0	0	0	0
<i>C. inconspicua</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. lusitaniae</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0	1

V: verde; VA: verde-azul; A: azul, B: blanco; M: malva; RV: rosado vellosa; R: rosada

Uno de los aislamientos de *C. glabrata*, así como los de *C. lusitaniae* y *C. inconspicua* (uno de cada especie) desarrollaron color rosado. Está descrito que 12 especies de *Candida* pueden mostrar este color variando desde pálido hasta intenso, por lo que resultan imprescindibles otras pruebas para lograr su identificación. Sin embargo, las colonias de *C. krusei* (dos aislamientos), también de color rosado, pueden distinguirse fácilmente en este medio debido a su característico halo micelial (Freydière y Pfaller, 1996).

Los dos aislamientos de *C. parapsilosis* incluidos en el presente estudio dieron un crecimiento de color blanco. Si bien esta especie no está entre las que el medio es capaz de identificar, según los fabricantes, este resultado coincide con los estudios realizados por Ballesté *et al.* en 2005, quienes obtuvieron que de los 24 aislamientos distintos de *C. albicans* que tuvieron colonias de color blanco, 16 eran de *C. parapsilosis* (66.7%).

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la siembra de los aislamientos de *Candida* en el medio CromoCen CND-C. Del total de cepas de *C. albicans*, 40 (97.56%) presentaron colonias de color con tonalidades entre el verde y el verde-azul. Para *C. tropicalis* se obtuvieron colonias de color azul (un aislamiento), mientras que 4 aislamientos de *C. glabrata* (80%) desarrollaron coloración rosada con tonalidades claras. *C. parapsilosis* manifestó colonias de color blanco al igual que *C. krusei*, pero con la diferencia de que esta última presentó colonias vellosas.

Al valorar el comportamiento de este medio, se observó que el 97.56% de los aislamientos de *C. albicans* estudiados desarrollaron las tonalidades (de verde a verde-azul) establecidas para esta especie por los fabricantes. En el caso de *C. tropicalis* el color desarrollado (azul), correspondió con el que está descrito según los creadores del medio, al igual que *C. krusei* que desarrolló colonias rugosas de color blanco opaco. Lo antes expuesto sugiere, que este medio, puede ser utilizado en la identificación presuntiva

de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, ya que dio un alto porcentaje de correspondencia con lo planteado por los fabricantes.

**Tabla 2.** Resultados del color desarrollado por las diferentes especies de *Candida* en el medio CromoCen CND-C.

CromoCen CND-C							
	Color de las colonias						
Especies	V	VA	A	BL	BR	RC	RV
<i>C. albicans</i> (n=41)	19	21	1	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (n=5)	0	0	0	1	0	4	0
<i>C. krusei</i> (n=2)	0	0	0	0	2	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (n=2)	0	0	0	2	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (n=1)	0	0	1	0	0	0	0
<i>C. inconspicua</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. lusitaniae</i> (n=1)	0	0	0	1	0	0	0

V: verde; VA: verde-azul; A: azul; BL: blanco lisa; BR: blanco rugosa; RC: rosado claro; RV: rosado vellosa.

Otra especie de interés clínico que ha incrementado su frecuencia en los últimos años, es *C. glabrata*; cuatro de los aislamientos de esta especie presentaron coloración rosada, lo que no coincide con los fabricantes.

Por la metodología convencional se lograron identificar un aislamiento de *C. lusitaniae*, uno de *C. inconspicua* y dos de *C. parapsilosis*. Para estas especies no existen patrones característicos de pigmentación en este medio cromogénico.

La utilización de los medios CHROMagar *Candida* y CromoCen CND-C en el presente estudio, demostró que son confiables particularmente para la identificación de *C. albicans*, que es la especie más patógena y más frecuentemente aislada del género. También resultan de utilidad en la identificación rápida de *C. krusei* y *C. tropicalis*, aunque el número de aislamientos incluidos en este estudio fue muy pequeño. No ocurre lo

mismo con el resto de las especies patógenas, donde es necesario utilizar la metodología convencional (cultivo, formación de tubos germinativos, filamentación en agar harina de maíz, asimilación de carbohidratos u otros sistemas comerciales como las galerías API) como herramienta primaria de identificación.

Lo anteriormente expuesto tiene implicaciones en el tratamiento del paciente, dado que la identificación correcta del agente causal puede modificar la conducta terapéutica, por lo tanto no es posible prescindir del estudio morfológico y eventualmente de otras pruebas complementarias para el diagnóstico específico.

#### **CONCLUSIONES:**

- El medio CromoCen CND-C resultó un medio de gran utilidad para la identificación de *Candida albicans*, resultados similares a los obtenidos en el medio CHROMagar *Candida*.
- También se obtuvieron resultados satisfactorios en la identificación de *C. tropicalis* y *C. krusei*, aunque el número de aislamientos fue pequeño.
- Este medio sería de gran utilidad para la red de laboratorios de microbiología pertenecientes al Ministerio de Salud Pública (MINSAP) y permitiría un importante ahorro de recursos económicos en el proceso de identificación de levaduras, lo que a su vez pudiera tener importantes implicaciones terapéuticas.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS**

- Ballesté R, Z Arteta, N Fernández, C Mier, N Mousqués, B Xavier *et al.* (2005): Evaluación del medio cromógeno CHROMagar *Candida*<sup>TM</sup> para la identificación de levaduras de interés médico. Rev Med Uruguay 21: 186-193.
- Freydière AM, MA Pfaller (1996): Evaluation of CHROMagar *Candida* plates, letters to the editor. J Clin Microbiol 34(8): 2048.

- Hospenthal DR, ML Beckius, KL Floyd, LL Horvath, CK Murray (2006): Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C.krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. Ann Clin Microbiol Antimic 5 (1).
- Lobaina Rodríguez T. Método cromogénico para el cultivo, aislamiento y diferenciación de especies de *Candida* con el empleo del medio CromoCen CND-C. En: Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. (Ed.) Manual de métodos cromogénicos y/o fluorogénicos para el aislamiento, la identificación, el recuento y la diferenciación de diferentes especies de bacterias Gram-negativas, *Enterococcus* y *Candida* en muestras clínicas, veterinarias, de alimentos y aguas con el empleo de los medios CromoCen CC, CromoCen SC, CromoCen AGN, CromoCen ECCS, CromoCen ENT, CromoCen CND-C. BioCen. 2008.
- McGinnisMR. (1980): Laboratory Handbook of Medical Mycology. Academy Press INC. New York. 337-340.
- Odds FC, R Bernaerts (1994): CHROMagar *Candida* a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbial 32: 1923-1929.
- Yücesoy M, S Marol (2003): Performance of CHROMagar *Candida* and BIGGY agar for identification of yeasts species. Ann Clin Microbiol Antimic 2(8): 7.





Lic. Mayda Rosa Perurena Lancha  
 Investigadora Auxiliar  
 Laboratorio de Micología, IPK

Dr. Carlos M. Fernández Andreu  
 Investigador Titular

La Habana, 10 de agosto de 2010