



Original

## Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar

Claudia Alfonso<sup>a</sup>, Mónica López<sup>b</sup>, Alicia Arechavala<sup>c,\*</sup>, María del Carmen Perrone<sup>d</sup>, Liliana Guelfand<sup>e</sup>, Mario Bianchi<sup>c</sup> y los integrantes de la Red de Micología del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires<sup>♦</sup>

<sup>a</sup> Hospital Santojanni, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Hospital Muñiz, Buenos Aires, Argentina

<sup>d</sup> Hospital Penna, Buenos Aires, Argentina

<sup>e</sup> Hospital Fernández, Buenos Aires, Argentina

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 2 de septiembre de 2009

Aceptado el 21 de enero de 2010

On-line el 24 de marzo de 2010

#### Palabras clave:

Brilliance Candida Agar

Agar cromogénico

CHROMagar

*Candida* spp.

Identificación presuntiva

### RESUMEN

En las últimas décadas se ha observado un incremento de las infecciones fúngicas invasoras ocasionadas por levaduras. Aunque *Candida albicans* es el principal aislamiento de muestras clínicas, ha aumentado la proporción de afecciones debidas a otras especies de *Candida* y levaduras pertenecientes a otros géneros. La aparición de un mayor número de aislamientos resistentes a diversos antifúngicos obliga a una identificación presuntiva rápida de estos microorganismos para poder instaurar el tratamiento antimicótico adecuado.

El empleo de diferentes medios de cultivo con sustratos cromogénicos ha demostrado su indudable valor como herramienta para el diagnóstico presuntivo de levaduras. Con el objetivo de evaluar la utilidad del medio cromogénico Brilliance Candida Agar en comparación con otro de uso habitual en nuestro país, CHROMagar Candida, se organizó un estudio multicéntrico en 16 hospitales de la Red de Micología del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires (Argentina). Se estudiaron 240 cepas provenientes de materiales clínicos y los resultados obtenidos con el Brilliance Candida fueron comparables a los del CHROMagar.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Presumptive identification of *Candida* spp. and other clinically important yeasts: usefulness of brilliance™ candida agar

### ABSTRACT

Fungal infections caused by yeasts have increased during the last decades and invasive forms represent a serious problem for human health. *Candida albicans* is the species most frequently isolated from clinical samples. However, other emerging yeast pathogens are increasingly responsible for mycotic infections, and some of them are resistant to some antifungal drugs. Consequently, it is necessary to have methods that can provide a rapid presumptive identification at species level.

Numerous chromogenic agar media have been shown to be of value as diagnostic tools. We have compared a chromogenic medium, Brilliance Candida Agar, with CHROMagar Candida, the chromogenic medium most used in our country. A multicentre study was conducted in 16 Hospitals belonging to the Mycology Net of Buenos Aires City Government. A total of 240 yeast isolates were included in this research. The new chromogenic agar showed results very similar to those obtained with CHROMagar Candida.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

Brilliance Candida Agar

Chromogenic agar

CHROMagar

*Candida* spp.

Presumptive identification

Las infecciones fúngicas ocasionadas por levaduras son muy frecuentes en las últimas décadas, y *Candida* spp. está en el cuarto

lugar entre los microorganismo aislados de hemocultivos en Estados Unidos<sup>19</sup> y en el quinto en España como agente etiológico de sepsis<sup>21</sup>. *C. albicans* causa el 50–60% de las candidemias seguida de *C. parapsilosis* (10–20%) y *C. tropicalis* (6–7%). En Argentina, las fungemias causadas por levaduras fueron predominantes (33,76%) entre las infecciones sistémicas oportunistas<sup>6</sup> y las formas invasoras presentan una elevada mortalidad constituyendo un

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: hmmicologia@intramed.net (A. Arechavala).

♦ El listado de los miembros de la Red de Micología del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires se presenta en el anexo I.

grave problema de salud pública<sup>2,7,11</sup>. Las afecciones producidas por levaduras se han incrementado paralelamente con el aumento de patologías tales como sida, trasplantes de médula ósea o de órganos sólidos, internaciones prolongadas en unidades de cuidados intensivos, cirugías abdominales, tratamientos con antibióticos, corticoides, quimioterapia u otras drogas, etc<sup>18</sup>.

*Candida albicans* continúa siendo el aislamiento clínico más frecuente, pero la emergencia de otras levaduras, principalmente aquellas que demuestran mayor resistencia a algunos antifúngicos, hace imprescindible la identificación rápida a nivel de especie de estos microorganismos<sup>10,20,22</sup>.

La incorporación de medios con sustratos cromogénicos ha sido un gran adelanto en la identificación presuntiva de levaduras<sup>3–5,9</sup> a la vez que ha permitido reconocer la presencia simultánea de 2 o más especies en una misma muestra clínica. La orientación acerca del microorganismo involucrado permite seleccionar el antifúngico más adecuado hasta que se realice la identificación definitiva<sup>3,5,10</sup>.

En nuestro país se comercializan desde hace tiempo CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (CHROMagar Company Ltd., Francia) y *Candida* ID2<sup>®</sup> (bioMérieux, Francia). Durante el último año se ha incorporado Brilliance<sup>®</sup> *Candida* Agar (Oxoid, Reino Unido).

El fundamento de estos medios es la inclusión de sustratos cromogénicos que, ante la presencia de actividad enzimática específica de las levaduras, producen un color determinado. Las enzimas que se revelan son hexosaminidasa y fosfatasa alcalina; la primera está presente en *Candida tropicalis*, *C. albicans* y *Candida dubliniensis*, en tanto que *Candida krusei* posee fosfatasa alcalina; otras especies también pueden presentar discreta actividad de esta última enzima y la variación en la tonalidad depende del sustrato cromógeno y la pigmentación natural de la levadura.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad del medio cromogénico de Oxoid para la identificación presuntiva de levaduras en comparación con CHROMagar *Candida* mediante un estudio multicéntrico llevado a cabo en 16 hospitales de la Red de Micología del Gobierno de la ciudad de Buenos Aires (GCBA).

## Materiales y métodos

Levaduras estudiadas: se incluyeron en total 240 aislamientos: 46 *C. albicans*, 6 *C. dubliniensis*, 34 *C. tropicalis*, 34 *Candida parapsilosis*, 36 *C. krusei*, 35 *Candida glabrata*, 9 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida inconspicua*, 2 *Candida lipolytica*, 16 *Trichosporon* spp., 7 *Saccharomyces* spp. y 14 *Cryptococcus neoformans*. Las levaduras provenían de muestras clínicas de pacientes de tres Hospitales del GCBA, F. J. Muñiz, J. Fernández y P. de Elizalde, y habían sido previamente identificadas por métodos convencionales.

Como control se incluyeron las siguientes cepas: ATCC 22019 (*C. parapsilosis*), ATCC 6258 (*C. krusei*), ATCC 90028 y ATCC 90029 (*C. albicans*), CECT 11473 y NCPF 3949 (*C. dubliniensis*).

Siembra e incubación: todas las cepas se subcultivaron en medio de agar glucosado de Sabouraud y se incubaron a 28 °C durante 24–48 h. Se realizaron suspensiones de las levaduras en solución fisiológica que se ajustaron al n.º 2 de la escala de Mc Farland, y se repicaron simultáneamente a placas de Brilliance *Candida* Agar (BCA) y CHROMagar *Candida* (CHM). Las placas se incubaron a 28 °C durante 6 días y fueron observadas diariamente.

Los dos medios fueron preparados según las especificaciones de los fabricantes. Para evitar diferencias en la preparación del medio BCA, las placas fueron preparadas únicamente en la Unidad Micología del Hospital Muñiz y distribuidas a cada integrante de la red; el CHM fue preparado en cada hospital.

Identificación de las levaduras utilizadas: las identificaciones de las 240 levaduras fueron realizadas por medio de las pruebas comerciales de API ID32C, API 20C, VYTEC (bioMérieux, Francia) o

(MicroScan<sup>®</sup>/Dade-Behring, EE. UU.) Como pruebas diferenciales se observaron macromorfología de las colonias en medio de Sabouraud glucosado, la micromorfología en agar harina de maíz con Tween 80 o agar leche-Tween 80, el crecimiento a distintas temperaturas, la producción de ureasa en medio de Christensen, y la de fenoloxidasa en medio de girasol, además de realizar y pruebas complementarias cuando fue necesario<sup>13,17,18</sup>. Se distribuyeron 15 aislamientos codificados (a ciego) y 2 cepas de referencia a cada centro.

Los datos se recopilaron en una planilla de Excel donde se consignaron las características de color y aspecto de las colonias en ambos medios cromogénicos a las 24 h, 48 h, 72 h y 6 días.

Los colores y aspectos de las colonias definidos por los fabricantes para algunas especies del género *Candida* son:

BCA: *C. tropicalis*: colonias cremosas de bordes lisos y azul oscuro. *C. albicans* y *C. dubliniensis*: colonias verdes, cremosas y de bordes lisos; *C. krusei*: colonias secas de bordes irregulares y rosadas. El color de las demás especies varía del beige al marrón.

CHM: *C. tropicalis*: colonias azules cremosas de bordes lisos; *C. albicans* y *C. dubliniensis*: colonias cremosas de bordes lisos y color verde; *C. krusei*: colonias rosas de aspecto seco con bordes irregulares. En las demás especies se observan colonias de tonalidades entre el crema y el violeta.

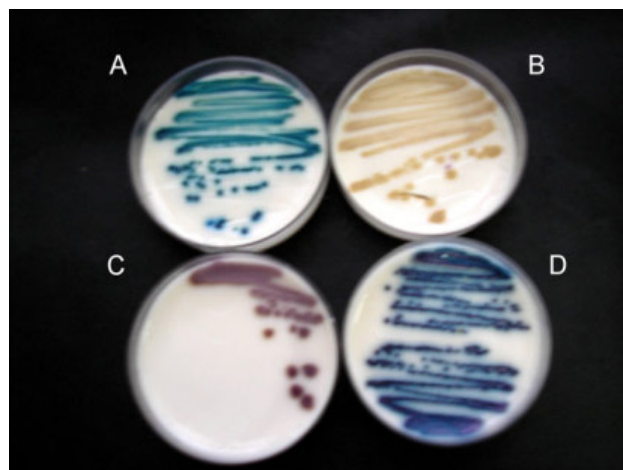
El desarrollo de algunas especies se presenta en la figura 1.

Análisis de los datos: se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para las especies que diferencian estos medios (BCA y CHM), y luego se calculó el coeficiente Kappa<sup>15,16</sup> para ver la concordancia entre los resultados obtenidos con ambos medios.

## Resultados

Los datos de identificación presuntiva de las 240 cepas de levaduras estudiadas con ambos medios cromogénicos se presentan en la tabla 1.

En la tabla 2 se muestran los valores porcentuales de comparación de sensibilidad, especificidad, de valor predictivo positivo y valor predictivo negativo con ambos medios cromogénicos. Tanto en el agar BCA como en el CHM se observó que las cepas de *Trichosporon* spp. presentaron colonias cerebriformes y de aspecto aterciopelado, de color azul-verdoso que ayudaron a su identificación. Las colonias de *C. neoformans* fueron todas de color beige y de aspecto cremoso o mucoso, en



**Figura 1.** Color y aspecto de las colonias de levaduras en medio Brilliance *Candida* Agar (Oxoid) A) *Candida albicans*. B) *Candida parapsilosis*. C) *Saccharomyces cerevisiae*. D) *Candida tropicalis*.

**Tabla 1**  
Resultados de color y aspecto obtenidos con CHROMagar Candida y Brilliance Candida Agar de los 240 aislamientos estudiados, en comparación con lo indicado por los fabricantes

Especie	n	Agar CHM		Agar BCA	
		Color y aspecto	n (%)	Color y aspecto	n (%)
<i>C. albicans/C. dubliniensis</i>	52	Verde cremosa	51 (98,1)	Verde cremosa	44 (84,6)
<i>C. tropicalis</i>	34	Azul cremosa	23 (67,6)	Azul cremosa	21 (61,2)
<i>C. krusei</i>	36	Rosa seca y borde rugoso	32 (88,9)	Rosa seca y borde rugoso	35 (97,2)
Otras especies de <i>Candida</i>	81	Marfil a violeta	75 (92,6)	Crema a marrón intenso	79 (97,5)
Otros géneros					
<i>Trichosporon</i> spp.	16	Azul claro cerebriforme y micelio aéreo	12 (75,0)	Azul claro cerebriforme y micelio aéreo	14 (87,5)
<i>Saccharomyces</i> spp.	7	Violeta cremosa	7 (100,0)	Morada cremosa	7 (100,0)
<i>C. neoformans</i>	14	Beige mucosa	12 (86,0)	Beige mucosa	12 (86,0)

BCA: brilliance Candida Agar; CHM: cHROMagar Candida.

**Tabla 2**  
Comparación de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo entre CHROMagar Candida y Brilliance Candida Agar

	S		E		VPP		VPN	
	CHM	BCA	CHM	BCA	CHM	BCA	CHM	BCA
<i>C. albicans/C. dubliniensis</i>	98,1	84,6	96,3	91,5	88,0	73,3	99,4	95,5
<i>C. tropicalis</i>	67,6	61,2	99,0	98,0	92,0	84,0	95,0	94,0
<i>C. krusei</i>	88,9	97,2	96,6	99,0	82,0	94,6	98,0	99,5
Otras levaduras	92,1	97,0	97,8	98,5	97,0	98,0	94,0	97,8

BCA: brilliance Candida Agar; CHM: cHROMagar Candida; E: especificidad; S: comparación de sensibilidad; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

tanto que las colonias de *Saccharomyces* spp. presentaron un color violeta o marrón intenso.

El índice de concordancia entre los resultados obtenidos con ambos medios fue de 0,67 que, según Landis y Koch<sup>16</sup>, corresponde a un grado de acuerdo sustancial (0,60-0,80).

## Discusión

El uso de medios con sustratos cromogénicos ha sido un gran avance en el reconocimiento temprano de distintas especies de levaduras, en especial para distinguir *C. albicans* del resto, como así también para observar la presencia de más de una especie en una misma muestra clínica<sup>20</sup>. De esta forma se puede orientar rápidamente la terapéutica antifúngica más adecuada hasta tener la tipificación definitiva. En este estudio comparamos la capacidad de identificación presuntiva de un nuevo medio cromogénico (Brilliance Candida Agar, Oxoid) con CHROMagar Candida que se utiliza habitualmente en los laboratorios de Microbiología en nuestro país. Pudimos observar que ambos medios son útiles para la identificación presuntiva de varias especies de *Candida* tal como lo especifican los respectivos fabricantes.

La preparación del nuevo medio BCA es sencilla y el fondo blanco opaco permite una buena observación de los colores. Los sustratos cromógenos que utiliza para evidenciar la actividad enzimática de las levaduras son el 5-bromo-4-cloro-3-indol N-acetil βD-glucosaminidasa (X-NAG) que detecta la actividad de la enzima hexosaminidasa presente en *C. tropicalis* y en *C. albicans/C. dubliniensis*, y el 5-bromo-6 cloro-3-indol fosfatasa p-toluidina (BCIP), que detecta la actividad de la fosfatasa alcalina presente en *C. krusei*. Además cuenta con otros sustratos que hacen que, en lugar de azul, *C. albicans/C. dubliniensis* aparezcan de color verde. En este nuevo medio existen levaduras que presentan

una gama que va del crema al marrón debido a la existencia de pigmento natural y algún grado de actividad fosfatasa alcalina. Por su parte, en CHM las mismas levaduras se observan en la gama de los rosados (de crema a violeta)<sup>1</sup>.

El tiempo óptimo del desarrollo del color de las colonias con ambos medios fue de 72 h. Entre las 24-48 h es posible confundir algunas cepas entre *C. albicans/C. dubliniensis* y *C. tropicalis*.

En ninguno de los dos medios pudo diferenciarse claramente *C. albicans* de *C. dubliniensis*, como postulan algunos autores<sup>20</sup> ni como se podría hacer con *Candida* ID2<sup>9</sup>. El aspecto seco y de bordes festoneados de las colonias de *C. krusei* fue el elemento distintivo que caracterizó a esta levadura y permitió identificarla fácilmente en ambos medios.

El uso sistemático de algún agar cromogénico facilita la identificación presuntiva, ya que un observador experimentado se orienta hacia alguna especie de levadura de acuerdo con la tonalidad o el aspecto a fin de ayudar a instaurar una terapéutica adecuada. Por otra parte también se pudo evidenciar que microorganismos como *Trichosporon* spp. presentan características culturales (aspecto cerebriforme y micelio aéreo corto) que los diferencian del resto, y *Saccharomyces* spp. mostró un color morado intenso en ambos medios, lo que permitió su sospecha. Esto coincide con los hallazgos de Ghelardi et al<sup>12</sup>, quienes también observan caracteres distintivos para *Trichosporon mucoides*, *C. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Geotrichum capitatum*.

Además, algunas investigaciones preliminares informaron que BCA permitiría a observadores experimentados diferenciar colonias de *C. glabrata*, *Candida kefyr*, *C. parapsilosis* o *Candida lusitanae*, pero que estos hallazgos deberían ser corroborados por nuevos estudios<sup>8</sup>. En nuestro caso, *C. glabrata* presentó tonalidades que variaron del dorado al ocre en tanto que los aislamientos de *C. parapsilosis* fueron desde el crema hasta el marrón-violáceo.

En este estudio pudimos comprobar que ambos medios son similares de acuerdo al grado de concordancia obtenido con el índice Kappa (0,67). Los datos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN no son tan elevados como los presentados por Carrillo-Muñoz et al<sup>4</sup>, que valoraron el medio Chromalbicans, un medio cromogénico específico para *C. albicans*. Debe tenerse en cuenta, además, que el BCA identifica presuntivamente otras especies de levaduras y que nuestro trabajo fue realizado en distintos centros, por lo que existen variaciones debidas a la subjetividad en la observación realizada por distintas personas, con la consiguiente disminución en el índice de concordancia.

La elección de BCA o CHM dependerá del costo y de las preferencias del operador, dado que ambos son fáciles de preparar y brindan resultados confiables para la identificación presuntiva, aunque debe recalarse la importancia de seguir las instrucciones

de preparación de los fabricantes<sup>14</sup> para evitar resultados erróneos.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

A la Dra. Adriana Bau de la Empresa Bioartis, por la provisión del medio Brilliance Chromogenic Agar para la realización de este trabajo en la Red de Micología del GCBA. A los doctores. Elena Eraso y Guillermo Quindós de la Universidad del País Vasco por facilitarnos las cepas de *Candida dubliniensis*.

### Anexo 1. Red de Micología del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Elsa Armentano (Hospital Rivadavia, Buenos Aires, Argentina), Susana Carabelli<sup>†</sup> (Hospital Tornú, Buenos Aires, Argentina), Silvana Cataldi (Hospital Durand, Buenos Aires, Argentina), María José Gallegos (Hospital Ferrer, Buenos Aires, Argentina), Claudia Garbasz (Hospital Pirovano, Buenos Aires, Argentina), Laura López Moral (Hospital Argerich, Buenos Aires, Argentina), Andrés Martínez Burkett (Hospital Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina), Patricia Minervini (Hospital Santa Lucía, Buenos Aires, Argentina), María del Carmen Morales (Hospital Piñero, Buenos Aires, Argentina), Rosana Pereda (Hospital Elizalde, Buenos Aires, Argentina), Ercilia Postai (Hospital Tornú, Buenos Aires, Argentina), Mariela Schijman (Hospital Álvarez, Buenos Aires, Argentina).

### Bibliografía

- Acosta G, Arteta Z, Ballesté R, Cabrera MJ, Cambol A, Fernández N, et al. Evaluación del medio Cromógeno CHROMagar Candida<sup>TM</sup> para la identificación de levaduras de interés médico. *Rev Med Urug.* 2005;21:186-93.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al., Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1829-35.
- Campbell CK, Holmes AD, Davey KG, Szekely A, Warnock DW. Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17:367-8.
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Cárdenes CD, Alonso Vargas R, Arévalo P, Brió S, et al. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18:105-8.
- Cooke V, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:3622-7.
- Davel G, Canteros C y participantes del Programa Nacional de Control de Calidad en Micología. Situación de las Micosis en Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39:28-33.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 1999;29:239-44.
- Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol.* 2005;43:565-84.
- Eraso E, Sahand IH, Villar-Vidal M, Marcos C, Moragues D, Madariaga L, et al. Usefulness of Candida ID2 agar for the presumptive identification of *Candida dubliniensis*. *Med Mycol.* 2006;44:611-5.
- Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001;39:9-33.
- Galván B, Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:12-5.
- Ghelardi E, Pichierri G, Castagna B, Barnini S, Tavanti A, Campa M. Efficacy of chromogenic *Candida* agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect.* 2007;14:141-7.
- Jitsuron S, Klamsini S, Pattararagron N. Milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida*. *Mycopathologia.* 1993;123:95-8.
- Koehler AP, Chu KC, Honang ET, Cheng AF. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999;37:422-6.
- Kramer M, Feinstein A. Clinical biostatistics. The bio-statistic of concordance. *Clin Pharmacol Ther.* 1981;29:111-2.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-74.
- Linares Sicilia MJ, Solís Cuesta F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC, editores. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. *Rev Iberoam Micol.* 2001. p. 1-18.
- Odds FC. *Candida* and Candidosis, 2nd ed. Londres: Bailliere Tindall; 1988.
- Pfaller MA, Jones R, Doren GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA, for the SENTRY participant group. International surveillance of bloodstream infection due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and south America for the SENTRY program. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1886-9.
- Pincus DH, Oregana S, Chatellier S. Yeast identification past, present, and future methods. *Med Mycol.* 2007;45:97-102.
- Pontón J, Ruíz Camps I. En: Ausina Ruíz V, Moreno Guillen S, editores. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Capítulo 60. Ed. Médica Panamericana; 2006. p. 617-24.
- Sanabria R, Samudio M, Fariña N, Laspina F, Ortellado de Canese J, Arbizu Ledesma G, et al. Identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ambulatorios, hospitalizados e inmunocomprometidos en Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2006;4:45-9.