



**Universidad
Norbert Wiener**

UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“RENDIMIENTO DE LA PRUEBA DEL TUBO GERMINATIVO CON ALBUMINA
DE HUEVO EN LA IDENTIFICACIÓN DE *Candida albicans*, 2020”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMIA
PATOLÓGICA.

Presentado por:

AUTORES:

Bach. ARENAS PILLCO, LILIANA VERONICA

Bach. ROSAS PAYTAN, RUTH VICTORIA

ASESOR: MG. ROJAS LEÓN, ROBERTO

LIMA – PERÚ

2020

Dedicatoria:

Le agradezco a Dios, por la vida, salud y sabiduría que nos concede, por ser nuestro guía y luz en este largo camino.

A mis padres Alipio y Agustina, por haberme brindado el apoyo incondicional y moral, por ser los promotores principales de mi anhelo al querer formarme como profesional, por los consejos y valores inculcados y por el amor infinito que me brindan.

A mi novio, compañero y confidente, que me ha dado las fuerzas necesarias para no perder el rumbo de mi destino, gracias Bruno, mi amor.

Liliana Arenas Pillco.

Le agradezco a Dios por sobre todas las cosas, por ser mi motor para impulsarme en este camino, por las personas que coloco en mi vida, por mis padres, por Orlando y sobre todo por mi hijo Jhosaq.

Ruth Victoria Rosas Paytan.

Agradecimientos para:

El Lic. TM. Enrique Fuentes Vera, por brindarnos su asesoría incondicional, por el apoyo y disponibilidad inmediata.

Nuestro asesor el Mg. Roberto Rojas León, por la asesoría, por habernos facilitado los recursos necesarios para el desarrollo de nuestro tema.

Al Dr. Javier Navarrete y el Mg. Gabriel Cabrejos por brindarnos asesoría y guía para el estudio.

La Universidad Norbert Wiener, nuestra alma mater, por habernos brindado los conocimientos necesarios durante este largo proceso en nuestra vida profesional y por las prestaciones brindadas en el desarrollo de nuestra tesis.

ASESOR DE TESIS

Magister Tecnólogo Medico en Laboratorio Clínico y Anatomía patológica

Roberto Rojas León

Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de Salud del Niño

Ministerio de Salud, Lima

JURADO

PRESIDENTE: Dr. Benites Azabache, Juan Carlos

SECRETARIO: Mg. Víctor Raúl Huamán Cárdenas

VOCAL: Mg. Sandoval Vegas, Miguel Hernán

ÍNDICE

1. EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	13
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	15
1.3. JUSTIFICACIÓN	16
1.4. OBJETIVOS	17
1.4.1. General	17
1.4.2. Específicos	17

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES	18
2.2. BASE TEÓRICA	26
2.3. TERMINOLOGÍA BÁSICA	52
2.4. HIPÓTESIS	54
2.5. VARIABLES E INDICADORES	54

3. DISEÑO Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	55
3.2. ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN	55
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	56
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	56
3.5. PLAN DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	58
3.6. ASPECTOS ÉTICOS	59

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADO	60
4.2. DISCUSIÓN	65

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIÓN	69
5.2 RECOMENDACIONES	70

REFERENCIAS	72
--------------------	-----------

ANEXOS	77
---------------	-----------

Índice de figuras

Figura N° 1

Porcentaje de aislamientos de las distintas especies de hongos del género *Candida* y otros géneros de levaduras. 27

Figura N° 2

Interacción entre *Candida albicans* y el ser humano 29

Figura N° 3

Formación de biopelículas de *Candida albicans* en estado germinativo 33

Figura N° 4

Polimorfismo en *Candida albicans* 36

Figura N° 5

Tubos germinativos de *Candida albicans* en suero humano. 45

Figura N° 6

Zimograma y Auxonograma del genero *Candida*. 47

Figura N° 7

Cuadro de valoración del Índice de Kappa de Cohen 51

Figura N° 8

Tubos germinativo de *Candida albicans* en suero y albumina de huevo 60

Índice Tablas

Tabla N° 1

Clasificación taxonómica de *Candida albicans* 26

Tabla N° 2

Factores predisponentes de candidiasis 38

Tabla N° 3

Tabla de contingencia 61

Tabla N° 4

Tabla de indicadores de rendimiento 62

Tabla N° 5

Tabla cruzada Albumina de huevo*Sueros Humanos 62

Tabla N° 6

Prueba de chi-cuadrado 63

Tabla N° 7

Medidas simétricas (Índice Kappa de Cohen) 64

Tabla N° 8

Estadística para el cálculo de intervalo de confianza del índice Kappa 64

Resumen

La incidencia de *Candida albicans* ha aumentado en las últimas décadas. Uno de los métodos de identificación de esta levadura es la prueba del tubo germinativo, sin embargo, para su empleo se utiliza suero humano, que a pesar de ser un medio accesible no es bioseguro para el personal de laboratorio. Diversos investigadores realizaron la prueba con albumina de huevo encontrando resultados satisfactorios, sin embargo no midieron el rendimiento de la prueba. El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.

Metodología

Se realizó una investigación cuantitativa, observacional, analítica de corte transversal en el laboratorio de la Universidad Privada Norbert Wiener. Para la prueba se utilizó suero humano y albúmina de huevo de *Gallus gallus domesticus*. Se respetaron los criterios de inclusión y exclusión. Se siguió el protocolo de la guía del INS para la realización de la prueba.

Resultados

En el presente ensayo se emplearon 118 cepas de *Candida albicans* y 12 cepas de *Candida* no *albicans*. La sensibilidad, la especificidad, falsos positivos, falsos negativos y eficiencia fueron: 95.8%, 100%, 0%, 4.2% y de 96.2% respectivamente. El índice Kappa fue de 0.81 calificándola como altamente concordante con el método de referencia.

Conclusiones

Siguiendo los criterios de la SEIMC, se concluye que el rendimiento de la prueba con albumina de huevo es aceptable para la identificación de *Candida albicans*, además es económico, accesible a cualquier centro de salud incluso en niveles de baja complejidad sobretodo seguro para el personal de laboratorio.

Summary

The incidence of *Candida albicans* has increased in recent decades. One of the methods of identification of this yeast is the germination tube test, however, human serum is used for its use, which is a weight of being an accessible medium is not biosafety for laboratory personnel. Several researchers processed the egg albumin test finding satisfactory results, however they did not measure the test performance. The objective of this study was to evaluate the performance of the germinative tube test with egg albumin in the identification of *Candida albicans*.

Methodology

A quantitative, observational, cross-sectional analytical research was conducted in the laboratory of the Norbert Wiener Private University. Human serum and egg albumin from *Gallus gallus domesticus* are used for the test. The inclusion and exclusion criteria were respected. Follow the protocol of the INS guide for the test.

Results

In the present trial 118 strains of *Candida albicans* and 12 strains of *Candida non albicans* were used. The sensitivity, specificity, false positives, false negatives and efficiency were: 95.8%, 100%, 0%, 4.2% and 96.2% respectively. The Kappa index was 0.81 qualifying as highly concordant with the reference method.

Conclusions

Following the criteria of the SEIMC, it is concluded that the performance of the test with egg albumin is acceptable for the identification of *Candida albicans*, it is also economical, accessible to any health center even at low complexity levels especially safe for staff of laboratory

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1. 1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Durante las últimas tres décadas las infecciones fúngicas han aumentado de 3 a 20 veces alcanzando cifras significativas y alarmantes¹⁻⁵; siendo la gran mayoría de las micosis ocasionadas por levaduras del género *Candida*. Este microorganismo es un componente de la flora habitual, pero en condiciones predisponentes en el huésped como: inmunodeficiencias, tratamiento con antibióticos por periodos largos, trasplantes, embarazos entre otros; suelen ser causantes de infecciones que van desde superficiales hasta sistémicas⁴⁻⁷. La especie que se aísla con una frecuencia del 40 al 85% es *Candida albicans*⁶. En el aislamiento primario de estas levaduras se utiliza el medio agar Sabouraud al 2%; entre las pruebas usadas para su identificación se encuentra el medio CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Microbiology, Francia), pruebas bioquímicas, observación de características micromorfológicas en microcultivos, pruebas inmunológicas de aglutinación hasta la genotipificación. Sin embargo, estas pruebas implican un alto costo que en laboratorios de países en desarrollo es una limitante en su identificación^{6, 7, 8}.

La prueba del tubo germinativo permite identificar de forma preliminar *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* de las demás especies; esta prueba se realiza en un tubo que contiene 0.5 ml de suero humano^{6, 7, 9-11}. Diversos investigadores han evaluado la formación del tubo germinativo en otros tipos de medios como: agares, caldos, suero no humano u otros sustratos, ya que el suero humano por lo general procede de pacientes que acuden al laboratorio, pero no se sabe en qué condiciones o infecciones pueden haber contraído; haciéndolo un medio inseguro para el personal de laboratorio¹²⁻²³. En el estudio realizado por Moya se utilizó

plasma humano derivado del servicio de Banco de Sangre, el cual es un medio más seguro, sin embargo, no todos los laboratorios cuentan con el servicio de banco de sangre²⁴, además diversos estudios señalan que existe riesgo de infección aun de las unidades tamizadas como aptas.²⁵⁻²⁷

Dentro de las investigaciones realizadas con medios diferentes al suero humano; están los realizados por Buckley, Andleigh, Mila y más reciente Araujo sobre la formación del tubo germinativo en albumina de huevo, sin embargo, dichos estudios no han evaluado el rendimiento ni la validez de este medio alternativo.

En nuestro país y en países en desarrollo; hay muchas limitaciones en los servicios de salud, además la prevalencia de infecciones y resistencia anti fúngica han aumentado; por ello el diagnóstico micológico de candidiasis requiere métodos económicos, accesibles y confiables. Por las razones mencionadas se requiere buscar encontrar nuevas metodologías o modificar los métodos tradicionales, a fin que cumplan con las características mencionadas y sobre todo ser seguras para el profesional Tecnólogo Médico del Laboratorio Clínico. El uso de un medio inductor alternativo como la albúmina de huevo podría representar una alternativa aceptable, pero como a todo método que es modificado, se debe evaluar el rendimiento en comparación con el método de referencia, antes de ser usado en el laboratorio para fin diagnóstico. Por la importancia del tema se formuló el siguiente problema de investigación.

1. 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Pregunta general:

¿Cuál será el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*, 2020?

1.2.2 Preguntas específicas:

1. ¿Qué sensibilidad tendrá la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*?
2. ¿Qué especificidad tendrá la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*?
3. ¿Cuál será el porcentaje de falsos positivos de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*?
4. ¿Cuál será el porcentaje de falsos negativos de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*?
5. ¿Cuál será la eficiencia de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*?
6. ¿Existirá concordancia entre el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en comparación al rendimiento de la prueba del tubo germinativo con suero humano en la identificación de *Candida albicans*?

1. 3 JUSTIFICACIÓN

El incremento de candidiasis dentro y fuera de los nosocomios del Estado, así como el aumento de la resistencia antifúngica, requiere la identificación rápida, certera y reproducible de *Candida albicans*. Existen técnicas en la actualidad que permiten la identificación de *Candida albicans*, aunque, un gran porcentaje de estas técnicas, no son muy accesibles, ya sea por los equipos requeridos, costos elevados o periodos largos de tiempo; imposibilitando su uso en la rutina del laboratorio. Ante esta problemática se requiere evaluar métodos de identificación más accesibles, económicos, confiables y que además proporcione mayor bioseguridad para el personal de laboratorio.

La prueba del tubo germinativo es una técnica de uso común en los laboratorios, pero este se realiza con suero humano, sin embargo, este medio a pesar de ser accesible presenta la desventaja de no ser bioseguro. En el caso de plasma humano procedente de banco de sangre, es una alternativa con mayor bioseguridad, ya que se le realiza el tamizaje para las principales infecciones antes de ser considerado apto para su uso, sin embargo, no todos los laboratorios cuentan con el servicio de banco de sangre, haciéndolo un medio menos accesible. Ante esta situación; la albumina de huevo como medio inductor alternativo al suero o plasma humano podría ser una herramienta más al alcance de cualquier laboratorio en la identificación de *Candida albicans*, presentando la ventaja de ser más accesible, económico y sobre todo presentar mayor seguridad al personal de laboratorio; sin embargo, es necesario evaluar el rendimiento de la prueba en comparación con el método de referencia antes de ser usada. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*, 2020.

1.4 OBJETIVOS

1. 4.1 General

Evaluar el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.

1. .4.2 Específicos

- ✓ Calcular la sensibilidad de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.
- ✓ Calcular la especificidad de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.
- ✓ Calcular el porcentaje de falsos positivos de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.
- ✓ Calcular el porcentaje de falsos negativos de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.
- ✓ Calcular la eficiencia de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans*.
- ✓ Calificar el nivel de concordancia de la albumina de huevo en comparación al rendimiento del suero humano en la prueba del tubo germinativo en la identificación de *Candida albicans*.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2. 1 ANTECEDENTES

Moya (2016) Realizó una investigación cuyo objetivo fue hacer una comparación entre el suero y plasma humano como medios inductores para el desarrollo del tubo germinativo en *Candida albicans*. Incluyó un total de 150 ensayos en su estudio, donde verificó la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN que fueron de 100%, 99.3%, 99.3% y 100% respectivamente. Concluyó que el plasma humano es un medio ideal para la filamentación micótica de *Candida albicans*, al tener alta especificidad, sensibilidad y exactitud. Demostró que el uso de plasma humano representa una modalidad adicional de la prueba, seguro y fácil de conseguir proveniente de fraccionamiento de los Bancos de Sangre y Centros de Hemoterapia.²⁴

Atalay A, et al. (2016) Compararon una serie diferente de sueros para realizar la técnica del tubo germinativo, estos fueron: suero bovino fetal, suero de caballo, suero de conejo y suero humano contrastando los resultados con el agar Mueller-Hinton (MHA). Incluyeron en el estudio un total de cincuenta muestras clínicas previamente identificadas como *Candida albicans* por métodos convencionales y por estudios moleculares. Desarrollaron la técnica del tubo germinal de manera tradicional. Realizaron la lectura a los 30, 60, 120 y 180 min. Incluyeron criterios de puntuación para calificar como positiva o negativa la prueba. Efectuaron los resultados estadísticos y concluyeron que los mejores resultados se habían obtenido con el Agar Muller Hinton seguido de los resultados obtenidos con suero de conejo, caballo y bovino fetal, respectivamente. El tiempo de lectura eficaz se realizó a las 3 horas. Finalmente concluyeron que el MHA es un medio apropiado, económico y confiable para el diagnóstico probable de *Candida albicans*; sin embargo, todavía se requieren estudios complementarios para definir otras especies de *Candida*.¹²

Souza A, et al. (2014) Realizaron la comparación de cuatro sustratos diferentes para realizar la prueba del tubo germinativo. Se incluyeron un total de 160 muestras: 135 de *Candida albicans*, 24 *C. tropicalis* y 1 *C. dubliniensis*, todas ellas identificadas previamente por un sistema manual. Realizaron la prueba del tubo germinativo con suero fresco congelado, caldo y agar Mueller-Hinton (MH). Los resultados obtenidos fueron: 96%, 94%, 92 y 90% con el suero fresco, suero congelado, Agar Muller- Hinton y caldo Muller- Hinton respectivamente. La sensibilidad de cada prueba fue mayor al 90%, con una especificidad del 100%. Tanto el agar MH como el caldo permitieron identificar los verdaderos positivos y no se encontraron falsos positivos. Sin embargo, algunos aislamientos de *Candida albicans* no fueron identificados. Los autores concluyeron que tanto el agar como el caldo MH se pueden utilizar en el laboratorio para la identificación presuntiva de *Candida albicans* y sirve como un medio de inducción óptimo para la prueba del tubo germinativo.¹³

Raghunat P, et al. (2014) Evaluaron tres medios diferentes libres de suero para la formación del tubo germinativo en *Candida albicans* y los compararon con el suero humano combinado. Los medios inductores fueron: solución de sacarosa, solución de almidón y la solución sacarosa con leche desnatada y tween 80 (caldo SST), utilizaron 50 ensayos en el estudio. Los resultados fueron: 94%, 98%, 80% y 72% para la mezcla de sueros humanos, el caldo SST, la solución de sacarosa y la solución de almidón respectivamente. Esta investigación reporta que el caldo SST es un nuevo medio de inducción para el desarrollo del tubo germinativo en *Candida albicans*, con las características ideales para poder ser usado rutinariamente en el laboratorio, ya que es un medio estable, menos costoso, además que presenta la ventaja de ahorrar tiempo en su preparación y por no representa un problema de

bioseguridad para el personal de laboratorio. Finalmente concluyeron que el caldo SST es un medio más eficaz en comparación con el suero humano combinado para la inducción del tubo germinativo en *Candida albicans*.¹⁴

Deorukhkar S, Saini S, Jadhav P. (2012) Realizaron un estudio donde evaluaron diferentes medios para la identificación de *Candida albicans* mediante la prueba del tubo germinativo. Utilizaron 132 muestras de *Candida albicans* y 30 muestras de *Candida dubliniensis*. En el estudio se evaluaron diferentes medios como: suero de caballo, suero humano agrupado, plasma humano, caldo tripticasa de soya, clara de huevo y agua peptonada. Los resultados positivos para *Candida albicans* fueron: 94,8% en el caldo tripticasa de soya, 94% en suero humano agrupado y suero de caballo, y 50% en clara de huevo y agua peptonada. Para *Candida dubliniensis* los resultados positivos fueron: 90% en caldo tripticasa de soya y suero humano agrupado, y 86,6% en suero de caballo.

Este estudio refiere que el caldo tripticasa de soya sirve como un medio inductor para la formación del tubo germinativo en la identificación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, a diferencia de los demás medios estudiados. Concluyeron que el caldo triticasa de soya fue el medio más estable, menos costoso y más seguro que los otros medios.¹⁵

Rimek D, Fehse B, Göpel, P. (2008). Realizaron un estudio donde evaluaron el agar Mueller-Hinton (agar MH) como medio alternativo para la formación de tubos germinativos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. La muestra la representó un total de 859 ensayos 632 cepas de *C. albicans*, 10 *C. dubliniensis* y 217 levaduras diferentes especies, todas fueron previamente identificadas por métodos estandarizados. Los resultados fueron positivos en 578 de las 632 cepas de *C.*

albicans demostrando una sensibilidad de 91,5%, en seis de 10 cepas de *C. dubliniensis* con una sensibilidad 60,0% y en ninguna de las otras cepas de levadura. Este estudio determinó que el agar Muller-Hinton es un medio adecuado para la producción del tubo germinativo y la identificación presuntiva de *C. albicans*. Concluyeron que el Agar MH es un medio que está disponible en cualquier laboratorio de microbiología y presenta la ventaja de ser más seguro de usar que el suero humano.¹⁶

Duarte A, et al. (2009) Realizaron un estudio donde se describen las modalidades de realizar la prueba del tubo germinativo, y se incluye una nueva modalidad realizada por la Lic. Celina Araujo. La modalidad descrita consiste en realizar la prueba del tubo germinativo de manera tradicional con una gota de suero, o en su defecto una gota de albúmina de huevo e incubarla a 37°C por 2 horas, la diferencia con la técnica tradicional es el reemplazo de los tubos por láminas y laminillas. Esta modalidad presenta la ventaja del ahorro del material de vidrio y suero.¹⁷

Hilmioglu S, et al. (2007) Compararon 12 medios líquidos diferentes para desarrollar tubos germinativos en *Candida albicans* a las 2h, 2.5h, 3h y 4h. Estudiaron 193 ensayos; 157 de *Candida albicans* y 36 de *Candida dubliniensis*, los resultados fueron positivos para: 81.3% *Candida albicans* y 18.7% de *Candida tropicalis*. La producción de tubos germinales de *Candida albicans* se observó principalmente en suero humano (98%) seguido de suero de conejo (89.8%), caldo de infusión cerebro-corazón (84%) y suero de oveja (74.5%) a las 2h de lectura. Determinaron que un tiempo de incubación superior a las 2h puede producir tubos germinativos positivos en *C. tropicalis*. La sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para la producción de suero germinativo de suero humano a las 2 h fueron del 98%, 100%, 100% y 92,3%,

respectivamente. En todos los sueros analizados, un período de incubación mayor a las 2 horas mejora la sensibilidad, pero disminuye la especificidad, así como el VPP y el VPN. Finalmente concluyeron que el suero humano era el medio más apropiado para la prueba del tubo germinativo con un período de incubación de 2 h.¹⁸

Mendez R. (1996) Realizó un estudio donde evaluó el efecto de diferentes carbohidratos sobre la formación del tubo germinativo en *Candida albicans*. Los carbohidratos estudiados fueron: galactosa, sacarosa, fructuosa, inulina, glucosa, dulcitol, maltosa, trehalosa, inositol, almidón, ribosa, rafinosa, lactosa, xilosa y l-rhamnosa. Este estudio demostró que los carbohidratos más efectivos en la producción del tubo germinativo fueron: galactosa, fructuosa y sacarosa. Los carbohidratos que indujeron medianamente la formación del tubo germinal fueron: inulina, glucosa, dulcitol, maltosa, trehalosa, inositol y almidón. Sin embargo, hubieron carbohidratos como: ribosa, rafinosa, lactosa, xilosa y l-rhamnosa, que no tuvieron ningún efecto en la formación del tubo germinativo.¹⁹

Jitsurong S, et al. (1993) Realizaron el estudio de un nuevo medio para la producción tanto de tubo germinativo como de clamidoconidias, el mismo que estaba hecho a base de leche UHT, tween 80 y agar. Incluyeron un total de 172 muestras clínicas: 112 *C. albicans*, 4 *C. guilliermondii*, 3 *C. krusei*, 16 *C. parasilopsis*, 28 *C. tropicalis*, 6 *Torulopsis glabrata* y 3 *Trichosporon beigellii*. El estudio se comparó con el método estándar en suero y el medio convencional agar harina de maíz con tween 80. En este estudio se demostró un porcentaje de 98.2% para la producción de tubos germinativos por *C. albicans* en contraste con el estándar en suero que presentó solo 90.2%. Asimismo, se encontró que *C. albicans* podía producir un porcentaje de 95,5% para la producción de

clamidoconidia luego de 48 horas de incubación en comparación con el medio convencional agar harina de maíz con tween 80 que solo presentó un 21.4%. Finalmente demostraron que el nuevo medio proporciona un alto porcentaje en el desarrollo del tubo germinativo y una abundancia significativa en la producción de clamidodoconidias.²⁰

Mila L, et al (1986) Realizaron un estudio descriptivo sobre el desarrollo del tubo germinativo en albumina de huevo midiendo tiempo y temperaturas distintas. Observaron que solo *Candida albicans* es capaz de formar verdaderos tubos germinativos en albumina de huevo a diferencia de las otras especies que desarrollaron tubos germinativos con constricción en su base. Este estudio demuestra la ventaja del tiempo, ya que no hubo diferencias entre los 30, 60 y 90 minutos de lectura. Concluyeron que la albumina de huevo es un medio inductor útil para la formación del tubo germinativo.²¹

Andleigh H. (1964). Estudio, con 12 cepas de *Candida albicans*, la formación de tubos germinativos basados en los estudios de Mackenzie, Taschdjian. Buckley y Van. Los primeros informaron sobre la formación de tubos germinativos en suero en un tubo a 37⁰ C por 2 a 4 horas, concluyendo que este método permite la identificación rápida presuntiva de *Candida albicans*. El autor se basó en los estudios de Buckley y Van que modificaron la prueba cambiando el suero por una gota de albumina sobre una lámina al cual le agregan una porción de cepa y colocan una laminilla observándola a las 2 horas, calificando el medio como óptima para dicha prueba. Andleigh comparo los 2 medios con los métodos mencionados es decir uso: suero con el método en tubo, suero con el método de lámina y laminilla, albumina con el método en tubo y albumina con el método entre lámina y laminilla. El autor observo que el método de suero en tubo dio resultados desde los 30

minutos y a las 2 horas fue el que tuvo mayor filamentación. El método de albumina en tubo también dio resultados satisfactorios. El método en lámina aparecieron a los 40 a 60 minutos, pero en menor cantidad, sobre todo en albumina, mientras que el método de albumina en lámina produjo resultados pobres siendo solo el 50 a 60% de los ensayos positivos a diferencia del método de suero en tubo que fue 100%. Concluyendo que el método de albumina en tubo produce resultados tan útiles como el método de suero en tubo, pero con mayor accesibilidad que el suero humano o animal²².

Buckley H, Van U. (1963) Realizaron un estudio cuyo objetivo fue observar el desarrollo del tubo germinativo en albumina de huevo con 56 diferentes especies de *Candida* con un total de 211 cepas. En el estudio mezclaron una porción de levaduras de las cepas estudiadas en una gota de albumina de huevo directo en un portaobjetos, incubándolo a 37°C, observando que las 122 cepas que pertenecían a *Candida albicans* y 5 a *Candida stellatoidea* dieron positivos a la prueba, mientras que el resto de cepas que pertenecían a otras especies dieron resultados negativos. Concluyendo que la albumina de huevo es un medio apto para desarrollo de tubo germinativo presentando además la ventaja de producir los tubos germinales a los 30 minutos.²³

Mackenzie D. (1962). Realizó un estudio acerca de los factores que afectan la formación del tubo germinativo por parte de *Candida albicans* en suero humano. Se ensayó con 163 cepas, de *Candida albicans* confirmadas por la producción de clamidosporas, también se emplearon cepas de otras especies de levaduras. Se observó que hay formación de filamentación con suero fresco, inactivado e incluso congelado a excepción de suero coagulado por calor. A mayor edad del inóculo disminuye la formación del tubo germinal. La concentración del inóculo debe ser

como máximo $6-4 \times 10^7$ por ml ya que a mayor concentración; hay disminución o inhibición de la formación del tubo germinativo. La temperatura adecuada es de 31 a 41 °C, mientras que el tiempo de incubación es entre 2 a 3 horas. Concluyendo que la prueba del tubo germinativo permite el diagnóstico rápido de *Candida albicans*, sin embargo, se encontró que un 5% de ellas es negativos a esta prueba⁹.

Taschdjian C, et al. (1960) Realizaron una investigación experimental sobre la el fenómeno observado por Reynold y Braun. Taschdjian et al ensayaron con medios de inducción como: suero o plasma humano y medios sintéticos derivados del suero. En el estudio observaron que *C. albicans* y *C. Stellatoidea* formaban la filamentación a partir de los 90 min a 4 horas después de ser incubados en baño maría a 37°C.

Los autores concluyeron que solo *C. albicans* y *C. Stellatoidea* desarrollaban filamentación, mientras que las demás especies ensayadas; no lo formaban. Ellos propusieron que esta prueba se utilice para diferenciar estas especies de *Candida* de las demás.

2. 2 BASE TEÓRICA

Candidiasis

La candidiasis es una infección a nivel cosmopolita producida por diferentes especies del género *Candida*, cuyo habitat es habitualmente es el ser humano

y animales, sin embargo, para que se produzca la infección tiene que haber un desequilibrio en las relaciones con su hospedero como: enfermedades o procesos debilitantes, inmunodeficiencia primarias o adquiridas, factores iatrogénicos, terapia antibiótica de amplio espectro por largo tiempo , aumento de la tecnología como trasplantes ,terapias inmunosupresoras u otros. Además, las especies oportunistas deben cumplir ciertas condiciones como: desarrollarse a 37°C, adaptabilidad al medio, cambio morfológico y poseer factores de virulencia, entre otros^{6, 7,28}

Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Candida* puede observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Candida albicans*⁶

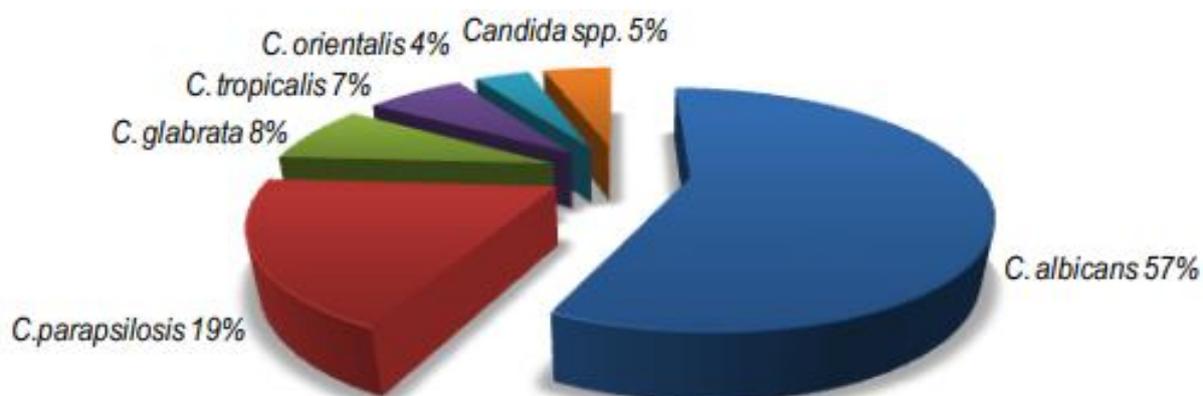
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Ascomycotina
Clase	Ascomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	<i>Candida</i>

Epidemiología

Las micosis son infecciones frecuentes y se da a nivel cosmopolita, se ha observado un aumento de 3 a 20 veces desde la década del 70, de ellas el 80 % es causada por *Candida*. Este género incluye aproximadamente a 200 especies,

de ellas solo 58 especies son patógenas oportunistas principalmente *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida dublinensis* ⁶.

Figura 1. Porcentaje de aislamientos de agentes etiológicos de Candidiasis³¹.



Según diversos estudios *Candida albicans* produce el 40 a 85% de las infecciones, aunque en los últimos años el porcentaje de infecciones producidas por *Candida* no albicans se está incrementando.^{1-7,29-30} *Candida* afecta a individuos de cualquier edad, sin importar sexo o condición socioeconómica. Al ser componente de la flora humana y tiene predilección por las mucosas como el tracto gastrointestinal, vagina, piel periorificial, de personas sanas, provocando infecciones en el 30 a 75% de embarazadas, llegando a causar el 20 a 30% de enfermedades ginecológicas 50 % de ellos en mujeres de 20 a 30 años ^{6,7}. *Candida* también ha sido reportado como causante del 4 a 18% de infecciones en recién nacidos, sobretodo en bebe prematuros menores de 1500 g, es el factor etiológico del 11.6% de septicemias y la mortalidad de esas infecciones es de 31.7% ^{29,30}.

En los pacientes con SIDA provocan el 80 a 90 % de infecciones sistemas y profundas⁷.

Candida afecta principalmente a adultos mayores de 65 años, neonatos pacientes con enfermedades cardiacas, VIH, ingresados en UCI, pacientes con tratamientos inmunodepresores, quimioterapia entre otros^{6, 29,30}.

Candida albicans

Candida albicans es una levadura unicelular que no presenta estado teleomorfo, es decir se reproduce de forma vegetativa por blastoconidios ^{6,7}. Las infecciones causadas por *Candida albicans* han sido descritas desde Hipócrates con diferentes nombres como muguet, moniliasis, algodoncillo. Robin la llamo primero como *oidium albicans*, Wilhelm como *Monilia albicans*, en 1923 Christie la transfirió al género *Candida*.⁷ Esta especie es un componente de la flora humana y animal, pero se comporta como un patógeno oportunista en mamíferos, produciendo desde infecciones superficiales, hasta enfermedades sistémicas que ponen en riesgo la vida del hospedero, sobre todo en personas inmunocomprometidas. *Candida albicans* posee factores de virulencia que le permite adherirse y formar biopelículas proporcionando mayor resistencia a antifúngicos.^{6, 7, 28,31}.

Patogenicidad de *Candida albicans*

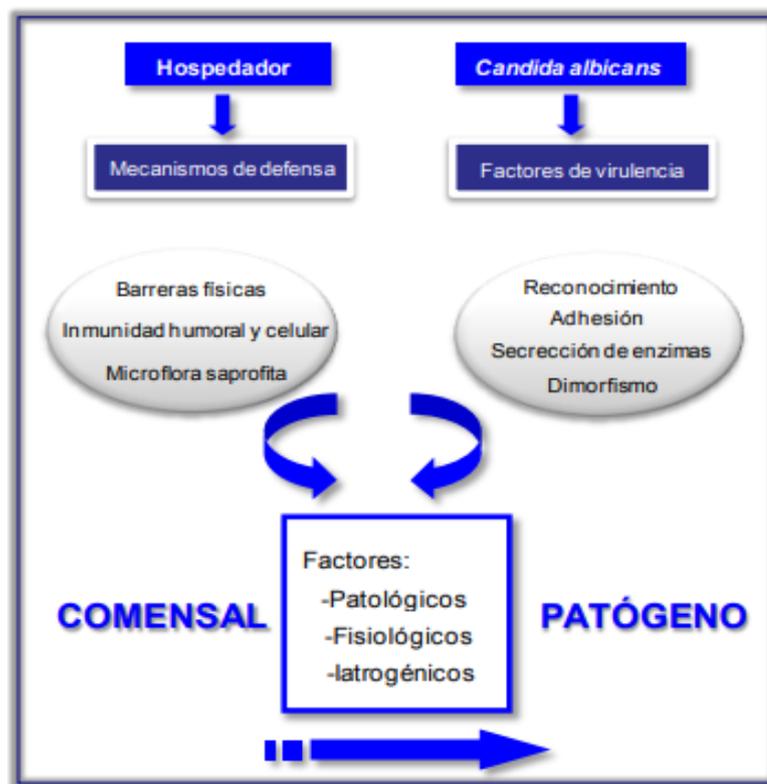
Candida albicans es una levadura que forma parte del microbiota humana y animal, sin embargo, se convierte en patógeno cuando hay una alteración del equilibrio natural entre ellos. Otra situación en la que se desarrolla es el ingreso masivo de levaduras por cateterismo o vías endovenosas como podría ser en el caso de

hospitalizados en cuidados intensivos de larga estancia o los que se inyectan drogas.^{6, 7}

Condiciones del huésped:

Candida tiene la capacidad de vivir a la temperatura corporal como al medio ambiente, puede adaptarse al pH, para ello realiza cambios morfológicos y bioquímicos, además posee factores de virulencia como secreción de proteasas, hialuronidasas capacidad de adherencia y producción de biofilms.^{6, 3}

Figura 2. Interacción entre *Candida albicans* y el ser humano.³¹



Condiciones
hospedero: Las

del

alteraciones de parte del huésped son principalmente:

- inmunodeficiencias primarias o adquiridas como: pacientes con leucemias, pacientes con VIH;
- Enfermedades o procesos debilitantes como tuberculosis, diabetes, etc

- Factores iatrogénicos: tratamiento por periodos prolongados de antibióticos de amplio espectro, corticoesteroides, etc.
- Trasplantes, cateterismo, nutrición parenteral, etc.
- Otros: drogadicción, quemaduras severas, prótesis traumatismos etc.

Factores de virulencia de *Candida albicans*

La capacidad patógena de *Cándida* está determinada principalmente por el estado inmunológico del hospedador, sin embargo, *Candida* posee factores de virulencia que les permite evitar las respuestas inmunitarias del hospedador, ellos se van a expresar de acuerdo a la fase evolutiva de la infección, ya sea en etapa de colonización o en la fase infectiva.^{6,7,31}

Entre esos factores de virulencia se encuentran principalmente: síntesis de receptores o moléculas que les permite la adhesión a tejidos o catéteres, las enzimas hidrolíticas, capacidad de variabilidad antigénica, cambios fenotípicos que realiza en determinadas situaciones y el polimorfismo.³¹⁻³⁹

1. Adhesión

Son manoproteínas localizadas en la superficie de la pared celular, se han descrito hasta 8 proteínas en *Candida albicans*, ellas tienen como función la adhesión al epitelio, agregación, colonización e infección y formación de biofilms.³²

Esas proteínas actúan como receptores de ligandos específicos del hospedador con proteínas de la matriz celular y moléculas de superficie de las células epiteliales y endoteliales. Están codificadas por 8 familias de genes ALS (Agglutinin-like sequencial), ellos codifican glicoproteínas de superficie celular y son: Als1p, Als2p,

Als3p, Als4p, Als5p, Als6p, Als7p y Als8p. Estas proteínas también cumplen un rol en el apareamiento de células haploides. Estudios revelan que la glicoproteína Als1p contiene proteínas que cumplen una importante función para la adherencia de células de mamíferos. Otro de los genes importantes es el Gen ALAI (Agglutinin-like adhesin) que confiere adherencia a proteínas de matriz extracelular uniéndose a fibronectina, laminina y colágeno tipo IV. Hay moléculas superficiales de las levaduras que interaccionan con los componentes del sistema inmunitario del hospedador como plaquetas o proteínas séricas usándolas para recubrirse y evitar los sistemas de defensa del hospedador.^{31, 33}

2. Secreción de enzimas hidrolíticas:

Candida posee una familia de 10 proteínas Sap (aspartil proteasas), cuando estas enzimas se elevan; aumentan la virulencia de *Candida*, degradando proteínas y sustratos específicos. El aumento de la virulencia son asociadas con producción de proteínas Sap durante la infección.³¹ La proteasas extracelulares cumplen la función de causar lisis de la capa mucosa que recubre la superficie de las células y facilitando así la invasión de tejidos al degradar componentes celulares como la queratina, el colágeno, la laminina y la fibronectina.³¹

Para Naglik estas proteínas permiten la digestión de moléculas para su nutrición, degradan membranas celulares facilitando la adhesión e invasión de tejidos y mucosas, además realizan la digestión de células y moléculas del sistema de defensa del hospedero para evadir o resistir dichos mecanismos, incluso confieren resistencia a la fagocitosis causando la muerte de las células fagocíticas. La actividad de estas enzimas es mayor en los estadios iniciales de la infección.³⁴⁻³⁵

3. Fosfolipasas celulares:

Candida secreta fosfolipasa A, B, C, D1, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa ante situaciones de estrés ³¹. Salas en su estudio encontró un incremento de actividad de fosfolipasa incrementada en cepas provenientes de líquidos corporales ,esputo y aspirados bronquialveolares, mientras que en muestras provenientes de candidiasis superficiales la actividad fosfolipasa era baja, indicando una correlación entre actividad fosfolipasa y virulencia de dichas cepas.³⁶

4. Lipasas (Lip)

Las lipasas permiten la hidrólisis de ésteres de mono-di y triacilgliceroles y son llevados a cabo por una familia de 10 proteínas similares: Lip 1-10. Para Castillo; estas enzimas facilitan la penetración activa de las células participando en la digestión y síntesis de ésteres de lípidos para su propia nutrición así como para la invasión de tejidos al hidrolizar los componentes lipídicos de las membranas celulares de los tejidos; dañando además a las células y moléculas del sistema inmune.^{31, 37}

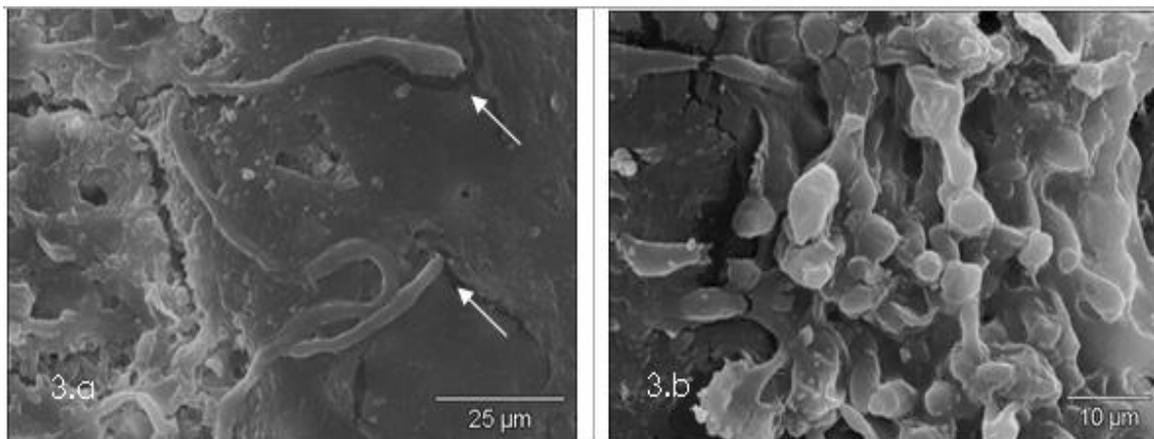
5. Biopelículas

Candida albicans tiene la capacidad de realizar transiciones morfológicas reversibles entre las formas de levadura, pseudomicelios y micelios. Esta capacidad permite a *Candida albicans* la formación de biofilms. Los biofilms se adhieren a dispositivos médicos como catéteres, prótesis marcapasos sondas u otros. Los biofilms están formados por una matriz compuestas por hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fosforo, ácidos nucleicos y agua que le confieren un aspecto gelatinoso a la cual se adhieren las levaduras confiriéndoles mayor resistencia a los tratamientos antifúngicos de amplio espectro, complicando la

infección, incluso favoreciendo la rápida diseminación de los microorganismos, provocando hasta el 40% de mortalidad de este tipo de infecciones.^{31, 32, 38}

Los biofilms difieren en su contenido de la matriz de acuerdo a la superficie en la que se desarrolla (superficies celulares, superficies inertes)³¹.

Figura 3. Biopelículas formadas por *Candida albicans* en estado germinativo.³⁹



6. Variaciones fenotípicas:

Algunas cepas de *Candida albicans* tiene la capacidad de realizar variaciones o switching fenotípicas que les permite sobrevivir en condiciones ambientales al inicio de la infección permitiéndoles evadir los sistemas de defensa del hospedador³¹. Esta capacidad se expresa en la morfología colonial conocida como fase blanca caracterizada por colonias blancas redondas en forma de cúpula, a nivel microscópico son células redondas, que cambian a la fase opaca a células alargadas donde las colonias son más oscuras, alargadas y planas. A nivel fisiológico estos cambios aumentan la adhesividad, secreción de proteasas,

sensibilidad a neutrófilos, contenido lipídico, aumenta la resistencia a anti fúngicos y la capacidad de asimilación de diferentes fuentes de carbono.⁴⁰

Esta capacidad es determinada por el locus MTL, que le permite realizar este proceso de conjugación en condiciones de anaerobiosis en cepas homocigotas para dicho gen³².

7. Hidrofobicidad de la superficie celular:

La pared celular de *Candida albicans* es compleja y variable según las condiciones medioambientales, una característica que poseen es la hidrofobicidad que les permite adherirse a las superficies celulares o de los dispositivos médicos.³² Esa adherencia se produce por medio de enlaces electrostáticos a superficies de poliestireno de prótesis, catéteres y dispositivos médicos.⁴¹ Estudios indican que las hifas poseen mayor hidrofobicidad que las levaduras ya que contienen una alta composición en proteínas hidrofóbicas que se encuentran en la capa fibrilar de la pared celular, otorgándoles mayor adherencia a superficies celulares o dispositivos médicos.^{32,33} Esto es posible ya que la pared celular de los hongos que se encarga de protegerlos de su medio externo, también es capaz de resistir la presión de turgencia del protoplasto evitando la lisis en condiciones de descenso de osmolaridad. Cuando se forma el tubo germinativo; la capa interna de la pared celular se enriquece con una capa interna transparente de electrones ricos en quitina.

8. Polimorfismo:

Candida puede cambiar su morfología pasando del estado de levaduras a micelio, este proceso es reversible, sin embargo para que ocurran estos cambios; (también llamado transición dimórfica) influyen factores nutricionales y ambientales como:

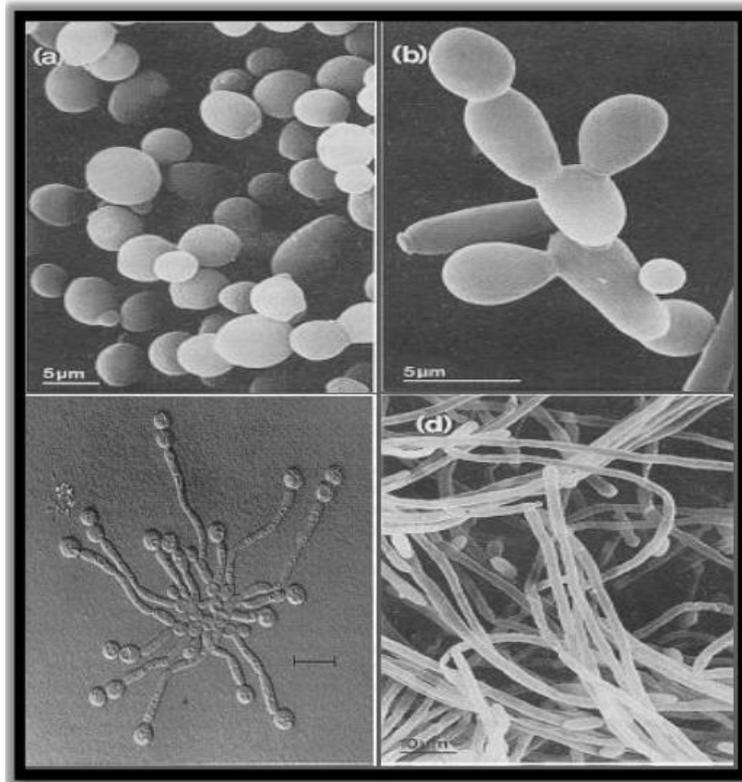
pH, temperatura, presencia de aminoácidos, suero entre otros. Para Gaur la capacidad de *Candida albicans* de formar tubos germinativos; aumenta la patogenicidad ya que estas estructuras son as hidrofóbicas y tiene mayor adherencia para penetrar los epitelios. *Candida* puede cambiar a este estado incluso dentro de un macrófago provocando la muerte de este; además en ese estado presentan tigmotropismo; que es la capacidad de reconocer oquedades e incisiones tisulares que permiten invadirlas rápidamente.^{31, 33}

Otra morfología que presenta *Candida albicans* es la formación de clamidosporas que son formas esféricas con doble membrada acompañada se pseudohifas, esta morfología aparece en condiciones desfavorables, para el microorganismo, como estaciones secas, medios pobres en nutrientes, etc.⁷

La variación morfológica que puede realizar estos microorganismos, les permite desarrollarse en diversos ambientes, ya sea de forma comensal o patogénica⁴⁰.

Figura N° 4: Polimorfismo en *Candida albicans*; tomado de Laforet ³¹:

a) blastoconidios, b) pseudomicelios, c) clamidospora ,d) micelio



Proceso de inducción de tubos germinativos:

El proceso de inducción de tubos germinativos y posteriormente hifas consta de 3 fases: En la primera fase; los receptores específicos ubicados en la superficie celular perciben las señales externas. En la segunda fase; se produce la activación de las señales de transducción intracelular produciendo por último los componentes reguladores necesarios para la formación del tubo germinal.³¹

Los factores que inducen estos cambios son temperatura de 37°, pH neutro y crecimiento en medio líquido.³³ Diversos autores han ensayo con diferentes tipos de medios inductores como medios de cultivo, sueros de animales, plasma humano, albumina de huevo, caldos, soluciones de carbohidratos, suero humano entre otros.¹²⁻²⁴ Para Gaur el medio inductor más efectivo es el suero humano³³.

Bases moleculares del Dimorfismo:

La recepción de estímulos externos promueven una expresión génica diferenciada que provoca cambios en la regulación del ciclo celular, cambiando a su vez la estructura de la pared celular y el citoesqueleto hasta darse la transición dimórfica. Esos estímulos son muy variados, por esa razón se postula que existen varias rutas de transducción. En *Candida albicans* no se conocen los receptores que transducen los estímulos externos, pero se conocen proteínas homologas en la ruta de trasmisión de señales en *Saccharomyces cerevisiae*, una de los genes que realiza esa función es el gen SIR2 que se encarga de desactivar regiones del genoma para permitir el cambio morfológico.³¹

Candidiasis

Infecciones producidas por *Candida albicans*

Esta especie se puede encontrar de forma habitual en la flora normal del tracto gastrointestinal, también en la vagina y en la cavidad oral de individuos que aparentan tener buen estado de salud. Una infección por *Candida albicans* se puede producir por una ínfima alteración en la relación de huésped y hospedero, lo que al final podría desencadenar en una infección por parte de hongo.

En la tabla 2 podemos observar el tipo de infección, la presentación de la misma y los factores predisponentes para su desencadenamiento. Del cuadro es importante resaltar que la mayoría de las infecciones se relacionan más a las anomalías presentes en el sistema inmunitario del huésped.^{6, 7}

Los factores mayormente incluidos en la lista fueron menos frecuentes en años anteriores que en la actualidad, lo que explica la elevación en la incidencia de este tipo de infecciones en los últimos años.^{3, 42}

El abuso de los antibióticos, las infecciones por HIV, los tratamientos utilizados en pacientes trasplantados, la quimioterapia, el uso de sondas y catéteres son algunos ejemplos de los factores predisponentes para contraer alguna infección por levaduras como *Candida albicans*.^{26,43}

Tabla 2: Factores predisponentes de candidiasis. Adaptada de Matthews⁴³

Tipo de infección	Presentación de la infección	Factores predisponentes
Superficial	Oral Vaginal Cutánea	Embarazo Antibióticos Diabetes Infección por HIV Alteración en la función de los granulocitos Drogas inmunodepresoras Infancia Vejez Trauma (Prótesis dental)
Candidiasis mucocutánea crónica	Afectaciones superficiales múltiples	Casos familiares Deterioro de la inmunidad que protege la piel y mucosas
Sistémica	Diseminación Afectación de otros órganos	Leucemia aguda Linfoma agudo Quimioterapias Corticosteroides Antibióticos de amplio espectro Transplante de órganos Catéteres intravasculares Quemados severos Cirugía gastrointestinal Adictos a drogas por vía parenteral

Candidiasis superficiales.

Las candidiasis superficiales pueden ser de tipo agudas o crónicas y, según la localización de la infección, se clasifican en candidiasis orofaríngea, vulvovaginitis candidiásica, candidiasis cutánea y candidiasis mucocutánea crónica (CMC).

Candida albicans es capaz de producir una infección limitada, es decir solo afectará una región específica, ello puede ser solo la piel o solo las mucosas; sin embargo se ha observado que esta levadura es capaz de producir una infección diseminada como en el caso de la candidiasis mucocutánea crónica, la misma que puede extenderse a diferentes zonas superficiales sin delimitar un área específica. ⁴⁴

La candidiasis orofaríngea: Esta infección afecta principalmente a los pacientes infectados con VIH, pero también se ha observado que afecta a mujeres que cursan una vulvovaginitis recurrente en etapa fértil.

La candidiasis orofaríngea es también considerada como una de las micosis humanas más asiduas de los últimos años. Esta afectación puede presentarse en personas de distintas edades, sin embargo, por estudios estadísticos se conoce que la infección más frecuente se da en lactantes, geriátricos y portadores de prótesis dentales.

En pacientes que son HIV seropositivos la enfermedad se manifiesta como una afectación clínica mucho más grave, debido a que en esta condición se pueden presentar resistencia a los agentes antifúngicos usados en su tratamiento, adherido a ello la enfermedad progresa de forma más agresiva y severa. ⁴⁵

La candidiasis vulvovaginal frecuentemente se presenta en las mujeres que cursan la etapa reproductiva, sin embargo, con un oportuno tratamiento con azoles desaparecen fácilmente en la mayoría de los casos. No obstante, hay un mínimo porcentaje de mujeres que presentan infecciones recurrentes. Se han señalado

algunos mecanismos como productores de esta enfermedad, pero en muchos casos no se han considerado como importantes. La terapia en estos casos es de vital importancia en la fase aguda de la enfermedad, pero no es eficaz para la supresión de la misma.⁴⁵

Las infecciones mucocutáneas producidas por *Candida albicans* se relacionan con la alteración de las diferentes zonas superficiales, sin embargo no se suelen desencadenar como una infección sistémica o profunda. Esto se asocia principalmente a los desórdenes inmunológicos propios del huésped, que dejan desprotegida la inmunidad superficial y las mucosas.⁴⁶

Candidiasis sistémicas

Conocida como la invasión de tejidos por *Candida albicans*, sin embargo, la principal afectación es la sangre del huésped, lo que desencadena una infección a los demás órganos.

La candidemia por causa de esta levadura es una forma muy frecuente de candidiasis invasiva, el inicio se debe al ingreso de la levadura al torrente sanguíneo por el tracto gastrointestinal, debido a que se encuentra de forma comensal en esta zona, o por la piel del huésped, ya que se encuentra en la microbiota del ser humano. La candidemia es el tipo de infección que durante los últimos años ha causado una morbi-mortalidad significativa y alarmante.⁴⁸

Muchos estudios demostraron que el inicio oportuno y adecuado del tratamiento antifúngico mejora el pronóstico de los pacientes, no obstante, se ha demostrado que aún existen dificultades con las pruebas diagnósticas existentes, esto debido a la baja sensibilidad y el bajo rendimiento que presentan.^{48,49}

Generalmente, la mayoría de las candidiasis sistémicas son causadas por *C. albicans*, sin embargo, muchos estudios demuestran que las infecciones por *C. tropicalis* va en aumento. La incidencia de otras especies, como *C. parapsilopsis*, *C. krusei* y *C. pseudotropicalis* es todavía mínima.

Lamentablemente la realidad es que aún en el siglo XXI, en la era de la digitalización y el avance la información, esta enfermedad muchas veces se diagnostica posteriormente a la muerte del paciente, lo que ha producido que exista un gran empeño en la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico que permitan una identificación más rápida y fiable del agente etiológico.

Muchos estudios moleculares se están aplicando para la identificación de esta especie, el desarrollo de anticuerpos monoclonales que permitan el reconocimiento de antígenos específicos para este género, y el desarrollo de otras técnicas que detectan componentes fúngicos o de la respuesta del paciente al hongo, están permitiendo la aparición de nuevos métodos.^{49,50}

Diagnostico Micológico:

Muestras: Las muestras adecuadas dependerán de los síntomas y signos, estos pueden ser exudados, esputos, escamas raspados de uñas, centrifugados de orina o de líquidos corporales, material purulento o tejidos^{28 51}.

Examen directo: Se realiza generalmente con hidróxido de potasio al 10% (KOH), también pueden ser observadas en tinción Gram Giemsa Wright, azul de metileno, PAS o PAP.⁷

En el examen directo el KOH al 10% disuelve la queratina conservando las estructuras de los organismos fúngicos. El examen se considera positivo cuando

se observa blastoconidios y pseudohifas en racimos denso espaciados a lo largo de las pseudohifas .⁵¹

Cultivo: El cultivo debe realizarse lo más pronto posible para evitar contaminación, generalmente el cultivo se realiza en agar Sabouroaud dextrosa al 2% simple o con cloranfenicol y ciclohexamida, crecen a temperatura ambiente, pero con mayor rapidez a 37⁰ C en 24 a 48 horas; obteniendo colonias lisas cremosas, poco elevadas, brillantes de color blanco o beige^{6, 7,51}.

Al examen directo se observará levaduras unicelulares esféricos ovoides de 2 a 4 um, con gemas, pseudomicelio, en algunas ocasiones presencia de filamento⁷.

Producción de Clamidosporas:

Hasta la década de los años 70 la identificación de *Candida albicans*, una vez aislado de las muestras en agar sabouroaud, requería de la observación de clamidosporas, que son la forma de resistencia frente a situaciones de inanición. Esta prueba se realizaba en agar harina de maíz, agar arroz, agar papa-zanahoria, agar tabaco entre otros; para la siembra se necesitaba realizar una estría profunda e incubar a 37° por 24 a 48 horas más; la observación de clamidosporas, que son estructuras grandes esféricas de 8 a 12 um de diámetro, de pared gruesa distribuidas de forma terminal o intercalar confirmaban la presencia de *Candida albicans*. Sin embargo, este método tomaba de 48 a 72 horas como mínimo ^{6,7, 52}.

Prueba de tubo germinativo:

En 1956 Hill y Gehartdt observaron que al inyectar *Candida albicans* o *Candida stellatoidea* en ratones, se empezaba formar micelios desde los 60 minutos; ese mismo año Reynolds y Braude observaron que se producía ese mismo fenómeno en

sangre, plasma, suero, albumina de huevo y líquidos corporales con *Candida albicans*.^{9, 10, 22,52}

Taschdjian observo que la formación de estos filamentos en suero humano ocurría dentro de los 90 minutos a 4 horas a temperaturas entre 37° a 42° grados¹⁰.

En 1962 Mackenzie ensayo con 163 cepas de *Candida albicans* incubado por 2 a 3 horas a 37°, determinando los factores que afectan la producción del tubo germinal. el ensayo se realizó con suero humano y de otras especies, encontró resultados satisfactorios en suero en sus estados fresco, inactivado, congelado a excepción de suero coagulado, el tubo germinativo no se producía en suero diluidos, la edad del inoculo no afectaba la formación del tubo germinal, aunque si disminuía su porcentaje. Además, determino que la cantidad de inoculo adecuado era de $6-4 \times 10^7$ ya que concentraciones mayores inhibían la formación del tubo germinativo⁹.

En 1963 Buckley y Van encontraron resultados satisfactorios para *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* con la prueba del tubo germinativo realizado con albumina de huevo incubado entre 37 a 42°, aun modificando el método realizado en tubo de vidrio por el método realizado entre lamina y laminilla²³.

Basados en los estudios de anteriores; Andleigh ensayo con suero y albumina de huevo; ambos medios con el método en tubo y el método directo entre lámina y laminilla, encontrando que el método albumina en tubo es tan útil como el método de suero en tubo pero mucho más seguro y accesible, diversos investigadores han probado la formación de tubo germinativo en medios alternativos al suero ,buscando un medio más seguro y accesible al personal de laboratorio que el suero humano, entre los medios encontrados como óptimos están: sueros de otros

animales, caldo y agar de Mueller Hinton soluciones de carbohidratos ,caldo SST, caldo tripticasa de soya, entre otros ¹²⁻²⁰.

Mila y colaboradores en 1986 comprobaron que solo *Candida albicans* es capaz de formar tubos germinales en albumina de huevo desde los 30 minutos considerándolo como un medio inductor útil como el suero humano ²¹.

En el estudio realizado por Duarte mencionan a la modalidad del tubo germinativo realizado por Araujo, en la cual coloca una gota de albumina de huevo en una lámina y mezcla una porción de la cepa y es incubada por 2 horas para visualizar la formación del tubo germinativo¹⁷.

En un reciente estudio Moya comprobó el desarrollo de tubos germinales en plasma humano procedente de banco de sangre, y determino el rendimiento de este medio; resultando una excelente alternativa al suero humano y mucho más seguro²⁴.

En la actualidad el medio Gold estándar para la realización del tubo germinativo sigue siendo el suero humano, que es extraído de las muestras al azar de los pacientes que acuden a los centros de salud, no existiendo ningún criterio de exclusión. La prueba se realiza en 0.5 ml de suero humano, en un tubo de vidrio, a la cual se le agrega un inculo pequeño de la colonia de *Candida* sospechosa, luego se incuba a 37° por 2 horas, y se observa al microscopio^{6,51}.

Interpretación:

Para Zurita; la prueba es positiva cuando se observa extensiones filamentosas de la levadura sin presentar estrechamiento en su origen y el ancho del filamento sea la mitad de la célula progenitora y de 3 a 4 veces la célula madre⁵¹ o de 5 a 15 um de longitud ⁶.

Para Moya el porcentaje de filamentación mínimo es de 5%.

Figura N° 5: Tubos germinativos formados en suero luego de 2 horas de incubación a 37°.



Falsos negativos:

Mackenzie determino que un 5% de *Candida albicans* son negativas a la prueba de tubo germinativo, otro motivo de falsos negativos es el tamaño del inculo; a grandes se inhibe el desarrollo de pseudohifas ⁹. Otras especies como *Candida tropicalis* pueden producir pseudohifas al cabo de 2 horas, sus filamentos pueden tener un aspecto similar a los tubos germinales de *Candida albicans*, pero con una zona de constricción adyacente a la célula madre, esta característica permite diferenciarlas de *Candida albicans*. La prueba del tubo germinativo es útil para identificar a *C. albicans* del resto de las especies de *Candida* ⁹

Pruebas bioquímicas:

Están basados en las necesidades fisiológicas del microorganismo, son principalmente 2 procesos bioquímicos

- a. Zimogramas:** está basado en la fermentación de carbohidratos a una concentración de 1 a 5% en un medio líquido que además contiene un indicador de pH; que puede ser rojo de fenol o púrpura de bromocresol, una vez inoculado; el medio se incuba a 25° por 5 a 7 días. La fermentación se observa por cambio de color del indicador de pH indicando producción de ácido, mientras que el desplazamiento del tampón de vaselina y parafina o de la campana de Durham señala la producción de gases⁶.
- b. Auxonogramas:** se trata de la utilización o asimilación de carbohidratos; para la prueba se coloca 2 gotas de una suspensión de levaduras a cada tubo con diferentes carbohidratos, luego se incuba a 37° C por 3 días, también hay un método en placa; para lo cual se vierte 25 ml de medio base peptonado carente de carbohidratos a 50°C a la cual se agrega 1ml de suspensión de levaduras a una concentración de número 1 de la escala de MacFarland, se le coloca encima papel filtro impregnados con los carbohidratos en solución al 1% o 2%, se incuba a 325° por 5 a 15 días y se leen los halos de crecimiento alrededor de los discos.⁷

Figura N° 6: Zimograma y Auxonograma del género *Candida*, tomado de Bonifaz⁶

Especie	Zimograma						Auxograma					
	Glu-cosa	Galac-tosa	Ma-nosa	Saca-rosa	Lac-tosa	Rafi-nosa	Glu-cosa	Galac-tosa	Ma-nosa	Sacaro-sa	Lac-tosa	Rafi-nosa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. famata</i>	V	-	-	-	-	V	+	+	+	+	V	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	+	V	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-

Métodos automatizados:

El fundamento zimograma y auxonograma da origen a métodos automatizados como el API 20c, API 32C, ViteK, Uni-Yeast-Tek, Minitex, Yeast.Ident, Microscan y la lectura es automatizada luego de la medición de color a través de un indicador de pH, se mide también la formación de gas y ácido⁷.

Medios cromogénicos: Fueron ideados por Nickerson y Pagano Levin son medios de cultivo a los cuales se les ha adicionado sustratos cromogénicos, ellos detectan la actividad enzimática y permiten el aislamiento y la identificación presuntiva de la especie de *Candida* por la coloración, textura y morfología colonial ⁷. *Candida albicans* presenta colonias amarillo verdosas a azul verdosas. En el estudio de Ainscough y Kibbler con 21 cepas de *Candida albicans*; demostró una sensibilidad y especificidad de 100%²⁸

Biología molecular:

Las pruebas moleculares utilizan el ADN y y ARN para la identificación de *Candida albicans*, mediante la cariotipificación electroforética se puede detectar los patrones enzimáticos propios de la levadura.

Con el tiempo se han ido desarrollando métodos que identifican la región variable de la subunidad 18S del DNA ribosomal (rDNA), y otro que identifica una región que alberga a los espaciadores transcritos internos (*ITS, del inglés Internal Transcribed Spacers*) lo cual puede ser de mucha utilidad para identificar especies resistentes a fluconazol.^{6, 7}

Rendimiento de un test diagnostico

En el caso de las pruebas diagnósticas; el rendimiento de una prueba se refiere a la utilidad de ellas en diferenciar la presencia o ausencia de una determinada condición, monitorizar un patógeno o evaluar la gravedad de dicha condición. El rendimiento de un método o test diagnóstico debe ser evaluado en comparación con la prueba Gold Estándar; Ésta permite evaluar el rendimiento de otros métodos alternativos o cuando se modifica el método de referencia ^{53, 54,55}.

En la identificación de *Candida albicans*, la prueba Gold Estándar es la prueba del tubo germinativo en suero o plasma humano y cuando es positiva define la presencia de *Candida albicans* y/o *Candida dubliniensis* ^{6, 7,51}.

Para evaluar el rendimiento de una prueba diagnóstica en microbiología, se recomienda usar material de referencia como las cepas ATCC porque disminuyen la variabilidad biológica inherente de los microorganismos aislados de muestras clínicas. Estas cepas proceden de colecciones de organismos acreditados que permiten asegurar su trazabilidad y junto con el método de referencia permiten evaluar parámetros como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y otros parámetros de los métodos alternativos⁵³.

Para la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; las pruebas que deben realizarse para la evaluación del rendimiento de un método alternativo cualitativo como lo es la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo son: sensibilidad, especificidad, % de falsos positivos, % de falsos negativos, y eficiencia.⁵³ Ya que estos parámetros son intrínsecos a la prueba.⁵⁴

Sensibilidad Analítica: Es la proporción de muestras que contienen el microorganismo investigado y responden positivamente al método ensayado como al método de referencia.⁵³⁻⁵⁵

$$\text{Sensibilidad} = (\text{VP}/\text{VP} + \text{FN}) * 100$$

Especificidad Analítica: Es la proporción del total de muestras que no contienen el microorganismo investigado y responden negativamente al método ensayado como al método de referencia.^{53, 54,55}

$$\text{Especificidad} = (VN/VN+ FP) * 100$$

Desviación Positiva: sucede cuando el método de alterno indica un resultado positivo mientras el método Gold estándar señala como resultado negativo.

$$\text{Falsos positivos} = (FP / (VP+FP))$$

Desviación Negativa: es cuando un método alterno señala un resultado negativo, sin embargo el método de referencia indica un resultado positivo.

$$\text{Falsos negativo} = (FN / (FN+VN))$$

Eficiencia: Es la proporción total de del número de resultados correctamente asignados con el método utilizado ⁽⁵⁴⁾.

$$\text{Eficiencia} = ((VP+VN)/N)*100$$

Criterios de Aceptación:

Según la SEIMC se aconseja un valor de sensibilidad, especificidad y eficiencia superior del 90%, mientras que para desviación positiva y desviación negativa el valor recomendado es menor del 10%.

Para otros autores como Bravo, Cruz, Salech et al; otros indicadores importantes son el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, estos valores proporcionan estimaciones de la probabilidad de la enfermedad, es decir se refiere a la probabilidad de que el método evaluado entregue el diagnóstico correcto. Estos

valores se toman como datos importantes al momento de interpretar un resultado, sin embargo dependen de la prevalencia de la enfermedad.^{54, 55}

Valor Predictivo positivo: Es la probabilidad de que el paciente diagnosticado como positivo para una condición dada por el método evaluado tenga realmente dicha condición.

$$\text{Valor Predictivo positivo} = (VP / (VP+FP)) * 100$$

Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad de que el paciente diagnosticado como negativo por el método evaluado para una condición dada; realmente no tenga dicha condición.

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = (VN / (FP+VN)) * 100$$

Índice de Kappa de Cohen:

Se usa la prueba estadística Índice de Kappa de Cohen para evaluar el nivel de concordancia entre los resultados de tipo categórico obtenidos por 2 métodos diferentes siendo uno de ellos el método de referencia y el otro es un método alternativo.

Antes de realizar el índice Kappa se realizó la prueba de Chi Cuadrado para determinar si hay asociación entre los resultados obtenidos por ambas pruebas, la prueba se usara a un nivel de significancia de 5% o 0.05.

El Índice Kappa de Cohen nos brindará el grado de concordancia en porcentaje entre los 2 métodos, la probabilidad de error y nos permitirá decidir si nuestra hipótesis propuesta es correcta, podemos además calificar el nivel concordancia entre los 2 métodos como indica el cuadro siguiente:

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

Dónde:

P_0 = Proporción de acuerdos observados

P_e =Proporción de acuerdos esperados al azar

Figura N° 7: Cuadro de valoración del Índice de Kappa ⁵⁶

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Sin embargo para López y Pita se el índice Kappa debe ser estimada con sus intervalos de confianza para darle mayor precisión y conocer mejor el error estimado⁵⁶.

2. 3. TERMINOLOGÍA BÁSICA

Rendimiento: En el caso de las pruebas diagnósticas, el rendimiento de la prueba consiste en detectar la presencia o ausencia de una determinada condición o patógeno y es valorado en comparación con la prueba Gold estándar ⁵³.

Tubo germinal: Se refiere a la extensión filamentosa que surge del blastoconidio, dicha filamento es de 3 a 4 veces el ancho de la blastoconidio y o de 5 a 15 um de longitud sin estrechamiento en su punto de origen. Esta extensión solo se da en *Candida albicans* y *Candida Dublinensis* ante estímulos externos como pH, temperatura y presencia de diversos líquidos permitiendo diferenciar a las especies

mencionadas de otras especies de *Candida*,^{6,7} no obstante Mackenzie observo que el 5% de *Candida albicans* no desarrollan filamentosión⁹.

Albúmina de huevo: más conocida como clara de huevo, es un líquido viscoso semitransparente, secretado por el epitelio del oviducto, constituido por 85% de agua y 15% proteínas. Las proteínas que lo conforman son: 54% de ovoalbúmina, 13% de ovotransferrina, 11% de ovomucoide, 3.5% de lisozima, 3% de ovomucina, también contiene cystatina, avidina, ovostatina ovoflavoproteína, ovoglobulinas. Algunos de estos componentes tiene propiedades antibacterianas Sin embargo no se ha demostrado actividad antifúngica²¹.

Suero humano: Es el componente líquido de la sangre luego de la coagulación y extracción del coágulo, por lo general es de apariencia transparente y densidad consistente. Es semejante al plasma en la sangre, no obstante a diferencia de él, porque este no tiene el fibrinógeno y factores de coagulación II, V y VIII ya que se consumió en el proceso de coagulación.⁵⁹

Medio de cultivo: Un medio de cultivo contiene los nutrientes necesarios, así como factores de crecimiento para el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, las necesidades nutricionales de ellos son tan amplias por lo que existen diversos tipos de medios de cultivos, pero sus principales componentes son agar, extractos, peptonas, sistemas amortiguadores en ciertos casos: fluidos corporales, indicadores de pH, en ocasiones agentes reductores o selectivos.^{6, 7,59}

Agar: Es un polisacárido obtenido de la pared celular de algas marinas de los géneros *Gelidium*, *Euचेuma* y *Gracilaria*, que actúa como un agente gelificante que permite dar solidez a los medios de cultivo sin que los microorganismos lo

puedan degradar. Tiene la particularidad de licuarse a los 100°C y se solidificarse a los 40°C.^{28, 59}

Extractos: Son preparados deshidratados de concentrados de órganos, tejidos o vegetales. Para los medios de cultivo se usan principalmente extracto de carne, levadura o malta.^{28, 59}

Peptona: Las peptonas son polipéptidos formados por la degradación enzimática de las proteínas. Conocidas también como la principal fuente de nitrógeno en los medios orgánicos para el cultivo de bacterias. Aportan una alta concentración de sustancias necesarias en la reparación celular de algunos órganos determinados. Las células utilizan los nutrientes como material útil en su metabolismo.^{28, 59}

Prueba Gold Estándar: también conocido como estándar de referencia o patrón de oro; es la prueba que define la presencia o ausencia de una determinada condición con la máxima certeza conocida ⁵³.

Blastosporas: Son conidios formados por la gemación o blastogénesis de la célula conidiógena, se pueden observar aislados, en racimos o también en cadenas⁷

2. 4. HIPÓTESIS

Ha: El rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo es aceptable según los criterios de la SEIMC en la identificación de *Candida albicans*.

Ho: El rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo no es aceptable según los criterios de la SEIMC en la identificación de *Candida albicans*.

2. 5. VARIABLES E INDICADORES

Según su dominio tenemos 2 tipos de variables:

- ✓ Variable Independiente: Prueba de tubo germinativo con albumina de huevo
Por su naturaleza la variable independiente es de tipo categórica nominal.
- ✓ Variable dependiente: Rendimiento
Por su naturaleza la variable dependiente es de tipo cuantitativa continua.

CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

La albumina de huevo como medio inductor en la prueba del tubo germinativo para la identificación de *Candida albicans* fue anteriormente ensayado por Buckley, Van, Andleigh, Mila y más reciente Araujo quienes señalan resultados óptimos, no obstante dichos investigadores no evaluaron el rendimiento de la prueba.

La presente investigación tuvo por propósito evaluar y analizar el rendimiento de la prueba del tubo germinativo realizada con albumina de huevo en lugar del suero humano para la identificación de *Candida albicans*.

Según la clasificación de Sampieri, el estudio presentado es de tipo cuantitativo transversal ya que se midieron cuantitativamente los indicadores de la variable dependiente solo una vez⁶⁰; para Alarcón, Delgado y Manterola se subclasificaría como un estudio observacional porque no se modificó la variable independiente. Según el alcance de los resultados se trata de una investigación analítica ya que se comparó con el método de referencia ^{61, 62, 63}.

3.2 ÁMBITO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio corresponde al área de microbiología específicamente micología y se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica de la Universidad Norbert Wiener ubicada en Lince.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1 Población: La población está formada por levaduras del género *Candida spp.*

3.3.2 Muestra: Las muestras las representaron 118 cepas de *Candida albicans*, 4 cepas de *Candida krusei*, 4 cepas de *Candida tropicalis* y 4 cepas de *Candida parapsilosis* brindadas por el Mg. Rojas León Roberto quien conserva una micoteca particular con especies de diferentes hongos y levaduras recolectadas de pacientes pediátricos. Previamente todas las muestras fueron identificadas con el sistema automatizado Vitek® 2 Compac (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

Las cepas se reactivaron y fueron cultivadas en agar Sabouraud dextrosa (Merk, Darmstand, Alemania) para la evaluación del tubo germinativo. Se utilizó como control la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 (American Typo Culture Collection, Manassas, USA) para la prueba del tubo germinativo en albúmina de huevo y suero humano.

3.3.3 Tipo de Muestreo: se empleó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

a) Criterios de Inclusión

- a. Se trabajó sólo con cepas que hayan sido identificadas por el sistema automatizado Vitek® 2 Compac (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia)
- b. Se utilizó el suero humano fresco de pacientes adultos que no estaban recibiendo tratamiento antimicótico hasta el momento del estudio
- c. Cepas pertenecientes a la micoteca particular del Mg Roberto Rojas León.
- d. Albumina recién extraída de huevo de *Gallus gallus domesticus*.
- e. Albumina de huevo ya extraída y conservada de 4 a 8° C por no más de 24 horas.

b) Criterios de Exclusión

- a. Suero humano con signos de hemolisis, lipemia o contaminación.
- b. Albumina de huevo con evidencia de contaminación o descomposición.
- c. Albumina de huevo de otras especies de ave.
- d. Placas de agar Saboureaud con evidencia de contaminación.

Procedimiento:

1. Se sembró las cepas de *Candida albicans* en agar Saboureaud a 37°C por 24 horas.
2. Las muestras de sangre se tomaron en tubos con activador de coagulo y gel de la marca Vacuette® CAT con capacidad de 8 ml, las muestras se procesaron según la guía CLSA H26-A3 y H03-A6.
3. Los huevos fueron desinfectados con gasa estéril y alcohol de 70°, luego con sumo cuidado se extrajo solo la albumina en un frasco estéril.

4. Se rotularon los crioviales con el número de muestra y tipo de medio inductor (suero humano o albumina de huevo).
5. Se distribuyó 0.5 ml de suero humano o albumina de huevo según cada rotulo.
6. Para el sembrado se esterilizó el asa de siembra, luego de enfriar; con la punta se tocó ligeramente la colonia para suspenderla en el criovial con suero humano, luego se procedió a realizar los mismos pasos y suspenderla en el criovial con albumina de huevo. Ambos procesos se realizaron por cada cepa.
7. Los crioviales fueron incubados a 37°C durante 120 min. .
8. Luego del tiempo se colocó una gota de cada criovial en una lámina rotulada y se procedió a realizar la observación microscópica a 10x y 40x.
9. Se reportaron como positivo las muestras con formación de una prolongación filamentosa proveniente de la célula levaduriforme de 3 a 4 veces su tamaño, sin constricciones en su origen y mayor a 5%, o negativo si no se observó la formación de alguna prolongación filamentosa en la célula.

3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de datos se evaluó cualitativamente características microscópicas del tubo germinativo que confirman la presencia de *Candida albicans* como: Tamaño y porcentaje de la filamentación desarrollada en la albumina de huevo y si estas cumplían con las características observadas en el medio Gold estándar.

Se realizaron los cálculos para evaluar los indicadores del rendimiento de la prueba de tubo germinativo con albumina de huevo como: sensibilidad, especificidad,

falsos positivos, falsos negativos, eficiencia y valores predictivos Los resultados se incluyeron en tablas comparativas mediante el software MS-Excel 2010 (Redmond USA) para Windows.

Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS versión 20.0 (ARMONK, USA) para el cálculo del Índice de Kappa de Cohen para evaluar el nivel de concordancia con la prueba Gold estándar.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS

El presente proyecto de investigación se realizó en base al estudio de cepas aisladas de muestras clínicas provenientes de la micotéca particular del Mg. Rojas León, Roberto. Debido a que fueron cepas recolectadas y almacenadas, no presentaron conflictos éticos.

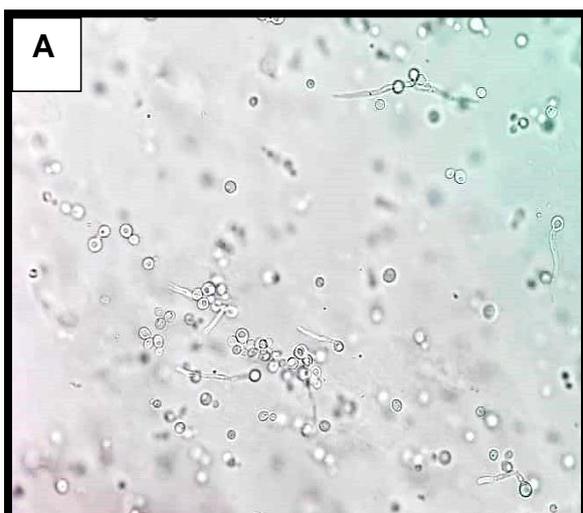
No obstante, el presente estudio cuenta con la autorización del propietario de las cepas a estudiar, con el único fin de explorar o examinar un problema y plantear una situación de solución para brindar nuevos conocimientos.

CAPITULO IV: RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

En el presente ensayo se emplearon 118 cepas de *Candida albicans* y 4 cepas de *Candida krusei*, 4 cepas de *Candida tropicalis* y 4 cepas de *Candida parapsilosis*. Para el procesamiento se colocaron 0,5 ml de suero humano y 0.5 ml de albumina de huevo en crioviales por separado. Se suspendió con la ayuda de un asa bacteriológica en punta, una porción de cada cepa, hasta obtener una ligera turbidez. Los preparados se llevaron a una incubadora a 37° por 2 horas.

Las condiciones para ser aceptados como positivos fueron la observación de tubos germinativos de 3 a 4 veces el tamaño de la levadura, cuyo ancho es la mitad de la célula progenitora, sin presentar constricción en su punto de origen y en un porcentaje mayor a 5% por cada 100 células.



Los resultados se incluyeron en la siguiente tabla:

Tabla N° 3: Tabla de contingencia

		Prueba de tubo germinativo con suero		
		Positivo	Negativo	Total
Prueba de tubo germinativo con albumina de huevo	Positivo	113	0	113
	Negativo	5	12	17
	Total	118	12	130

En la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo se observaron que 113 cepas pertenecientes a *Candida albicans* fueron consideradas positivas y solo 5 cepas fueron consideradas negativas. En comparación con la prueba de tubo germinativo con suero humano todas dieron resultados positivos.

Las cepas que no pertenecieron a *Candida albicans* dieron negativas a la prueba tanto en suero humano como en albumina de huevo.

Los indicadores de rendimiento de la prueba de tubo germinativo con albumina de huevo fueron incluidos en la siguiente tabla 4. Se estableció intervalos de confianza de 95%, los criterios de aceptación se tomaron de la guía de Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos de la Sociedad Española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Tabla N°4: Resultados de indicadores de rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo versus prueba con suero humano.

Prueba del tubo germinativo con albumina de huevo para la identificación de <i>Candida albicans</i>					
Indicadores	Resultado	95 % I.C.		criterios aceptación SEIMC	Resultado
		Límite inferior	Límite superior		
Prevalencia	90.8%	84.1%	94.9%	---	---
Eficiencia	96.2%	90.8%	98.6%	> A 90%	Aceptable
Sensibilidad	95.8%	89.9%	98.4%	> A 90%	Aceptable
Especificidad	100.0%	69.9%	99.2%	> A 10%	Aceptable
Falsos Positivos	0.0%	---	---	> A 10%	Aceptable
Falsos negativos	4.2%	2%	10%	---	---
Valor predictivo positivo	100.0%	95.9%	99.9%	----	---
Valor predictivo negativo	70.6%	44%	89%	---	---

Índice Kappa de Cohen

Se realizó la prueba estadística Índice Kappa de Cohen para calificar el grado de concordancia entre los resultados de la prueba Gold estándar que es la prueba del tubo germinativo realizada en suero humano versus los resultados de la prueba del tubo germinativo realizada con albumina de huevo.

Tabla 5: Tabla cruzada Albúmina de huevo *Suero Humano

		Suero Humano		Total	
		Positivo	Negativo		
Albúmina de huevo	Positivo	Recuento	113	0	113
		% del total	86,9%	0,0%	86,9%
	Negativo	Recuento	5	12	17
		% del total	3,8%	9,2%	13,1%
Total	Recuento	118	12	130	
	% del total	90,8%	9,2%	100,0%	

En la tabla 6 se analizó también si existe asociación entre los resultados de ambos métodos por medio de la prueba Chi Cuadrado de Pearson a un nivel de significancia de 0.05 obteniendo 1 casilla con un recuento esperado menor a 5 por lo que se tomó la corrección de Yates. Se obtuvo con una probabilidad de error de 0,000% (corrección de Yates: 8,5629E-21) que existe concordancia entre los resultados de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo y la prueba del tubo germinativo con suero humano.

Tabla 6: Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	93,459 ^a	1	,000		
Corrección de continuidad ^b	87,469	1	,000		
Razón de verosimilitud	80,601	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	92,741	1	,000		
N de casos válidos	130				

a. 1 casillas (25.0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3.65.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

El nivel de concordancia entre los resultados de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo se observan en la tabla 7 siendo el índice Kappa de 0.81 con los resultados obtenidos con la prueba del tubo germinativo con suero humano.

Tabla n° 7: Medidas simétricas

		Valor	Error estándar asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	,807	,083	9,374	,000
N de casos válidos		130			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Calculo del intervalo de confianza para el índice de Cohen

Tabla 8: Estadística para el cálculo de intervalo de confianza tomado de López, Pita, Seoane y Pertega

Observador 1	Observador 2		
	1	2	Marginal
1	0.87	0	0.87
2	0.38	0.9	1.3
Marginal	1.25	0.9	2.17
ACUERDO OBSERVADO	0.82		
ACUERDO ESPERADO	0.4849		

ÍNDICE KAPPA	ERROR ESTÁNDAR	I.C 95%	Fuerza de la concordancia
0.660	0.501	(-0.322 , 1.642)	Buena

El índice Kappa a un nivel de significancia de $\Delta = 0.05$ y $z_{0.975} = 1.96$, se obtuvo un índice Kappa de 0.66 con intervalo de confianza de -0.322 a 1.642 calificándola como buena concordancia.

4.2 DISCUSIÓN

La prueba de tubo germinativo permite evaluar si una cepa sospechosa de ser *Candida albicans* tiene la capacidad de realizar la transición dimórfica. Esta transición ocurre cuando hay condiciones como temperatura de 37°C, pH neutro y la presencia de un medio líquido³³. Estos factores son percibidos como estímulos externos que activan rutas de transducción que se expresan como cambios en el ciclo celular, estructura de la pared celular y el citoesqueleto³³.

Aunque no se conocen con exactitud los receptores que activan esos procesos para la transición dimórfica, desde su observación por Reynold y Braude se han probado diversos medios como suero, plasma, líquidos corporales, albumina de huevo, caldos, medios de cultivos, suero de otras especies de animales, derivados de suero entre otros¹²⁻²⁴. La prueba del tubo germinativo es una herramienta económica, eficaz, rápida, con excelente rendimiento para el diagnóstico presuntivo de infecciones producidas por *Candida albicans*; sin embargo, al emplear suero humano se genera un riesgo para el personal de laboratorio, ya que el suero que se utiliza generalmente procede de los pacientes que acuden al laboratorio pero no se tiene seguridad de que condiciones o infecciones puedan tener^{9-12,18}. Por esta razón investigadores como Rimek, Deorukhkar, Raghurat y otros buscaron medios líquidos que tenga esa misma eficacia pero que sean más seguros para el personal de laboratorio¹⁴⁻¹⁶.

En un reciente estudio Moya reemplazó el suero humano por plasma humano fraccionado de una unidad de sangre donada, este medio tiene una alta sensibilidad y especificidad, además tiene la ventaja de ser un medio con mayor seguridad para el personal de laboratorio ya que para ser calificada como apta se requiere que sus pruebas de tamizaje sean no reactivas²⁴, sin embargo no todos los laboratorios cuentan con el servicio de banco de sangre, además diversos estudios señalan que existe riesgo de infección, debido a cuatro causas: donaciones en período ventana, infecciones ocasionadas por mutantes o cepas raras, seroconversiones atípicas donde el donante es asintomático pero es portador crónico de una infección transmisible con resultado serológico negativo y errores en los procedimientos de laboratorio.²⁵⁻²⁷

La albumina de huevo fue uno de los medios ensayados por Reynolds y Braude obteniendo resultados óptimos al igual que en suero humano, Buckley también ensayo con albumina de huevo, pero cambio el método realizado en tubo, por el método directo entre lamina y laminilla, reportando resultados óptimos desde los 30 minutos^{22, 23}. Araujo y Mila coincidieron en ese resultado^{17, 21}.

En este estudio se realizó el método directo como prueba piloto con la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans* comparándolo con la prueba realizada en tubo tanto en albumina de huevo como en suero humano. Se verificaron resultados desde los 30 minutos, sin embargo se observaron tubos germinativos recién desde los 60 minutos pero en porcentajes menores a 5% por lo que podrían considerarse como resultados negativos, siendo óptimos en la pruebas realizadas en crioviales leídos a las 2 horas tanto en suero humano como en albumina de huevo. Este resultado coincide con la investigación de Andleigh que también encontró resultados óptimos

a las 2 horas y por el método realizado en tubo²², por esta razón el método que empleamos; fue colocar 0.5 ml de albumina en crioviales y leerlos a las 2 horas.

En los estudios realizados por los investigadores mencionados anteriormente; si bien concluyeron que la albumina de huevo es un medio inductor óptimo para la formación de tubos germinativos; no calcularon el rendimiento de esta prueba con la albumina de huevo.^{17, 21,22}

En nuestro estudio la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo presento una sensibilidad de 95.8%, especificidad de 100% con una eficiencia de 95.4%, porcentaje de falsos positivos de 0%, porcentaje de falsos negativos de 4.2%, Valor Predictivo positivo de 100% y Valor Predictivo Negativo de 70.6%

Según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica los criterios de recomendables para los indicadores de rendimiento de pruebas cualitativas en Microbiología deben ser mayores a 90% para sensibilidad, especificidad y eficiencia ; mientras que para porcentajes de falsos positivos y negativos estos valores deben ser menores al 10%; por lo tanto consideramos que el rendimiento de la prueba tubo germinativo con albumina de huevo es aceptable para la identificación de *Candida albicans* ; lo cual lo hace no solo una alternativa económica ,con alta sensibilidad ,especificidad y eficacia ,sino también un medio accesible y seguro para el personal de laboratorio en la identificación de *Candida albicans*.⁵³

En el estudio de Buckley y Van se ensayó la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo con 56 especies de *Candida* de ellas solo *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* dieron positivo a la prueba; este resultado coincide con nuestro estudio, ya que de las cepas de *Candida* no *albicans* que ensayamos solo

Candida tropicalis desarrollo tubos germinativos a las 2 horas ,sin embargo sus tubos germinativos presentaron constricción en su punto de origen, tal como lo señalo Mackenzie ; por lo cual fue considerado negativo para *Candida albicans*.^{9,23}

En cuanto a los indicadores de seguridad de la prueba el valor predictivo positivo fue de 100%, mientras que el valor predictivo negativo es de 70.6% ; indicando que la probabilidad de un resultado negativo realmente lo sea es de 70.6%, por esta razón ,ante casos sospechosos con resultado negativo que tengan una clínica diferente, se recomienda corroborar con otros protocolos.⁵³⁻⁵⁵

El Índice Kappa de Cohen permite calificar la concordancia entre 2 métodos u observadores; siendo una de ellas el método Gold estándar y la otra el método alternativo. El resultado del índice Kappa de Cohen del estudio es de 0.81, este resultado califica a la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo como altamente concordante con la prueba del tubo germinativo con suero humano ⁵⁶.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones:

La sensibilidad de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans* es de 95.8%

La especificidad de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans* es de 100%.

El porcentaje de falsos positivos de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans* fue de 0%.

El porcentaje de falsos negativos de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans* es de 4.2%.

La eficiencia de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de *Candida albicans* es de 96.2%.

Otros índices calculados fueron: El Valor Predictivo Positivo de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans* con 100% y el valor Predictivo Negativo de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo en la identificación de *Candida albicans* con 70.6%.

El nivel de concordancia de la albumina de huevo versus suero humano en la prueba del tubo germinativo en la identificación de *Candida albicans* es de 0.861 calificándola como altamente concordante con la prueba Gold estándar.

A partir de los resultados obtenidos se admite que: El rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albumina de huevo es aceptable para la identificación de *Candida albicans*.

La albumina de huevo es un medio inductor óptimo para la formación de tubos germinales, siendo además accesible a cualquier centro de salud incluso en niveles de baja complejidad, económico y seguro para el personal de laboratorio, teniendo además alta sensibilidad, especificidad, Valor predictivo positivo y concordancia con el suero humano como se comprobó en este estudio.

5.2 Recomendaciones:

La prueba de tubo germinativo con albumina de huevo es una alternativa segura con alto rendimiento, pero su valor predictivo negativo es de 70.6% por lo que se recomienda que en resultados negativos se corroboren con otras metodologías.

En el caso de *Candida tropicalis* se debe tener cuidado en la observación de tubos germinativos, ya que ellas se pueden desarrollar al cabo de 2 horas, sin embargo tienen constricción en su punto de origen que las diferencian de *Candida albicans*, pero podrían producir resultados falsos positivos no solo con albumina de huevo sino con suero humano.

La albumina de huevo al ser altamente viscosa puede ser un poco difícil de manipularla, sin embargo al tenerla refrigerada de 4° a 8° por un mínimo de 20 horas en un frasco estéril, la hacen más fácil su manipulación para ser dispensada en los volúmenes que se necesita.

Se requiere mayores estudios para verificar estos resultados en un número mayor de pruebas, incluso con otras especies de *Candida* como *Candida dubliniensis* que

es uno de los microorganismos emergentes en nuestra época sobre todo en pacientes con VIH.

Se espera que esta investigación promueva estudios para el desarrollo y/o mejoramiento de metodologías del laboratorio clínico, sobretodo que sea accesible a los centros de salud incluso los de baja complejidad y ecoamigables con el medio ambiente.

REFERENCIAS

1. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol. Rev. [Internet] 2007 [cited 2019 Feb 01]; (20):133-63. Disponible en: <https://cmr.asm.org/content/20/1/133.full>
2. Gorka B. Vulvovaginitis candidiásica. Micol, Rev. [Internet] 2002 [cited 2019 Feb 01]; (19) :22-24 disponible en : <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/022024.pdf>
3. Sánchez J, González L, Rojas K, Muñoz G. Prevalencia de Candida albicans y su relación con cambios en el pH vaginal. Aten Fam. [Internet] 2017 [cited 2019 Feb 01]; 24(1): 18-22 Disponible en :<https://doi.org/10.1016/j.af.2017.01.003>
4. Pineda J, Cortés A, Uribarren T, Castañón L. Candidosis vaginal. primera parte: revisión de la clínica, epidemiología y situación de México. Revista médica Risaralda [Internet]. 2015 Jan [cited 2019 Feb 01]; 21(1): 58-63. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-06672015000100010&lng=en.
5. Andrioli J. et al . Freqüência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [Internet]. 2009 June [cited 2019 Feb 19] ; 31(6): 300-304. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032009000600006&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032009000600006>.
6. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4º Ed. México DF: Mc Graw Hill. Ed; 2012.
7. Arenas R. Micología Médica Ilustrada 3ª Ed. México: Mc Graw Hill Interamericana.2006
8. García P. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2002 [citado 2018 Ene 15] ;

19(Suppl 2): 96-100. Disponible en:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019200006&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019200006>.

9. Mackenzie D. Serum tube identification of *Candida albicans* Journal of Clinical Pathology 1962;(15):563-565.

<https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/15/6/563.full.pdf>

10. Taschdjian, C. et. al. Rapid Identification of *Candida albicans* by Filamentation on Serum and Serum substitutes. A. M. A. J. Dis. Child. 1960; 99(2): 212-215.
<https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/article-abstract/499410>

11. Peman J, Martin M, Rubio M. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao: Rev Iberoam Micol; 2001;11(1):11-19.

12. Atalay A, et al. Can serums be replaced by Mueller-Hinton agar in germ tube test?. Nigerian Journal of Clinical Practice:2016.

13. Souza A, et al. Use of Mueller-Hinton broth and agar in the germ tube test. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Jan 10]; 56(6): 483-485. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000600483&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000600005>.

14. Raghunath P, Kumari KS, Subbannayya K. SST broth, a new serum free germ tube induction medium for identification of *Candida albicans*. World J Microbiol Biotechnol.2014; 30 (7):1955-1958

15. Deorukhkar S, Saini S, Jadhav P. Evaluación de diferentes medios para la producción de tubo germinativo de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. IJBAR [Internet]. 26Sep.2012 [citado el 10 de setiembre del 2018]; 3 (9): 704-7. Disponible en: <https://ssjournals.com/index.php/ijbar/article/view/213>

16. Rimek, Dagmar & Fehse, Brigitte & Göpel, Petra. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Mycoses.2008; 51: 205-208.

17. Duarte, A, Márquez, A, Araujo, C, Pérez, C. Modalidades de la Prueba del Tubo Germinal. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]. 2009; 29(1): 66-68. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416353014>
18. Hilmioglu S, Macit I, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Mycoses 2007; 50(4):282-285.
19. Mendez G. Inducción de tubo germinal en *Candida albicans* por diferentes carbohidratos [tesis]. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 1996. 10 p.
20. Jitsurong S, Kiamsiri S, Pattararangrong N. New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. Mycopathologia. 1993;123: 95-98. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01365086>
21. Mila L, Valero S, Bracho C, Nava I. Producción de tubos germinales en albumina. Ensayo en especies del género *Candida*. Kasmera. 1986; 14: 1-4. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.
22. Andleigh H. S., et al. Rapid identification of *Candida albicans*. Mycopathologia et mycologia applicata. 1964;23(2): 81-84. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19661300966>
23. Buckley H, Van U. The identification of *Candida albicans* within two hours by the use of an egg white slide preparation. Sabouraudia: Revista de Micología Médica y Veterinaria; 1963 (2):205-208 Publicado en línea: 09 Jul 2009 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00362176385190351>
24. Moya J. Estudio comparativo para la identificación de *Candida albicans* en plasma y suero mediante la técnica de tubo germinativo [Tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2016.

25. Daza N, Sánchez M, Vanegas T, Hernández I. Prevalencia de infecciones en donantes de sangre en la Universidad Industrial de Santander versus parques de la ciudad de Bucaramanga, 2014. *MÉD.UIS*. 2016; 23(3):55-60.
26. Rivero R. Transmisión de infecciones virales por la transfusión de sangre. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2006 Ago [citado 2019 Ene 15] ; 22(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200002&lng=es.
27. Blejer J, Carreras L, Salamone H. Riesgo de transmisión de infecciones por vía transfusional. *Medicina*. 2002; 62(3): 259-78.http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol62-02/3/v62_n3_p259_278.pdf
28. Koneman E, Allen S, Janda W, Shreckenber P, Winn W. *Diagnóstico Microbiológico*. 6a ed. Buenos Aires. Edit. Médica Panamericana. 2006.
29. Macalupú, Susana Zurita. "Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.2018; 35:126-131.
30. Siri L, et al. Cambios clínicos y epidemiológicos de candidemias en pacientes adultos desde 2000 a 2013. *Rev chilena de infectología*, 2017; 34(1): 19-26. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n1/art03.pdf>
31. Laforet L. Estudio de pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *candida albicans* [T. doctoral].Valencia España: Universidad de Valencia; 2010. Disponible: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/31891/laforet.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
32. Blanco T. Etioepidemiología y factores de virulencia en *Candida* spp. Aisladas de hemocultivos. [T. doctoral]. Badajoz España: Universidad de Extremadura; 2014. Disponible en : http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/1684/TDUEX_2014_Blanco_Blanco.pdf?sequence=1&isAllowed=y

33. Gaur N, Klotz S. Expresión, clonación, y caracterización de un gen *Candida albicans* ALA1, que confiere propiedades de adherencia a *Saccharomyces cerevisiae* para proteínas de la matriz extracelular. *Infect. Immun.* 1997; 65: 5289- 5294. Disponible en: <https://iai.asm.org/content/iai/65/12/5289.full.pdf>
34. Naglik J, Challacombe S, Hube B. Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67, (3): 400-428. Disponible en <https://mmlbr.asm.org/content/mmlbr/67/3/400.full.pdf>
35. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 2004. 6(10): p. 915-26.
36. Salas I, García J, Miranda K. Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. *Rev. costarric. cienc. méd [Internet]*. 2000 June [cited 2020 Feb 06]; 21(1-2): 43-49. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482000000100004&lng=en
37. Castillo G, Azcurra A, Sotomayor C. Lipasas de especies candida: una revisión sobre aspectos bioquímicos, moleculares y patogénicos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*. 2019; 76(2): 107-112 <https://revistas.psi.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/23822>
38. Chandra J, *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 5385-5394. Disponible en : <https://jb.asm.org/content/jb/183/18/5385.full.pdf>
39. Velazco G, Ortiz R, Arellano L, Bustillos L, González A. Evidencia microscópica de la presencia de *Candida albicans* en bases protésicas retiradas de la cavidad bucal. *Rev Cubana Estomatol [Internet]*. 2009 Feb [citado 2019 Mar 12]; 46 (2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072009000200007&lng=es
40. Soll, David R. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology*. 1997; 143 (2): 279-288. <https://pdfs.semanticscholar.org/d23a/6ca6bdd84198f19cd57f229fa954affff64.pdf>

41. Klotz S, Drutz D, Zajic J. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.* 1985; 50: 97-101. Disponible en <https://iai.asm.org/content/iai/50/1/97.full.pdf>
42. Del Palacio A, Villar J, Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(1):2-7 Disponible: en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140609700026>
43. Matthews R. Pathogenicity of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy. *Clin Microbiology Rev.* 1994; 140: 1505-1511 Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/13500872-140-7-1505>
44. Larrondo R, González A, Hernández L. Micosis superficiales: Candidiasis y pitiriasis versicolor. *Rev Cubana Med Gen Integr [Internet].* 2001 Dic [citado 2019 Jun 12]; 17(6): 565-571. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252001000600010&lng=es.
45. Puerto J.L., García-Martos P., Márquez A., García-Agudo L., Mira J.. Candidiasis orofaríngea. *Rev Diagn Biol [Internet].* 2001 Dic [citado 2019 Jun 12]; 50(4): 177-181. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000400001&lng=es.
46. Maya-Rico Ana María, Cardona-Castro Nora. Candidiasis mucocutánea crónica: una mirada al entendimiento genético. *Iatreia [Internet].* 2018 Dic [citado 2019 Jul 15]; 31(4): 393-399. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932018000400393&lng=es. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.iatreia.v31n4a06>.
47. Villanueva J, Arenas R. Candidiasis mucocutánea. *Revista Mexicana de Micología.* 2007; 25: 91-104. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/883/88302515.pdf>
48. Moreno M, Moreno O. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. *Acta méd. Peru [Internet].* 2017 Oct [citado 2019 Ago 12]; 34(4): 289-293.

Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172017000400006&lng=es.

49. Barahona J, *et al.*. Epidemiology of Candidemia at a University Hospital in Colombia, 2008-2014. *Univ. Med.* [Internet]. 2019 Mar [cited 2019 Aug 15]; 60(1): 3-11. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-08392019000100003&lng=en. <http://dx.doi.org/10.11144/javeriana.umed60-1.cand>.

50. Mendoza M. Importancia de la identificación de levaduras *Rev. Soc. Ven. Microb.* 2005; 25 (1):103-117. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199416547004.pdf>

51. Zurita S, Urcia F. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. 2017. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2017. <https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/915/Manual%20de%20procedimientos%20tecnicos%20para%20el%20diagnostico%20micologico.final.pdf?sequence=en>:

52. Castillo E. "estudio comparativo de algunos métodos macro y microscópicos para el aislamiento y reconocimiento del género candida." *Revista colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* [En línea], 1973: 33-57. Web. 6 feb. 2020
Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56724>

53. Camaró M, *et al.* Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2015; 33 (7), e31-e36. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>

54. Bravo S, Cruz J. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Rev. chil. radiol.* [Internet]. 2015 [citado 2019 Sep 25]; 21(4): 158-164. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-93082015000400007&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-93082015000400007>.

55. Salech F, Mery V, Larrondo F, Rada G. Studies about diagnostic tests: interpreting the results. Rev. méd. Chile [Internet]. 2008 Sep [citado 2019 Nov 25] ; 136(9): 1208-1208. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872008000900018&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872008000900018>.
56. López I, Pita S. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. Cad Aten Primaria. 1999; 6: 169-71. Disponible en <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa.asp>
57. ARIAS J, et al. ¿Qué se entiende por un huevo fresco? TecnoVet. 1998; 4(3).
58. Ganon, W. F. Fisiología médica, 17^o Edición, Ed. *El Manual Moderno, SA de CV, México DF*, 1996
59. Oneeglio, A. G., & Cruz, N. B. Preparación de medios de cultivo y reactivos para el laboratorio de microbiología clínica.
60. Sampieri, R, et al. *Metodología de la investigación*. Vol. 6. México, DF: Mcgraw-hill, 1998.
61. Alarcón G, Albornoz, Prado J. Metodología de la investigación científica en salud. 1 ed. Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizan; 2009.
62. Delgado M. Estrategias de investigación. Diseños observacionales 1 parte. Estudios descriptivos. La Revista Chilena. 2001: 53 (2): 229-233. Disponible en <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=629ES5GlrEIC&oi=fnd&pg=PA229&dq=Estrategias+de+investigaci%C3%B3n.+Dise%C3%B1os+observacionales+1+parte.+Estudios+descriptivos&ots=GwML0hsW1L&sig=5uXzIjvWb0PU2igkxJqMJxEXtAk#v=onepage&q=Estrategias%20de%20investigaci%C3%B3n.%20Dise%C3%B1os%20observacionales%201%20parte.%20Estudios%20descriptivos&f=false>

63. Manterola Carlos, Otzen Tamara. Observational Studies: The Most Commonly Used Designs in Clinical Research. Int. J. Morphol. [Internet]. 2014 Jun [citado 2020 Ene 25] ; 32(2): 634-645. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022014000200042&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000200042>

ANEXOS:

6.1 Matriz de consistencia

TITULO	FORMULACIÓN	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS	Tipo y nivel		
	RENDIMIENTO DE LA PRUEBA DEL TUBO GERMINATIVO CON ALBUMINA DE HUEVO EN LA IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> , 2020*	¿Cuál será el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> , 2019?	Evaluar el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .	<p>Ha: El rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo es aceptable según los criterios de la SEIMC en la identificación de <i>Candida albicans</i>.</p> <p>Ho: El rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo no es aceptable según los criterios de la SEIMC en la identificación de <i>Candida albicans</i>.</p>	La presente investigación es de tipo cuantitativa, de corte transversal, según el alcance de sus resultados es observacional analítica.	
Problemas específicos		Objetivos específicos	Variable		Dimensiones	Indicadores
¿Qué sensibilidad tendrá la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> ?		Calcular la sensibilidad de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .	Rendimiento		Características Biológicas	Sensibilidad
¿Qué especificidad tendrá la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> ?		Calcular la especificidad de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .				Especificidad
¿Cuál será porcentaje de falsos positivos de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> ?		Calcular el Valor Predictivo Positivo de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .				Falso positivo
¿Cuál será el porcentaje de falsos negativos de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> ?		Calcular el Valor Predictivo Negativo de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .				Falso negativo
¿Cuál será la eficiencia de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> ?		Calcular la eficiencia de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .				Eficiencia
¿Existirá concordancia entre el rendimiento de la prueba del tubo germinativo con albúmina de huevo en comparación al rendimiento de la prueba del tubo germinativo con suero humano en la identificación de <i>Candida albicans</i> ?		Calificar el nivel de concordancia de la albúmina de huevo en comparación al suero humano en la prueba del tubo germinativo en la identificación de <i>Candida albicans</i> .				Concordancia

6.2 Matriz de Operacionalización:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de	escala de	Dimensión	Indicadores	Índice	Instrumento	Valores
----------	-----------------------	------------------------	---------	-----------	-----------	-------------	--------	-------------	---------

				variab le	medic ión					
Variable Independiente	Prueba del tubo germinativo con albumina de huevo.	Desarrollo de prolongación filamentosa proveniente de la célula levaduriforme sin constricción en el punto de origen.	---	Categoría	Nominal	características microscópicas	Tamaño del tubo germinal	presencia o ausencia	Observación directa	3 a 4 veces tamaño de la levadura
							Porcentaje del tubo germinal	presencia o ausencia	Observación directa	mayor al 5%
Variable Dependiente	Rendimiento	Utilidad o producto que da algo.	Utilidad del medio para detectar el desarrollo de tubo germinativo permitiendo la identificación de <i>Candida albicans</i> .	Cuantitativo	Continua	Características biológicas	sensibilidad	Proporción de muestras positivas y responden positivamente	$(VP/(VP+FN)) \times 100$	> a 90%
							especificidad	proporción de muestras negativas y dan resultados negativos	$(VN/(VN+FP)) \times 100$	> a 90%
							Falsos positivos	Proporción de resultados falsos positivos	$(FP / (VP+FP)) \times 100$	< a 10%
							Falsos negativos	Proporción de resultados falsos negativos	$(FN / (FN+VN)) \times 100$	< a 10%
							Eficiencia	Proporción total de del número de resultados correctos	$((VP +VN) /n) \times 100$	> a 90%
							Nivel de concordancia	Índice Kappa de Cohen	$K = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$	0,00 Pobre 0,01 - 0,20 Leve 0,21 - 0,40 Aceptable 0,41 - 0,60 Moderada 0,61 - 0,80 Considerable 0,81 - 1,00 Casi perfecta

6.3 Agar Sabouraud Glucosado

La peptona es usada como fuente de nitrógeno, la glucosa como fuente de energía el agar le brinda la consistencia necesaria al medio.

Formula:

PEPTONA.....5.0

TRIPTEINA.....5.0

GLUCOSA.....40.0

CLORANFENICOL.....0.05

AGAR.....15.0

pH FINAL: 5.6 +/- 0.2

El medio se prepara con 65g del polvo en 1 L de agua purificada, se espera 5 minutos y luego se mezcla hasta homogenizar; luego se procede a calentar agitando constantemente y hervir por 1 minuto para disolver por completo.

Se procede a esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos y se distribuye en tupos en pico flauta o placas Petri estériles.

6.4 Control de calidad, prueba de rendimiento y control de esterilidad

- **Control de calidad:**

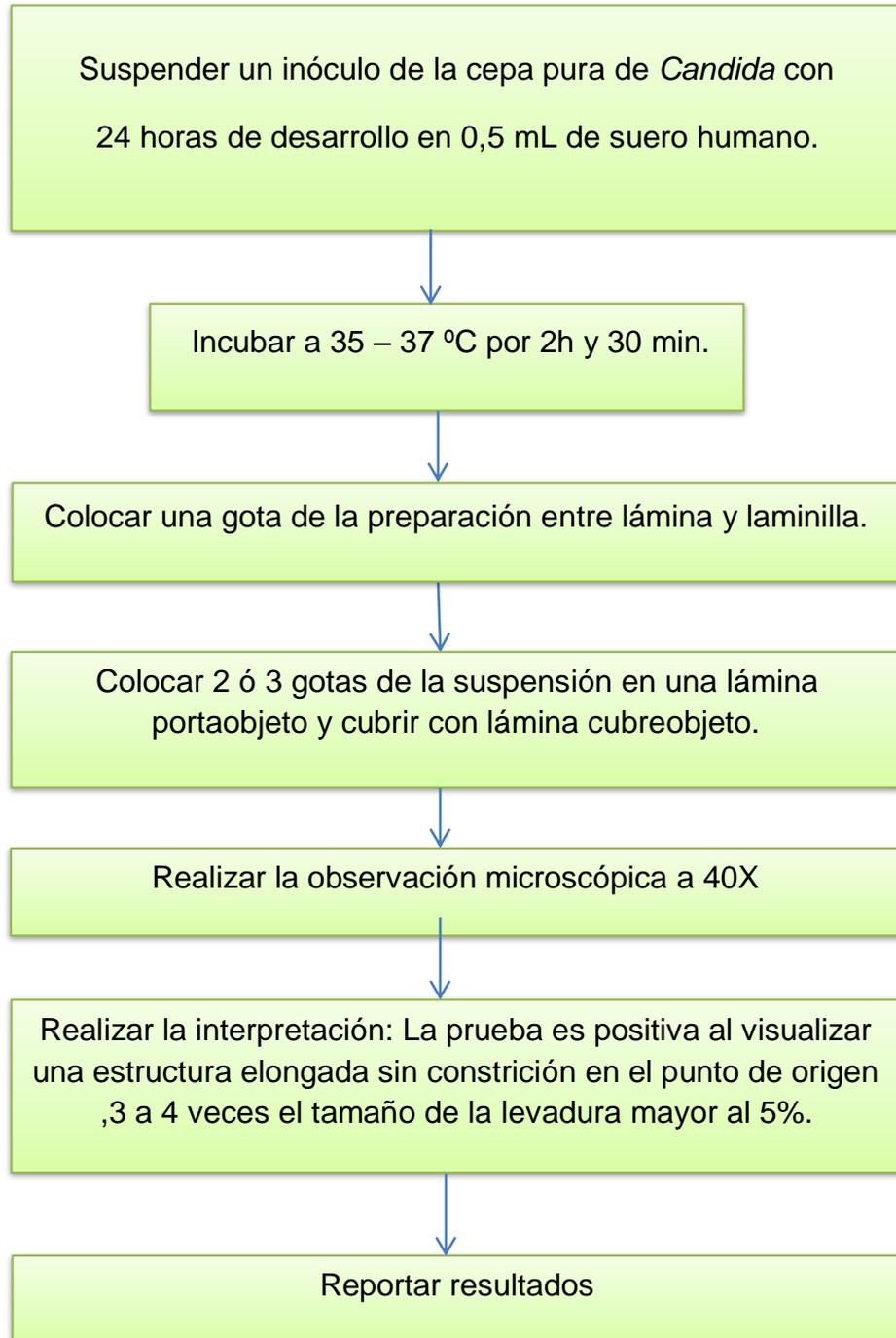
Todos los medios se prepararán de acuerdo a las especificaciones del fabricante y serán sometidos a control de calidad que incluye los siguientes:

- **Control de esterilidad;** Se incuba el 5% de las unidades a 35°C por 48 horas. Debe desecharse todo el lote cuando haya más de un 10 % de placas contaminadas.⁶⁰
- **Apariencia y color:** se debe observar que no haya precipitados o signos de deshidratación, así como controlar el pH del medio. El aspecto debe ser color ámbar claro, ligeramente opalescente.⁶⁰
- **Control de crecimiento y prueba del rendimiento del medio:** Los medios deben mostrar ser capaces de cumplir con las características de crecimiento y desarrollo específicas para cada especie según las especificaciones del fabricante, para ello se usa cepas de referencia positivas y negativas para las características del medio. El lote preparado será aceptable si el desarrollo bacteriano es confluyente con la especie ensayada.⁶⁰

- **Almacenamiento:** las placas preparadas se almacenarán ente 2° y 8°C.

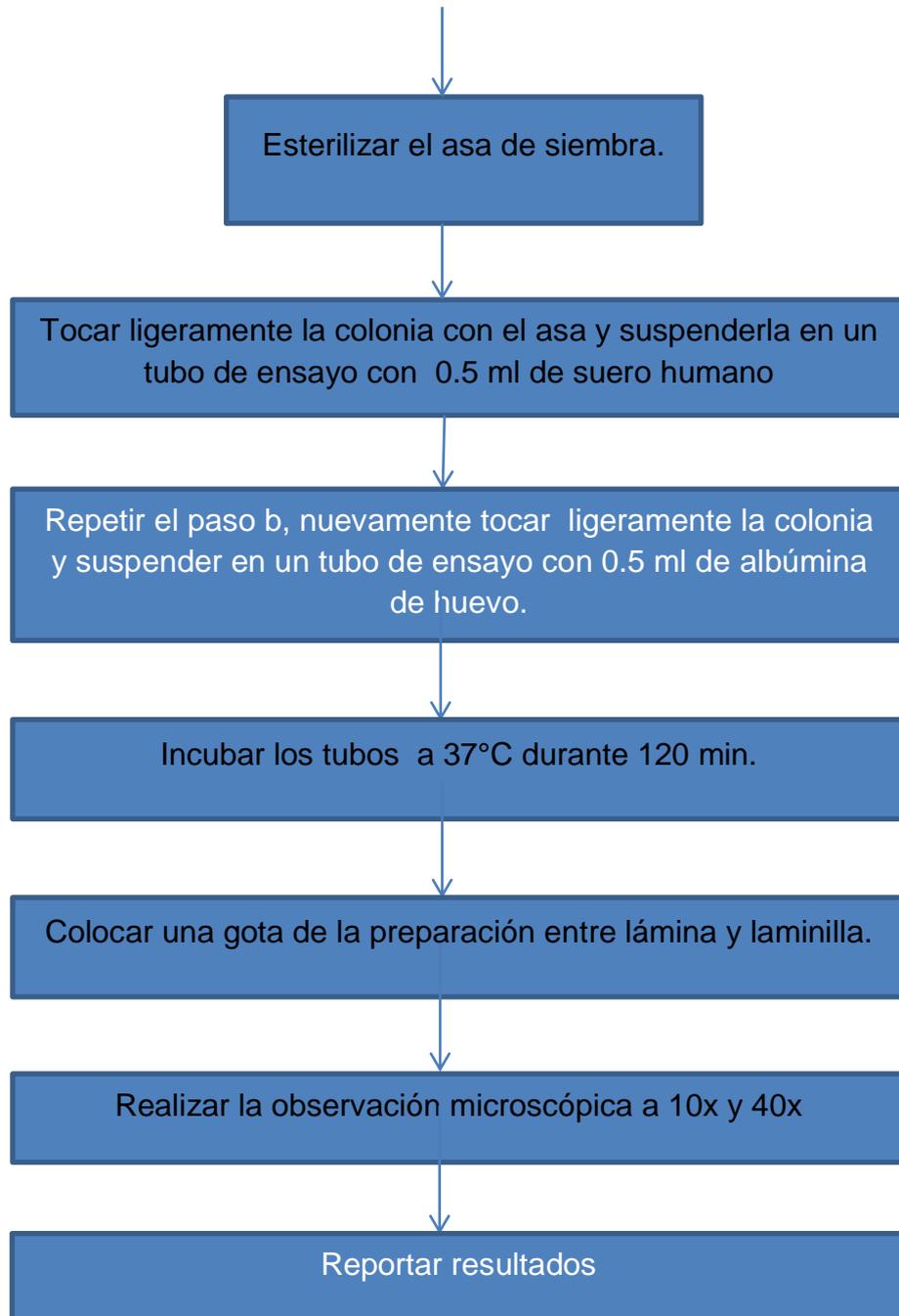
6.5 Procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas según el Instituto Nacional de salud.⁵¹

- a) Técnica del tubo germinativo: Permite determinar la diferenciación de *Candida albicans* de las no albicans.



6.6. Flujograma





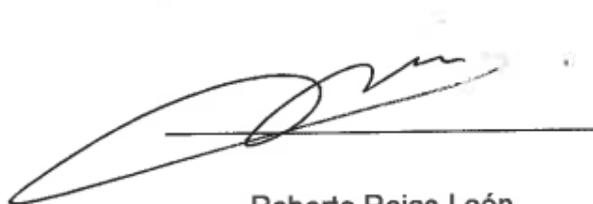
6.7 Ficha de registro de resultados: Albúmina de huevo

	Prueba de tubo germinativo con albumina de huevo para la identificación de <i>Candida albicans</i>.		
	Fecha:		
	T° : 37°C	Tiempo:	2 horas
	Muestra	Albumina de huevo	Suero humano
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			

6.8 Autorización para el uso de cepas:

Consentimiento para el uso de las cepas

Mediante el presente documento, yo Roberto Rojas León, identificado con DNI N° 06134815 y CTMP N° 0402, autorizo a las Bachilleres: Liliana Verónica Arenas Pillco, identificada con DNI N° 48311605 y a Ruth Victoria Rosas Paytan, identificada con DNI N° 43691826 hacer uso de las 118 cepas de *Candida albicans*, 4 cepas de *Candida krusei*, 4 cepas de *Candida tropicalis* y 4 cepas de *Candida parapsilosis* provenientes de una micoteca personal, las mismas que previamente fueron identificadas y almacenadas, con el único fin de explorar o examinar un problema y plantear una situación de solución para brindar nuevos conocimientos.

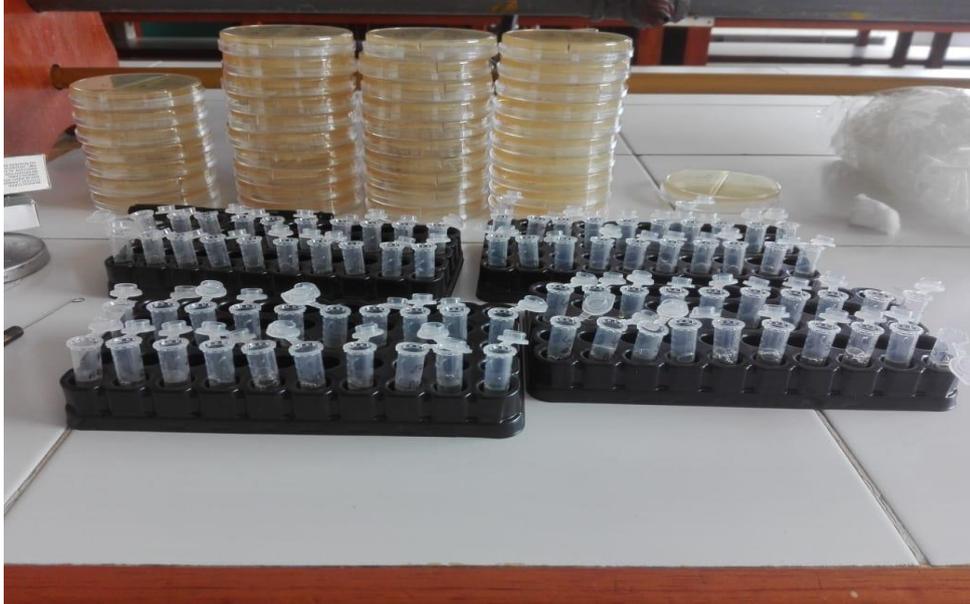


Roberto Rojas León

DNI N° 06134815 - CTMP N° 0402

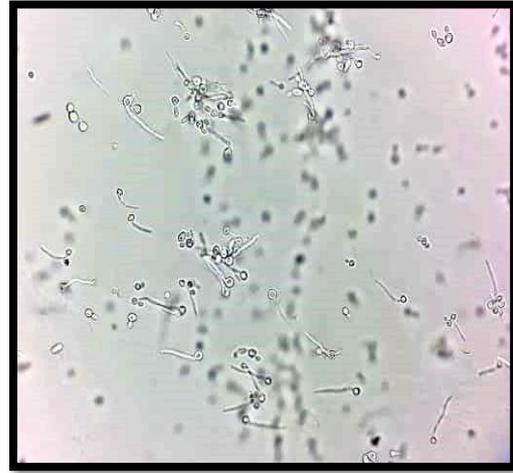
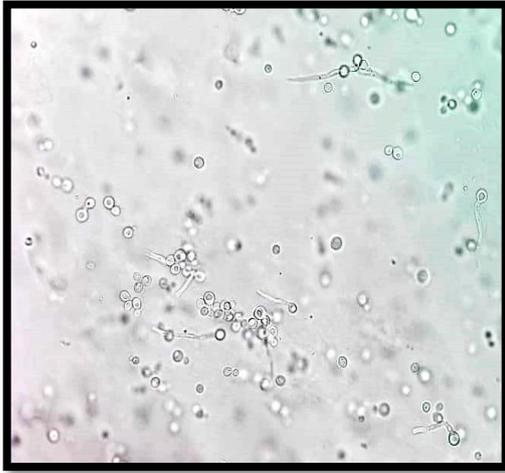
Imágenes del procedimiento y lectura de las pruebas





RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL TUBO GERMINATIVO

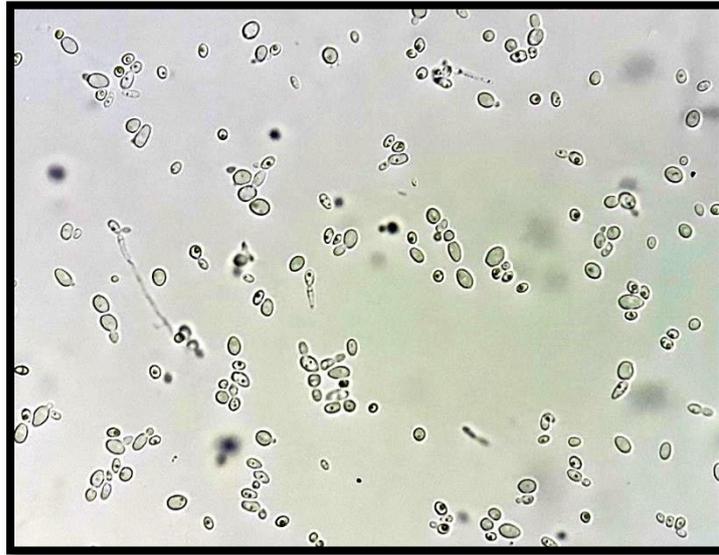
Candida albicans en la prueba de tubo germinativo con albumina de huevo realizado en criovial después de 2h de incubación a 37°C.



Candida albicans en la prueba de tubo germinativo con suero humano realizado en criovial de 2 horas de incubación a 37°.



Candida tropicalis observados en albumina de huevo después de 2 horas de incubación a 37°.



Candida tropicalis observados en suero humano después de 2 horas de incubación a 37°.



Candida parapsilosis observados en suero humano después de 2 horas de incubación a 37°.



Candida parapsilosis observados en albumina de huevo después de 2 horas de incubación a 37°.



Candida krusei observados en albumina de huevo después de 2 horas de incubación a 37°.



Candida krusei observados en suero humano después de 2 horas de incubación a 37°.



METODO DIRECTO: LÁMINA Y LAMINILLA

Candida albicans en la prueba de tubo germinativo con suero humano realizado en el método de lámina y laminilla luego de 2 horas de incubación a 37°.



Candida albicans en la prueba de tubo germinativo con albumina de huevo realizado en el método de lámina y laminilla luego de 2 horas de incubación a 37°.

