UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"C U A U T I T L A N"

EVALUACION DEL MEDIO DE CULTIVO BISMUTO-GLICINA-GLUCOSA LEVADURA (Bi-GGY) Y AGAR SULFITO BISMUTO PARA LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO CANDIDA MAS COMUNES EN EL HUMANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

HERNANDEZ CUAUTLE SILVIA

MARTINEZ MORAN LUCILA JUANA

ASESOR: phD. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1 9 8 5

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Págs.

RESUMEN

1. INTRODUCCION.

1.A Clasificación 1

1.B Características generales ..... 2 - 5

1.C Cuadros clínicos ..... 5 - 7

1.D Patogenia ..... 7 - 8

1.E Diagnóstico ..... 9 - 12

1.F Tratamiento .....12 - 15

2. OBJETIVOS. 16

3. MATERIALES Y METODOS ..... 17 - 18

3.1 Pruebas para la identificación de especies del género Candida ..... 19 - 22

3.2 Estudio estadístico de Xi^2 22

3.3 Utilización de los medios de cultivo ..... 22 - 24

3.4 Evaluación de los medios Bi-GGY y Agar Sulfito Bismuto. 24 - 25

4. RESULTADOS:

4.1.a Identificación de las especies del género Candida ... 26, 27

4.1.b Detección de otros microorganismos 26

4.2.a Prevalencia de las especies de Candida más comunes en el humano 28

4.2.b Estudio estadístico de Xi^2 ..... 28 - 29

4.2.c Prevalencia de otros microorganismos 28, 30

Págs.

4.3 Evaluación del medio de cultivo Bi-GGY y Agar sulfito - Bismuto ..... 30 - 50

5. DISCUSION ..... 51 - 55

6. CONCLUSIONES 56

7. BIBLIOGRAFIA ..... 57 - 63

R E S U M E N

La Candidosis es una de las enfermedades micóticas más frecuentes que afecta a niños, jovenes y ancianos, principalmente a personas del sexo femenino. Una de las manifestaciones clínicas de la enfermedad que más se presenta es la vulvovaginitis producida por las levaduras del género Candida; siendo el principal agente etiológico Candida -- albicans.

Existe una gran variedad de criterios a seguir en cuanto al manejo de muestras sospechosas de Candidosis. A nivel de laboratorio -- clínico el crecimiento y cultivo de dichas muestras se lleva a cabo - en medios tales como Agar Sangre, Agar Chocolate y en especial en el medio de cultivo Bi-GGY. Esta práctica podría considerarse adecuada si además se llevara a cabo otras pruebas complementarias de identificación como son: Tubo Germinativo, Producción de Clamidosporas,- Crecimiento en pH ácido, Sensibilidad a la Actidiona, Fermentación - de Carbohídratos y Asimilación de Carbohídratos; ya que la mayoría de los organismos que crecen en el medio Bi-GGY produciendo una coloración cafe son diagnosticados e identificados como agentes de Candidosis -- iniciandose el tratamiento sin llevar a cabo un estudio confirmatorio.

En el presente trabajo, el principal objetivo es el evaluar la efectividad del medio de cultivo Bi-GGY en el diagnóstico e identificación de Candida aislada de muestras clínicas; utilizando para ello - 142 muestras de exudado vaginal, 3 de exudado faríngeo y una de piel humana.

Una de las características para el uso de este medio de cultivo es que no requiere de refrigeración. Evaluado en diferentes condiciones de almacenaje se observó que dicho medio no es eficaz para la identificación de Candida; ya que presentó gran variabilidad en el crecimiento, coloración, consistencia y forma entre las diferentes especies de este género y aún entre cepas de una misma especie.

Asimismo, se detectó la presencia de otros microorganismos diferentes a este género, como fué el caso de Torulopsis sp y Cryptococcus neoformans que fueron capaces de desarrollarse en el medio Bi-GGY.

Por otra parte, el Agar Sulfito Bismuto, un medio bacteriológico con propiedades similares al medio de cultivo Bi-GGY, es evaluado bajo las mismas condiciones de estudio estableciendo una comparación entre ambos.

El medio Agar Sulfito Bismuto no resultó ser adecuado para el crecimiento de las especies de Candida, pero no así para el desarrollo de otros microorganismos como fué el caso de Torulopsis sp.

Además, en este trabajo se muestrearon tres diferentes clínicas del Instituto Mexicano del Seguro Social y con la ayuda de un estudio estadístico de Xi^2, no se encontró diferencia significativa entre las clínicas en relación con las especies de Candida. Otro microorganismo identificado en dichas muestras fué Torulopsis sp, el cual presenta diferencias significativas en el estudio estadístico de Xi^2 entre las tres clínicas estudiadas.

1. INTRODUCCION

A.- Clasificación.

Los hongos son estructuralmente complejos, muestran una diversidad de formas reproductoras asociadas con procesos sexuales y asexuales, además de elementos vegetativos. Su diferenciación en géneros especies y variedad se hace en gran parte sobre las bases morfológicas[6]. Se dividen en 5 clases: Mastigomicotina, Ascomicotina, Basidiomicotina, Zigomicotina y Deuteromicotina (Fungi imperfecti)[8]. A -- esta última clase pertenecen la mayoría de los hongos patógenos al humano, entre los que se encuentran las levaduras del género Candida; - los cuales son organismos unicelulares o filamentosos con formación - de pseudomicelio o micelio septado, reproducción asexual y en algunas especies la reproducción sexual[8].

Este género esta constituido por 155 especies[4] de las cuales, 7 son más comunmente encontradas en el hombre[58] (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de Candida más comunmente encontradas en el hombre de acuerdo a su patogenicidad.

Candida albicans.
Candida tropicalis.
Candida stellatoidea.
Candida parapsilopsis.
Candida pseudotropicalis.
Candida krusei.
Candida guilliermondii.

B.- Características generales.

Las características de cada una de ellas, tanto de cultivo como de patogenicidad se describen a continuación:

Candida albicans. Sinónimos: Oidium albicans; Monilia albicans; Endomyces albicans; Monilia pinoyi; Monilia psilosis; Mycotoruloides triaddis[13].

Esta levadura es uno de los componentes de la flora normal del-- cuerpo, la mayoría, si no es que todos los humanos, adquieren este -- hongo al nacer durante el paso a través del conducto vaginal.

Ordinariamente, Candida albicans tiene un balance con otros microorganismos existiendo como habitante natural. Sin embargo, pueden existir alteraciones que modifiquen este balance propiciando que esta especie sea la más importante patogénicamente ya que es el principal agente etiológico de la candidosis.

En general las levaduras de esta especie tienen la habilidad de producir Clamidosporas, las cuales pueden ser terminales o laterales; redondas u ovaladas presentando doble membrana (Figura 1). Así mismo se ha observado la formación de filamentos cortos "Tubo germinativo" (Figura 2), así como la presencia de Pseudomicelio (Figura 3), y Micelio verdadero (Figura 4) en medios como: Albumina de huevo, Suero, Líquido espermático, Saliva, etc; en un período de incubación de 2 - 3 horas a 37°C.

El ratón y conejo son susceptibles a inoculaciones intravenosas, en ambos animales el hongo produce lesiones renales, cerebrales y - cardiácas[5, 13].

Estructuras Morfológicas de Candida albicans.

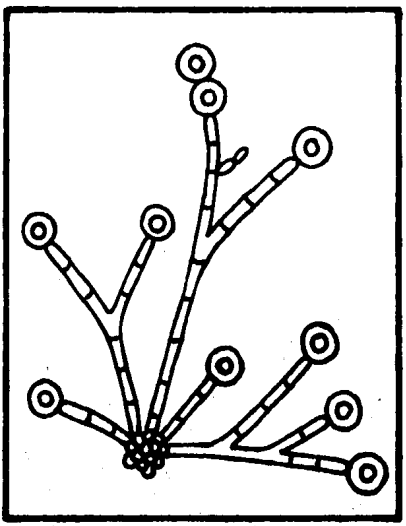


Figura 1. Clamidosporas

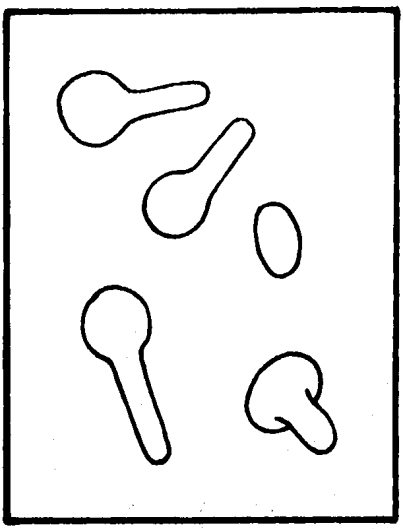


Figura 2. Levaduras con tubo germinativo.

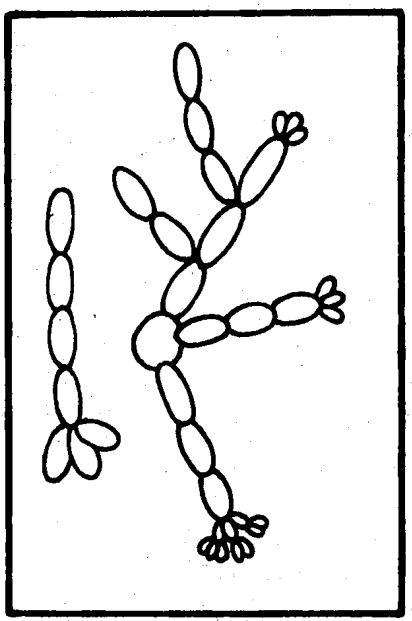


Figura 3. Pseudomicelio.

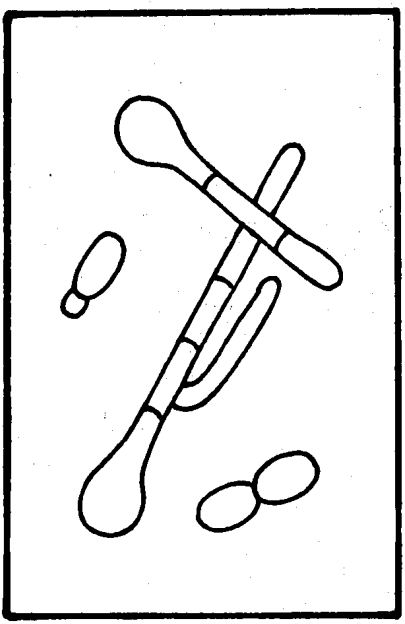


Figura 4. Presencia de Micelio verdadero.

Candida tropicalis. Sinónimos: Monilia candida; Oidium tropicale; Monilia tropicalis; Candida vulgaris; Mycothorula dimorpha; Monilia trimorpha[13].

Candida tropicalis se ha asociado con Candida albicans, debido a que ha sido encontrada en vulvovaginitis. Inoculaciones intravenosas de 10 a 1000 veces la dosis letal de Candida albicans puede producir en ratón y en conejo lesiones renales y cardiácas similares a las de Candida albicans aunque en algunas ocasiones estas pueden sanar -- sin que ocurra diseminación[13].

Candida stellatoidea. Muchos autores la consideran de baja patogenicidad[13]. Se puede encontrar en vagina con o sin presencia de vulvovaginitis[44]. Algunas especies producen Clamidosporas y Tubo - germinativo[13, 40]. En recientes estudios esta especie es considerada una variante de Candida albicans[8].

Candida parapsilosis. Estado perfecto: Loderomyces parapsilosis[8]. Sinónimos: Monilia parapsilosis; Monilia parakrusei; Candida brumpti[13].

Se encuentra comunmente en la piel humana, como levadura saprofita, ha sido aislada de lesiones de fisuras del pie, uñas y pliegues - de los dedos, en casos de paroniquia crónica, úlceras corneales e infecciones de la conjuntiva[7, 13, 44].

Candida pseudotropicalis. Estado perfecto: Kluyveromyces fragilis[8]. Sinónimos: Endomyces pseudotropicalis; Monilia pseudotropicalis; Monilia mortifera[5].

Ha sido raramente aislada de lesiones cutáneas y vaginales y con más frecuencia del tracto respiratorio en pacientes con enfermedades-

respiratorias de diversos tipos; en casos de septicemia. Su patogenicidad ha sido demostrada en ratón y conejo[44].

Candida krusei. Estado perfecto: Pichia kudriauzevii[8]. Sinónimos: Saccharomyces krusei; Monilia krusei[13].

Poco frecuente en flora vaginal, más frecuente en niños que sufren de algodoncillo o trush (Candidosis pseudomembranosa aguda), enheces de adultos. Raramente causa queratomicosis y en pocas ocasiones ha sido asociada a infecciones profundas en humanos y en septicemia[44].

Candida guilliermondii. Estado perfecto: Pichia guilliermondii[8] Sinónimo: Endomyces guilliermondii[15].

Ha sido aislada de piel humana, uñas de los dedos en casos de paroniquia crónica, en la boca de los infantes a los pocos días de nacidos. Puede encontrarse en algunos casos de vulvovaginitis[13, 44].

C.- Cuadros clínicos.

Existe una gran variedad de enfermedades micóticas entre las que se encuentra la CANDIDOSIS. Esta es una de las enfermedades más ampliamente distribuidas y prevalentes del hombre. Las formas clínicas son muy variadas, se dividen en tres categorias[8]:

- Candidosis Mucocutánea.
- Candidosis Cutánea.
- Candidosis Sistémica.

Candidosis Mucocutánea: Los tejidos comunmente involucrados son la mucosa oral y vaginal. En la candidosis oral o trush (candidosis pseudomembranosa aguda), las mucosas orales estan cubiertas por placas blanquecinas, cremosas a grises constituidas por hifas o levaduras -- que se desarrollan en la lengua, exudado y mucosa bucal y al desprenderse estas placas dejan al descubierto una zona mucosa enrojecida[8,13,14].

Los signos y síntomas de la candidosis vaginal son: Prurito agudo, descargas de flujo espesas de color blanco cremoso y altamente -- ácido en la infección aguda; comezón y sensaciones ardientes dolorosas las cuales pueden ser experimentadas en la región del intertrito y la bios menores durante la micción, contacto sexual o exámen ginecológico.

El signo clásico de la candidosis vaginal es la presencia de coágulos blancos, eritema y edema de los labios menores, introito y tercio bajo de la mucosa vaginal, pueden observarse pápulas y raramente ulceraciones o lesiones granulares[40].

Candidosis Cutánea: Las víctimas son individuos con una variedad de alteraciones endocrinas, hematológicas, inmunológicas y metabolicas.

Ocurre más frecuentemente en niños. Generalmente involucra zonas intertriginosas de la piel como áreas interdigitales de las manos, pliegues inframamarios, ingle y axilas. Las lesiones son eritematosas, escamosas y húmedas. Pueden desarrollarse pústulas y vesiculas

en el centro del área afectada[2, 8].

Candidosis Sistémica: Los agentes etiológicos más frecuentes aparte de Candida albicans son: Candida guilliermondii, Candida krusei Candida parapsilosis y Candida tropicalis.

La candidosis pulmonar es rara, las infecciones pulmonares secundarias ocurren frecuentemente en individuos con otras enfermedades primarias (Tuberculosis, Infecciones Bacterianas, Virales y Neoplasmas). Semeja a otras enfermedades respiratorias desarrollando tos, disnea, sudoración nocturna, fiebre y pérdida de peso. El esputo producido es mucoide y sanguinolento[8].

La endocárditis candidosica se asemeja a la bacteriana con síntomas de fiebre, ruidos cárdiacos, esplegnomegalia, falla congestiva del corazón y anemia.

En la forma septicémica la infección tiene una conclusión fatal fulminante[13].

D.- Patogenia.

La adherencia del microorganismo a tejidos del hospedador es considerado como un prerrequisito para la invasión tisular. Se ha encontrado que la flora bacteriana normal del epitelio reduce la asociación de C. albicans por competencia de sitios de unión produciendo sustancias que inhiben la adhesión de Candida (posiblemente ácidos grasos volátiles) y bloquean fisicamente la penetración de las levadu-

ras al epitelio[30].

Existen diversos factores predisponentes que permiten la colonización de estos organismos en el hospedador como son: alteraciones inmunológicas, diabetes[2, 47], transtornos hormonales, uso de anticonceptivos, embarazo, higiene personal[33, 47], uso prolongado de antibióticos de amplio espectro[30, 52], la acción de inmunosupresores y pH[49].

El tejido endotelial es el primer punto de contacto con el patógeno, donde la forma levaduriforme es capaz de iniciar la invasión antes de que se lleve a cabo la forma micelial[14, 31].

Martin y colaboradores en 1984 sostienen que la forma filamentosa es necesaria para provocar la enfermedad[34].

Al inicio de la infección, la adhesión del microorganismo al tejido puede ser debida a polisacáridos (Adhesinas) existentes en la pared celular del patógeno que interactúan con las glicoproteínas (receptoras) encontradas en la superficie celular del hospedador[31].

Los efectos patogénicos de C. albicans en los tejidos del hospedador son inciertos. Se sabe que las especies de Candida producen ciertas enzimas hidrolíticas inducibles presentes en la superficie celular lo cual puede ser considerado como un factor contribuyente en el proceso de la infección y daño a las células hospedadoras[31].

Varios autores establecen que la adherencia al epitelio por Candida es mayor para Candida albicans y Candida tropicalis y en menor proporción para Candida krusei, Candida parapsilopsis y Candida pseudotropicalis[20, 30].

E.- Diagnóstico.

Gran cantidad de datos han sido acumulados para la identificación de especies del género Candida por el uso de varios métodos, de entre los cuales, ha sido reportado la utilización de medios de cultivo especiales.

Nickerson y Mankowski en 1952 estudiaron un medio de polisacáridos purificados que favorecen la formación de filamentos y clamidosporas de Candida albicans[37]. En el siguiente año Nickerson continuo sus estudios con el uso del medio Bi-GGY (Bismuto-Glucosa-Glicina-Levadura) en el cual Candida sp forma colonias típicas coloreadas ofreciendo ventajas para su aislamiento a partir de material clínico[38].

Para 1954 Currier y Day emplearon el colorante vital Cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolio (TTC) el cual es absorbido por algunas levaduras y reducido intracelularmente[9]. Por lo que Pagano, Levin y Trejo en 1958 utilizaron el mismo compuesto para la elaboración de un medio para la identificación de diferentes especies de Candida en cultivos primarios[43].

En 1968 Denny y Partridge encontraron que otro tipo de organismos levaduriformes daban resultados positivos. Invalidando con esto la utilización del colorante para la identificación de las especies de este género[12].

Por otro lado Kamaya en 1967 lleva a cabo la diferenciación entre Candida albicans y Candida stellatoidea en el medio Agar Harina de Maiz (Agar Corn Meal) en base a la formación de estructuras levaduriformes y miceliales respectivamente[29]

Otra prueba descrita, es la característica de la formación del - tubo germinativo en varias sustancias, para la diferenciación de especies.

Diferentes autores han encontrado algunos factores que pueden - promover dicho fenómeno; estos incluyen: Cantidades óptimas de Fierro[24], Magnesio[56], Temperatura[3], pH[15, 50], Densidad del inoculo[40], presencia de nutrientes disponibles en medios sintéticos[10] como LBC (Lee-Buckley Campbell)[36] y otros como Bactopeptona[28], así como suplementos necesarios para su desarrollo (Biotina)[57].

También se ha observado que algunas especies de Candida, principalmente C. albicans tienen la habilidad de formar esporas esféricas de doble pared llamadas Clamidosporas[40].

Los factores fisicoquímicos que influyen en la inducción de las Clamidosporas incluyen: Densidad del inoculo[11], Temperatura[11, 23], Anaerobiosis parcial, Tiempo de incubación[11], N-Acetilglucosamina[53], Estado del medio (Líquido o sólido) y presencia de Tensoactivos (Tween 80 o glicerofosfatos de Magnesio)[11, 16].

Sin embargo, los mecanismos por los cuales los medios complejos, factores nutricionales y ambientales que estimulan la formación de - las diferentes estructuras del género Candida no se conocen[34, 53].

Scherwitz y colaboradores realizaron estudios de microscopia electrónica de transmisión para conocer los componentes de la pared celular del tubo germinativo[46] (Figura 5) y la función de otras estructuras (Anillos Filamentosos)[50] que intervienen en la formación de septos y poros septales encontrados en las fases levaduriformes y miceliales[42].

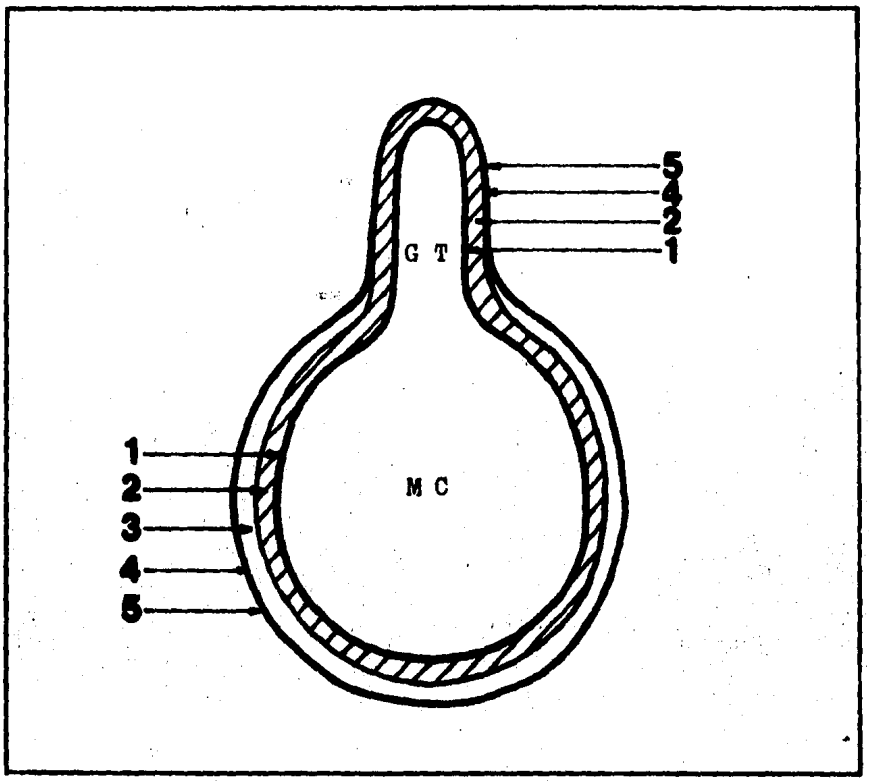


Figura 5. Representación Esquemática de la formación del Tubo Germinativo en Candida albicans.

1.- Capa externa granular, diseminada en el área del tubo germinativo.

2.- Capa de densidad electrónica amorfa, cambio ligero de la célula madre al tubo germinativo.

3.- Capa principal en el área de la célula madre, termina en el punto donde se inicia el tubo germinativo.

4.- Capa electrónica transparente, compone la mayor parte de la pared del TG, en la célula madre, no es muy distinguible

5.- Capa de mínima densidad, adyacente al plasmalema.

En 1984, Gow y colaboradores proponen un modelo que explica un - posible mecanismo para la formación de algunas estructuras del organismo[17] (Figura 6).

El estadío final de la identificación de este tipo de levaduras involucra la determinación de sus propiedades bioquímicas, especialmente su habilidad para asimilar y fermentar diferentes fuentes de - carbono[26, 40].

Así como otras pruebas las cuales no son muy usadas para tal propósito ya que son muy complicadas y requieren mucho tiempo para su - realización como son: Determinaciones enzimáticas[39], y otras, cuyo - material no es muy accesible entre las que están: La asimilación de Ureasa, Proteínasa, Sorbosa, Resistencia a la 5-Fluorocitosina, Resistencia a la Safranina[42], Sensibilidad a la Actidiona[7, 48], Estudios - Cromatográficos[32], y Pruebas Serológicas[51].

F.- Tratamiento.

Existen varios medicamentos utilizados en el tratamiento de las - diferentes formas clínicas de la Candidosis, entre los que se encuentran los siguientes[37]: (Ver Cuadro 2).

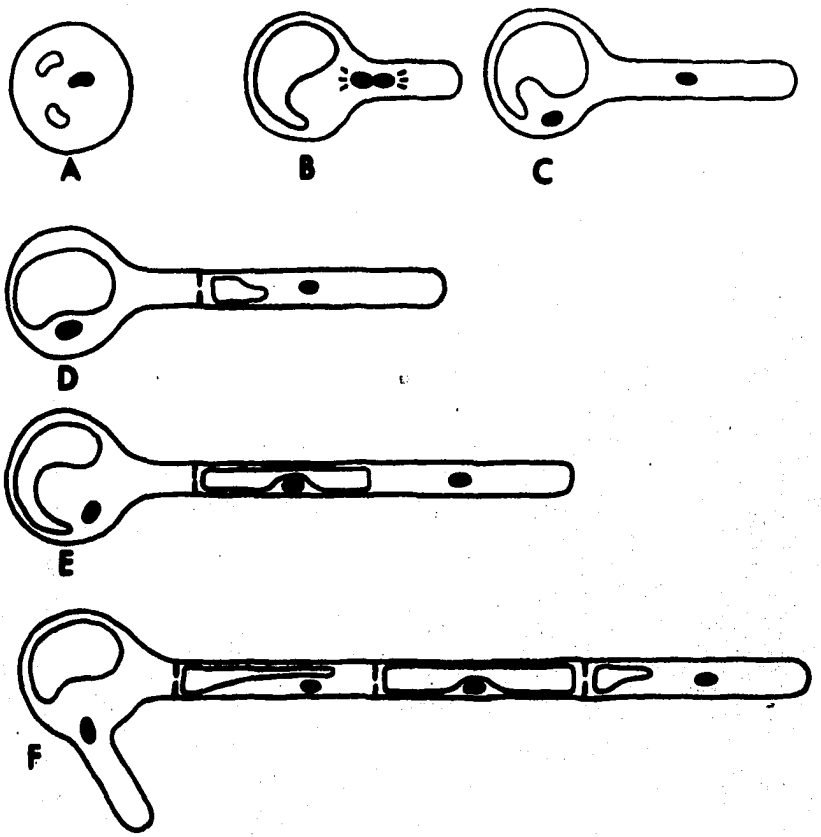


Figura 6. Modelo de Germinación (a - f) y Crecimiento de la Hifa de Candida albicans.

a) Inicialmente las células contienen pequeñas vacuolas.
b) El núcleo migra hacia el Tubo Germinativo y se divide.
c y d) Uno de los núcleos retorna a la célula madre y el otro migra hacia la extensión de la hifa.
b - e) La célula madre es más vacuolada, el protoplasma continua su migración hacia la hifa.
e - f) Se observan compartimientos intercalares muy vacuolados.
f) Presencia de brazos reiniciando el proceso de germinación.

Nombre	Preparado Comercial	Dosis		Vía de Admón.	Indicaciones	Efectos secundarios
		Niños	Adultos			
Nistatina	Tabletas	500,000 U 3-4 veces al día	500,000 U 3-4 veces al día	Oral	Candidosis del tubo digestivo	Nausea, vómito, disnea, prurito.
	Tabletas	-	100,000 U c/24 hrs/ 2 semanas	Vaginal	Candidosis vaginal	Irritación local
	Ungüentos	100,000 U 2 v/D	100,000 U 2 v/día	Tópica	Candidosis cutánea	
Miconazole	Cremas	2 v/24 3-5 semanas. 25 mg 4 v/ día	2 v/24 hr 3-5 semanas. 50 mg 4 v/ día	Tópica	Candidosis vaginal Candidosis cutánea	
	Tabletas			Oral	Candidosis Mucocutánea	Nausea, disnea
Anfotericina	Polvo liofilizado para solución inyectable	0.5-1 mg/Kg/ día	Igual	Venoclisis.	Candidosis sistémica	Daño al riñon principalmente, sudoración, depresión, dolor de cabeza, escalofrios, nauseas, vómito, entre otros.
5-Fluorocitosina	Tabletas	-	200 mg/ Kg/día en 4 dosis divididas.	Oral	Candidosis sistémica	Nauseas, vómito, diarrea, salpullido, leucopenia, niveles enzimaticos elevados.

Por datos obtenidos en una encuesta realizada por el Doctor --- Roberto A. Cervantes Olivares y colaboradores de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán se sabe que en la mayoría de los Centros - de Salud en México (IMSS, SSA, ISSSTE) la identificación y cultivo de estas especies se limita sólo a la observación del crecimiento morfológico de la colonia en el medio de cultivo Bi-GGY y en algunas ocasiones en la prueba de formación de Tubo Germinativo. Esta práctica -- podría considerarse adecuada, si no fuera por el hecho de que la mayoría de los microorganismos que crecen en el medio y dan coloración cafe son diagnósticados e identificados como agentes de candidosis, iniciandose el tratamiento sin mayor estudio; siendo esto de gran importancia debido a que no todas las especies del género Candida son consideradas patogenas[58].

El propósito del presente estudio es el evaluar la efectividad - del medio Bi-GGY y Agar Sulfito Bismuto en el diagnóstico e identificación de las especies del género Candida.

2. OBJETIVOS

1.- Determinación de la prevalencia de las diferentes especies del género Candida a partir de muestras clínicas.

2.- Llevar a cabo la comparación de dos medios de cultivo (Bi-GGY y Agar Sulfito Bismuto) para la identificación de especies del género Candida aplicable al laboratorio clínico de rutina.

3.- La realización de pruebas como: Tinción de Gram Tubo Germinativo, Producción de Clamidosporas, Crecimiento en pH ácido, Sensibilidad a la Actidiona, Fermentación de Carbohídratos, Asimilación de Carbohídratos, que permitan la identificación de las especies de este género.

3. MATERIALES Y METODOS

* Para este estudio se utilizaron cepas control de C. albicans, C. tropicalis, C. stellatoidea, C. parapsilopsis, C. pseudotropicalis, C. krusei y C. guilliermondii; donadas por el Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales, por el Laboratorio de Micología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. y por el Dr. Libero Ajello del C.D.C.U.S.A., a través de la profesora Amanda Trujillo.

* Cuatro cepas de Cryptococcus neoformans serotipo B, C, D y Kch, donadas por el Dr. G. Evans de la Universidad de Glasgow, Gran Bretaña.

* Ciento cuarenta y dos muestras de exudados vaginales y tres exudados faríngeos proporcionados en medio Bi-GGY (Bismuto-Glucosa-Glicina-Levadura) (BBL) de las clínicas 33, 61 y 64 del Instituto Mexicano del Seguro Social obtenidas durante el período del 17 de Agosto de 1984 al 20 de Septiembre de 1985, de pacientes diagnosticados sufriendo Candidosis.

* Una muestra de piel humana obtenida en el Laboratorio de Micología Médica y Veterinaria de la Sección de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán U.N.A.M.

Algunas de las muestras proporcionadas presentaban mezclas de colonias en el medio, por lo que se procedió a llevar a cabo la purificación realizandose de la siguiente manera (Cuadro 3).

Cuadro 3. Esquema de Purificación.

Obtención de muestras clínicas de Candida sp a partir - de exudados vaginales y faríngeos en medio de Cultivo Bi-GGY.

↓

Observación morfológica colonial de las muestras clínicas encontrandose en algunas de ellas mezclas de colonias en el medio.

↓

Tinción de Gram.

↓

Toma de una colonia aislada e inocular en Caldo Sabouraud Dextrosa (Bioxon) con tres gotas de HCL 1 N. Incubar de 24-28 hrs. a 25°C. Posteriormente agitar, - observar una turbidez del medio.

↓

Sembrar en Agar Sangre e incubar de 24-72 hrs. a 25°C.

↓

Tomar una colonia aislada y sembrar en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) (Bioxon). Incubar de 24-72 hrs. a - 25°C. Observar una morfología colonial homogenea.

↓

Tinción de Gram. Forma homogenea de las levaduras.

↓

Obtención de muestras purificadas.

Las cepas una vez purificadas se identificaron con las siguien-- tes pruebas:

TINCION DE GRAM[35]. Se realizó en todas las muestras para verificar la presencia de levaduras y observar las características morfológicas de estas.

Preparación del inoculo. Se utilizaron cultivos frescos de 24 a 48 horas en SDA del organismo a identificar para la elaboración de cada una de las pruebas[1]. En las técnicas de Tubo Germinativo, Asimilación de Carbohídratos y Observación Morfológica del microorganismo en los medios de Cultivo Bi-GGY y Agar Sulfito Bismuto, se realizaron suspenciones de la levadura en agua destilada estéril, tomando como referencia el tubo No. 1 (300×10^6 microorganismos/ml) del Nefelometro de Mc. Farland y el tubo No. 3 (900×10^6 microorganismos/ml) para la prueba de pH ácido y Fermentación de Carbohídratos[58].

TUBO GERMINATIVO. Se utilizó suero de caballo esterilizado -- por filtración usando membranas de 0.45 μm. 0.5 ml. de suero es inoculado con dos gotas de la suspención de levaduras, en un período de incubación de 3-4 horas a 37°C[5, 36]. Posteriormente una gota de la muestra es puesta entre un portaobjetos y un cubreobjetos y examinada al microscopio con un aumento de 40x[7].

Para este estudio también se utilizó líquido amniótico de bovino, procediendose de igual manera.

PRODUCCION DE CLAMIDOSPORAS: Se emplearon los medios Agar Hari

na de Maíz (Difco), Czapeck Dox (Bioxon) o Agar Clamidospora (Bioxon) más Tween 80 al 1 % para la inducción de Clamidosporas y preparados - de acuerdo a las indicaciones de cada uno de ellos. Se coloca el medio sobre un portaobjeto estéril, sembrar con inoculo pesado y por estria una muestra de la colonia y colocar encima otro portaobjeto estéril. Con un período de incubación de 1-2 días a una temperatura de 28°C. Observandose al microscopio con un aumento de 10x[11].

CRECIMIENTO EN pH ACIDO. Tres gotas de la suspención de levaduras son inoculadas en 5 ml. de Caldo Sabouraud Dextrosa ajustado a un pH de 1.55 empleando un potenciometro y una solución de HCL 1 N, en - condiciones estériles. Con un período de incubación de 15 días a -- 37°C con agitación periodica. Una prueba positiva es indicada por - una turbidez del medio[41].

SENSIBILIDAD A LA ACTIDIONA. SDA más 0.5 g por ciento de Actidiona (Sigma) son empleados y preparados de acuerdo a las indicaciones del medio. Vertidos en caja petri estériles y sometidos a prueba -- de esterilidad por un día. Se siembra por estria con un período de - incubación de 24-48 horas a 37°C. Crecimiento sobre el agar indica - un resultado positivo[4, 7, 48].

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS. El caldo de fermentación basal- contiene extracto de carne 3.0 g; polipeptona 10.0 g; NaCL 5.0 g; agua destilada c.b.p. 1000 ml y un ml. de solución indicadora de Púrpura - de Bromocresol. Se ajusta con un potenciometro y solución de HCL o NaOH 1 n (según sea necesario) a un pH de 7.2.

4.7 ml. del medio son vertidos en tubos con tapón de rosca conteniendo tubos de Durham invertidos. Se esteriliza por autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min, y se dejan 24 horas para prueba de esterilidad[4,5].

Las soluciones de Carbohídratos al 10 % (Glucosa, Lactosa, Maltosa, Sacarosa, Trealosa) (Merck) son esterilizadas separadamente por filtración con membranas de 0.45 μm de diámetro. 0.3 ml, de estas soluciones y tres gotas de la suspención del organismo a identificar son adicionados asépticamente a cada tubo. Con un período de incubación de 15 días a temperatura ambiente (27°C) y agitaciones periódicas.

Una prueba positiva indica acidificación del medio (de color púrpura a amarillo) y en algunas ocasiones producción de gas.

ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS. Es recomendado para la prueba el medio Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco). Se emplean discos de papel impregnados con dos gotas de la solución de Carbohídratos (Glucosa, Lactosa, Maltosa, Sacarosa, Rafinosa) al 20 % en el medio YNB por separado, los cuales se secan en la estufa por cuatro días a 37°C. El medio basal contiene Azul de Bromotimol 0.16 g; Solución Buffer de Fosfatos 100 ml; Agar Bacteriológico 20.0 g y Agua Destilada c.b.p. 1000 ml. Esterilizar por autoclave a 121°C, 15 lb, 15 min.

La solución buffer de fosfatos es una solución 1:1 de una mezcla de Na_2HPO_4 0.067 M y KH_2PO_4 0.067 M a un pH de 6.8.

En una caja petri estéril colocar un ml. de la suspención de levaduras y adicionar aproximadamente 20.0 ml. del medio basal enfriado previamente a una temperatura de alrrededor de 45°C. Agitar y dejar

solidificar entre 30-60 min. Colocar los discos impregnados con los carbohídratos.

Una prueba positiva es observada por la presencia de crecimiento del microorganismo y cambio de color a amarillo del medio, alrrededor del disco con el carbohídrato impregnado[26] (Figura 7).

3.2 Estudio estadístico de Xi^2.

Para determinar la prevalencia de las diferentes especies de Candida más comunmente encontradas en el humano se efectuó el estudio-- estadístico de Xi^2 planteando las siguientes hipótesis:

Ho: Existen diferencias significativas en el muestreo de las tres clínicas, en cuanto a la relación de especies del - género Candida.

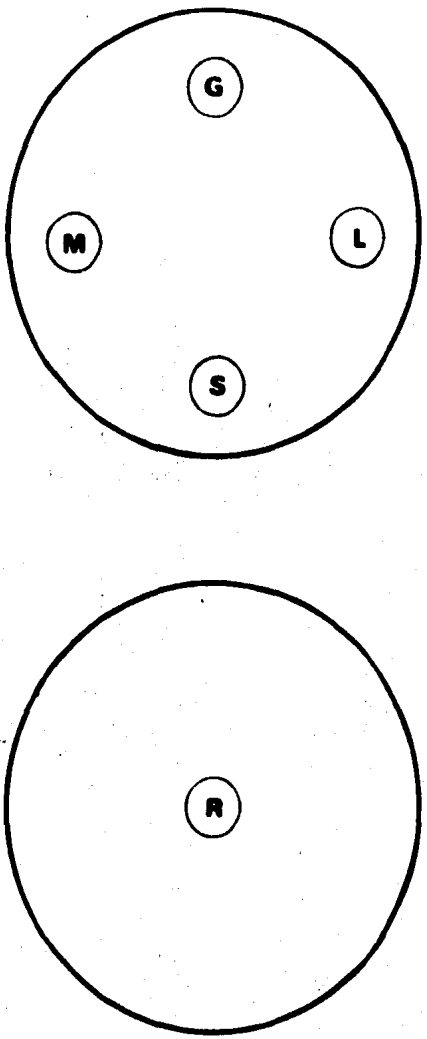
Hi: No existen diferencias significativas en el muestreo de- las tres clínicas en cuanto a la relación de especies del género Candida.

Donde: Ho: Hipotésis nula.
Hi: Hipotésis alternativa.
Con un nivel de confianza del 95 %.

3.3 Utilización de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo Bi-GGY y Agar Sulfito Bismuto fueron prepa rados de acuerdo a las indicaciones etiquetadas en cada frasco.

Figura 7. Prueba de Asimilación de Carbohídratos.



Azúcares al 20 %:

G = Glucosa. **M = Maltosa.** **R = Rafinosa.**

L = Lactosa. **S = Sucrosa.**

Este estudio comprende la utilización de los medio de cultivo -- preparados en las siguientes condiciones:

a) Tres horas antes de su uso con un almacenaje a temperatura ambite ($T = 27^{o}C$).

b) Dos semanas antes de su uso con un almacenaje a temperatura de $27^{o}C$.

c) Dos semanas previas a su uso con un almacenaje de $4^{o}C$.

El período de incubación fué de cinco días a una temperatura ambiente de $27^{o}C$, con intervalos de observación de 24 hrs. anotando las características de: Tiempo de coloración, Diámetro, Crecimiento y Aspecto morfologico de las colonias.

Se tomaron como parámetro de referencia para las diferentes coloraciones de las colonias observadas en los medios, catalogos de pinturas: Vin lac, Vin Eco, Eco Express, Optimus Kindal, Optimus tropical-Optimus 54, Hubelin, Colvin, Eco.

3.4 Evaluación del medio de cultivo Bi-GGY.

Suspenciones de las cepas previamente identificadas y de las cepas control se sembraron por estria con el uso de una asa bacteriológica-sobre la superficie del medio de cultivo, con el fín de determinar la efectividad de este medio en la identificación de las especies de Candida.

Planteandose para tal propósito la siguiente hipótesis: "El medio de cultivo Bi-GGY no es adecuado para la identificación de las diferentes especies del género Candida más comunes en el humano".

3.5 Evaluación del medio de cultivo Agar Sulfito Bismuto.

Se trabajó en las mismas condiciones de estudio efectuadas en la evaluación del medio de cultivo Bi-GGY, con el planteo de la siguiente hipótesis: "El medio de cultivo Agar Sulfito Bismuto se puede utilizar para la identificación de las especies del género Candida más comunes en el humano".

4. RESULTADOS

4.1.a Identificación de las especies del género Candida.

Una vez purificadas las muestras, se realizó la identificación-- de especies en base a las pruebas ya mencionadas (Cuadro 4).

4.1.b Detección de otros microorganismos.

Al inicio de los estudios de identificación realizados se observó diferencias en la morfología y aspecto de algunas de las cepas, por lo que se realizaron además de las pruebas anteriores otras como fueron:

- Formación de Filamentos.
- Fermentación de Trealosa.

Encontrandose un género diferente a Candida sp (Cuadro 5).

Cuadro No. 5 Pruebas de identificación de Torulopsis sp.

Tinción de Gram	Levaduras subglobosas a ovoides.				
Tubo germinativo	-				
Produc. de Clamidosporas	-				
Formación de Filamentos	-				
Crecimiento pH ácido	+/-				
SDA + Actidiona	-				
Fermentación de Carbohídratos	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Trealosa
	Acido/ gas	0	0	0	Acido/gas
Asimilación de Carbohídratos	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sucrosa	Rafinosa
	+	-	-	-	-

Cuadro No. 4 Pruebas de identificación de especies de Candida.

Especie	Tincion de Gram	Tubo Germinativo	Producción Clamidosporas.	Formación Filamentos	pH ácido	SDA + Actidiona	Fermentación de Carbohidratos. G	L	M	S	T	Asimilación de Carbohidratos. G	L	M	S	R
C. albicans	Lev. grandes - globosas a ovales (3-6.5x3.5 x 12.5µ)	+	+	+	+	+	AG	O	AG	A		+	-	+	+	-
C. tropicalis	Lev. muy grandes a ovales - terminación redondeada.(5-9 x 6-12µ)	+ ó -	+ ó -	+	-	+ ó -	AG	O	AG	AG		+	-	+	+	-
C. stellatoidea	Lev. grandes - ovaladas (2.5-6 x 5-12µ)	+ ó -	+ ó -	+	+ ó -	+	AG	O	AG	O		+	-	+	-	-
C. parapsilosis	Lev. medianas, ovales,redondas (2.5-5x4-8µ)	-	-	+	-	-	AG	O	O	O ó A		+	-	+	+	-
C. pseudotropicalis	Lev. cortas,ovaladas (3.5x 4.5-9µ)	-	-	+	-	+	AG	AG	O	AG		+	+	-	+	+
C. guilliermondii	Lev. subglobosas (2-5 x 3-6 µ)	-	-	+	-	+ ó -	AG	O	O	O ó AG		+	-	+	+	+
C. krusei	Lev. alargadas rectangulares, (2.5-5.5x7.5-21.5µ)	-	-	+	+ ó -	-	AG	O	O	O	O	+	-	-	-	-

Carbohidratos:

G = Glucosa
L = Lactosa
M = Maltosa
S = Sucrosa
T = Trealosa
R = Rafinosa

+ = Positivo
- = Negativo
AG = Acido-Gas
A = Acido
O = Negativo

4.2.a Prevalencia de las especies de Candida más comunes en el humano.

De las 146 muestras estudiadas se encontraron las siguientes especies: (Cuadro 6).

Cuadro 6. Determinación de la prevalencia de las especies de Candida.

Cantidad	Especie	Porcentaje
78	C. albicans	53.42 %
33	C. stellatoidea	22.60 %
2	C. tropicalis	1.56 %
1	C. krusei	0.68 %
1	C. pseudotropicalis	0.68 %
1	C. parapsilosis	0.68 %
1	C. guilliermondii	0.68 %
		80.10 % Total

4.2.b Estudio estadístico de Xi^2.

El estudio estadístico efectuado, revela que en el muestreo de las tres clínicas no existen diferencias significativas en cuanto a la relación de especies del género Candida; con una probabilidad de P = 5 % y un nivel de confianza del 95 % (Cuadro 7).

4.2.c. Prevalencia de otros microorganismos detectados.

Otro género encontrado en las muestras estudiadas fué Torulopsis

Cuadro No. 7 Estudio estadístico de Xi^2 para las especies del género Candida.

	Clínica 33		Clínica 61		Clínica 64			
	Valor		Valor		Valor			
Especie	Observado	Calculado	Observado	Calculado	Observado	Calculado	Total	% Total
C. albicans	11	19.99	21	22.00	39	36.00	78	66.666
C. tropicalis	1	0.51	0	0.56	1	0.92	2	1.709
C. stellatoidea	9	8.46	11	9.31	13	15.23	33	28.204
C. parapsilosis	1	0.26	0	0.28	0	0.46	1	0.854
C. pseudotropicalis	1	0.26	0	0.28	0	0.46	1	0.854
C. guilliermondii	0	0.26	1	0.28	0	0.46	1	0.854
C. krusei	0	0.26	0	0.28	1	0.46	1	0.854
Total	30	30.00	33	32.99	54	53.99	117	99.995

No. total de muestras = 117.

Valor calculado = $\frac{\text{No. de muestras/clínica}}{\text{No. total de muestras}}$ x No total de

$$Xi^2 = \frac{(O - C)^2}{C}$$

Donde: Xi^2 = Chi cuadrada
O = No. Observado
C = No. Calculado

sp con una prevalencia de: (Cuadro 8).

Cuadro No. 8 Prevalencia de Torulopsis sp

Cantidad	Especie	Porcentaje
29	Torulopsis sp	19.86 %

Así mismo, se realizó el estudio estadístico de Xi^2 encontrandose diferencias significativas entre las tres clínicas en cuanto a la relación de este género (Cuadro 9).

Cuadro No. 9 Estudio estadístico de Xi^2 para los géneros de Candida y Torulopsis sp.

Género	Clínica 33 Valor		Clínica 61 Valor		Clínica 64 Valor			
	Observado	Calculado	Observado	Calculado	Observado	Calculado	Total	% Total
Candida sp	30	28	33	28	54	61	117	80.137
Torulopsis sp	5	7	2	7	22	15	29	19.863
Total	35	35	35	35	76	76	146	100.000

No. Total de muestras = 146

4.3 Evaluación del medio de cultivo Bi-GGY para el diagnóstico e identificación de especies del género Candida más comunes en el humano.

Las muestras una vez identificadas junto con las cepas control - se sembraron en el medio de cultivo Bi-GGY (Ver Cuadros 10, 11, 12, 13,

13a, 13b, 13c, 13d).

Así mismo se efectuó el desarrollo de Torulopsis sp en las mismas condiciones de estudio (Cuadro 14). Por otro lado se puede observar el comportamiento de las especies de C. albicans, C. stellatoidea, C. tropicalis, C. krusei, Torulopsis sp, en las gráficas de diámetro, crecimiento y coloración de las colonias contra tiempo (Gráficas A, B, C respectivamente). Y para C. parapsilosis, C. pseudotropicalis, C. guilliermondii y Cryptococcus neoformans en sus respectivas gráficas (Gráficas A', B', C').

4.4 Evaluación del medio de cultivo Agar Sulfito Bismuto para la identificación de especies del género Candida.

Los resultados obtenidos para Torulopsis sp, se encuentran en el cuadro 15a, en el caso de las especies de Candida, no se observó crecimiento en dicho medio.

Abreviaturas utilizadas en los cuadros de los medios de cultivo evaluados.

Condiciones de estudio de los medios de cultivo.

I Medio de cultivo (Bi-GGY o Sulfito-Bismuto) almacenado 3 horas a temperatura ambiente antes de su uso (T = 27°C).

II Medio de cultivo (Bi-GGY o Sulfito-Bismuto) almacenado 2 semanas antes de su uso a temperatura ambiente (27°C).

III Medio de cultivo (Bi-GGY o Sulfito-Bismuto) almacenado 2 semanas a 4°C antes de su uso.

Catálogos de pinturas utilizadas como parámetros para la coloración de las colonias de las especies de Candida, Torulopsis y Cryptococcus en los medios de cultivo Bi-GGY y Agar Sulfito Bismuto.

Ve	Vin Eco
VL	Vin Lac
EE	Eco Express
OK	Optimus Kindal
OT	Optimus Tropical
O 54	Optimus 54
H	Hubelin
Cl	Colvin
E	Eco en aerosol

Crecimiento

± Escaso

\+ Regular

++ Bueno

+++ Abundante

Características

L Lisas

R Rugosas

C Circulares

B Brillosas

O Opacas

Tamaño de la muestra

N = Número de muestras estudiadas

Abreviaturas utilizadas en las gráficas

Crecimiento

N = Nulo

E = Escaso

R = Regular

B = Bueno

A = Abundante

Color

I = Incoloras

C = Claras

O = Obscuras

MO = Muy Obscuras

T = Tiempo

CANDIDA ALBICANS

I						II						III					
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
2	24	BLANCAS	<0.1	+	L,C,B.	3	CHAMPANA 445 (VE)	<0.1	+-	L,C,O.	1	CARNE 422 (VE)	<0.1	+-	L,C,O.
1		CREMA 916 (EE)	<0.1	+-	L,C,B.	2	DURAZNO 435 (VE)	<0.1	+-	L,C,O.	2	CANELA 921 (VE)	<0.1	+-	L,C,O.
		ALMENDRA 1010(OK)	<0.1	++	L,C,B.	2	DURAZNO 435 (VE)	<0.1	+-	L,C,B.	1	CANELA 921 (VE)	0.1	+-	L,C,B.
						1	AMARILLO OXIDO 412	<0.1	+-	L,C,O.	3	AMARILLO OXIDO 412 (VE)	<0.1	+-	L,C,O.
						1	AMARILLO OXIDO 412	<0.1	+-	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 412 (VE)	<0.1	+-	L,C,B.
						1	CHICLE 422 (VE)	<0.1	+-	L,C,B.	1	ROJO OXIDO 607 (CL)	<0.1	+-	L,C,B.
											1	PRIMER ROJO CROMATO ZN (E)	<0.1	+-	L,C,B.
5	48	LADRILLO 770 (VL)	0.8	++	L,C,B.	3	DURAZNO 435 (VE)	0.5	++	L,C,B.	9	ROJO OXIDO 607 (VL)	0.5	++	L,C,B.
4		LADRILLO 770 (VL)	0.8	++	L,C,B. COLONIAS DISEMINADAS COLOR CANELA 921 (EE)	2	DURAZNO 435 (VE)	0.5	++	L,C,O.	1	PRIMER ROJO CROMATO ZN (E)	0.5	++	L,C,B.
1		LADRILLO 770 (VL)	0.8	++	L,C,B. COLONIAS DISEMINADAS COLOR AMARILLO OXIDO 926 (EE).	2	CHICLE 422 (VE)	0.5	++	L,C,B.					
						1	TERRACOTA 436 (VE)	0.5	++	L,C,B.					
						1	AMARILLO OXIDO 412 (VE)	0.5	++	L,C,B.					
7	72	ROBLE 917 (EE)	1.0	+++	L,C,B.	4	AMARILLO OXIDO 412 (VE)	1.0	++	L,C,B.	1	OXIDO ROJO 607 (VL)	1.0	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR COBRE 928 (EE)
1		OXIDO ROJO 927 (EE)	1.2	+++	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 412 (VE)	1.0	++	L,C,O.	4	OXIDO ROJO 607 (VL)	1.0	+++	L,C,B.
2		TABACO 904 (EE)	1.0	+++	L,C,B.	2	DURAZNO 435 (VE)	1.0	++	L,C,B.	2	OXIDO ROJO 607 (VL)	1.0	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR LADRILL.
						1	DURAZNO 435 (VE)	1.0	++	L,C,O.	3	OXIDO ROJO 607 (VL)	1.0	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR AMARILLO OXIDO 412 (VE).
						2	CHICLE 422 (VE)	1.0	++	L,C,B.					
8	96	COBRE 917 (EE)	1.2	+++	L,C,B. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	5	DURAZNO 435 (VE)	1.2	+++	L,C,B.	3	ROJO VENECIA 411 (VE)	1.3	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR AMARILLO OXIDO 412 (VE).
1		ROBLE 917 (EE)	1.4	+++	L,C,B.	5	AMARILLO OXIDO 412 (VE)	1.2	+++	L,C,B.	1	ROJO VENECIA 411 (VE)	1.3	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR CANELA 921 (EE).
1		OXIDO ROJO 927 (EE)	1.2	+++	L,C,B. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA.						2	ROJO OXIDO 607 (CL)	1.3	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR AMARILLO OXIDO 922 (EE).
											4	LADRILLO 770 (VE)	1.3	+++	L,C,B. COLONIAS MAS DISEMINADAS COLOR AMARILLO OXIDO 412 (VE).

N = 18

CANDIDA STELLATOIDEA

	I					II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
1	24	-	-	-	-	1	INCOLORAS	-	+-	L,C.	5	QUARZO 439 (UE)	0.1	+-	L,C,B.
1		BLANCAS	-	++	L,C,B.	6	CAFE CLARO	0.1	+-	L,C.	1	MARFIL 404 (UE)	0.1	+-	L,C,O.
1		CAFE 422 (UE)	-	++	L,C.	1	-	-	-	-	1	BLANCO OSTION 407(UE)	0.1	+-	L,C,B.
7		ALMENDRA 18 (OK)	-	+-	L,C,B. COLONIAS DISEMINADAS COLOR CREMA 21 (OK).						1	AMARILLO OXIDO 412(UE)	0.1	+-	L,C,O.
1	48	CREMA 21 (OK)	-	+-	L,C.	6	ROJO OXIDO 927 (CL)	0.8	++	L,C,B.	6	PRIMER ROJO CROMATO ZINC 974 (E)	0.3	+-	L,C,B.
2		ROJO OXIDO 607 (CL)	1.0	++	L,C,B.	1	TABACO 956 (EE)	0.9	++	L,C,O.	1	ROJO VENECIA 411 (UE)	0.3	+-	L,C,B.
1		CAOBA 12 (OK)	1.2	++	L,C,O.	1	TABACO 984 (EE)	0.7	++	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 412(UE)	0.3	+-	L,C,O.
6		ROBLE 917 (EE)	1.0	++	L,C,B.	1	ROJO OXIDO 607 (CL)	1.0	++	L,C,O.	1	AMARILLO OXIDO 412(UE)	0.3	+-	L,C,B.
						1	CAFE CLARO	1.0	++	L,C,B.	1	ORO AMARILLADO 978(E)	0.3	+-	L,C,O.
3	72	ROBLE 917 (EE)	0.6	++	L,C,B.	4	TABACO 984 (EE)	1.1	++	L,C,B. ALREDEDOR DE LA COLONIA ANILLO 995 CLARO. EN TODAS.	3	PRIMER ROJO CROMATO ZINC 974 (E)	0.9	+	L,C,B.
4		COBRE 920 (E)	1.0	+++	L,C,B.	1	TABACO 984 (EE)	1.0	++	L,C,O.	2	ROJO VENECIA 411 (UE)	0.9	+	L,C,B.
2		ROJO OXIDO 607 (CL)	1.2	+++	L,C,B.	1	ROBLE 917 (EE)	1.1	++	L,C,B.	1	ROJO VENECIA 411 (UE)	0.9	+	L,C,O.
1		NOGAL 987 (ECO)	1.3	+++	L,C,O.	4	CAFE CLARO	1.1	++	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 926(EE)	0.9	+	L,C,O.
											1	COBRE 993 (E)	0.9	+	L,C,B.
5	96	ROBLE 917 (EE)	0.8	++	L,C,B.					PERMANECEN IGUAL.	1	PRIMER ROJO CROMATO ZINC 974 (E)	0.9	+	L,C,B.
1		TABACO 984 (EE)	1.3	+++	L,C,B.						2	ROJO VENECIA 411 (UE)	0.9	+	L,C,B.
1		ROBLE 917 (EE)	1.0	+++	L,C,B. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA.						1	COBRE 928 (EE)	0.7	+	L,C,B.
1		CAFE 619 (CL)	1.3	+++	L,C,B. LIGERO CRECIMIENTO NICELIAL.						1	PRIMER ROJO CROMATO ZINC 974 (E)	1.0	+	L,C,O.
1		CAOBA 12 (OK)	1.3	+++	L,C,O.						1	LADRILLO 409 (UE)	1.1	+	L,C,O.
1		OXIDO ROJO 927 (EE)	1.0	+++	L,C,B.										
2	120	ROJO OXIDO 607 (CL)	1.0	+++	L,C,B.	1	CAFE 424 (UE)	2.0	+++	L,C,B.	2	ROBLE 917 (UE)	1.4	++	L,C,B.
2		ROJO OXIDO 17 (OK)	1.2	+++	L,C,B. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	1	CAFE 426 (UE)	2.0	+++	L,C,B. COLONIAS DISEMINADAS COLOR CANELA (EE).	1	LADRILLO 409 (UE)	1.0	++	L,C,B.
1		CAOBA 12 (OK)	1.5	+++	L,C,B. PROTUBERANTES.	1	OXIDO ROJO 927 (EE)	2.0	+++	L,C,B.	1	LADRILLO 409 (UE)	1.5	+++	L,C,O.
3		COBRE 920 (EE)	1.0	+++	L,C,B. LIGERAMENTE PROTUBERANTES.	4	CANELA 921 (EE)	2.0	+++	L,C,B.	1	LADRILLO 770 (UL)	1.1	++	L,C,B.
1		TABACO 984 (EE)	1.4	+++	L,C,O. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	2	LADRILLO 409 (UE)	2.0	+++	L,C,B.	1	ROJO VENECIA 411 (UE)	1.5	++	L,C,B.
1		CAFE 619 (CL)	2.0	+++	B,C,B. LIGERO CRECIMIENTO NICELIAL ALREDEDOR DE LA COLONIA. CENTRO PROMINENTE.	1	ROBLE 917 (EE)	2.0	+++	L,C,O. CRECIMIENTO NICELIAL. CENTRO PROMINENTE.	1	ROJO VENECIA 411 (UE)	1.3	+++	L,C,B.

N = 18

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO SH-SGY.

CANDIDA TROPICALIS

I						II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
1	24	BLANCA	0.1	+-	L,C.	1	CHICLE 422 (EE)	0.2	+-	L,C,B.	2	ALMENDRA 10 (OK)	0.1	+-	L,C,B.
2		MOSTAZA 769 (UL)	0.1	+-	L,C,B.	2	ALMENDRA 10 (OK)	0.2	+	L,C,B.	1	CANELA 921 (EE)	0.1	+-	L,C,B.
1	48	MOSTAZA 769 (UL)	0.8	++	L,C,B.	1	MOSTAZA 769 (UL)	0.6	++	L,C,B.	1	COBRE 920 (EE)	0.9	+++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA.
						2	CANELA 921 (EE)	1.2	+++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA.	1	ROJO OXIDO 607 (CL)	1.0	++	L,C,B.
											1	LADRILLO 770 (UL)	0.6	+	L,C,B.
1	72	ROBLE 917 (EE)	1.2	+++	L,C,B.	1	ALMENDRA 10 (OK)	0.8	+++	L,C,B.	1	ROJO OXIDO 927 (EE)	0.8		L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA.
2		TABACO 904 (EE)	1.3	+++	L,C,B. ANILLO METALICO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	2	CANELA 921 (EE)	1.2	+++	L,C,O.	1	ROJO OXIDO 607 (CL)	1.3	++	L,C,O.
											1	CAOBA 12 (OK)	1.1	++	L,C,O.
1	96	OXIDO ROJO (EE)	1.3	+++	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 926 (EE)	1.8	+++	L,C,B. BRILLO METALICO EN LA SUPERFICIE DE ALGUNAS COLONIAS.	1	LADRILLO 770 (UL)	1.8	+++	
						2	CANELA 921 (EE)	1.4	++++	L,C,O.	1	ROJO OXIDO 607 (CL)	2.0	+++	L,C,O. CENTRO DE LA COLONIA OPACO Y ALREDEDOR BRILLO METALICO.
											1	CAOBA 12 (OK)	1.1	++	L,C,O.
1	120	LADRILLO 770 (UL)	1.6	+++	L,C,B. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA, PROTUBERANTES.	1	AMARILLO OXIDO 625 (CL)	1.3	+++	L,C,B. COLONIAS PROTUBERANTES.	1	CAOBA 12 (OK)	1.0	+++	L,C,B. LIGERO CRECIMIENTO MICELIAL.
2		CAFE 424 (UL)	1.1	+++	L,C,O. ANILLO METALICO ALREDEDOR DE LA COLONIA	2	CANELA 921 (EE)	1.6	++++	L,C,O. CENTRO DE LA COLONIA OPACO Y ALREDEDOR BRILLO METALICO.	1	ROJO OXIDO 607 (CL)	2.7	+++	R,C,O.
												CAOBA 12 (OK)	1.5	+++	R,C,O.

CUADRO No. 13

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO Bi-SGV.

CANDIDA KRUSEI

I						II						III					
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS		ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	
2	24	DURAZNO 436 (UE)	-	+-	L,C,O.	-	-	-	-	-		3	-	-	-	-	
1		-	-	-	-	-	-	-	-	-							
1	48				IGUAL	1	ROJO OXIDO 927 (EE)	0.4	+	L,C,O.		2	INCOLORAS	-	+--	L.	
						1	CAFE CLARO	-	+-	L,C,O.		1	PERGAMINO 937 (EE)	0.1	+-	L,C.	
2	72	CAFE 619 (C)	0.6	+	L,C,O. ANILLO METALICO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	1	TABACO 944 (EE)	1.0	++	L,C,O.		2	BLANCAS	-	+--	L.	
1		AMARILLO OXIDO 926 (EE)	-	+-	L,C,B.	1	CAFE CLARO	0.3	+	L,C,B.		1	ALMENDRA 18 (OX)	0.1	+-	L,C,B.	
3	96				CONTINUAN IGUAL	3				CONTINUAN IGUAL		2	CREMA 21 (OX)	0.1	+-	L,C,B.	
												1	COBRE 920 (EE)	0.4	+	L,C,B. COLONIAS DISEMINADAS COLOR CANELA 921 (EE).	
2	120	CAFE 424 (UE)	1.0	++	L,C,O.	1	ROJO OXIDO 109 (UL)	1.0	+++	L,C,O. CRECIMIENTO MICELIAL.		1	LADRILLO 405 (UE)	0.2	+	L,C,O.	
1		PRIMER ROJO CROMATO ZN (E)	1.0	++	L,C,B.	1	CHICLE 422 (UE)	0.5	++	L,C,B. CENTRO DE LA COLONIA MAS OSCURO.		1	COBRE 920 (EE)	0.4	+	L,C. LIGERAMENTE BRILLANTES.	
												1	CANELA 12 (OX)	0.2	++	L,C,B.	

N = 3

CUADRO No. 17a.

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO Bi-GGY.

CANDIDA PARAPSILOSIS

	I					II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
1	24	-	-	-	-	1	ALMENDRA 10 (OK)	0.4	+	L,C,O.	1	CREMA	-	+-	L,C.
	48	-	-	-	-		CANELA 921 (EE)	1.3	++	L,C,O. ANILLO COLOR CREMA ALREDEDOR DE LA COLONIA.		CANELA 921(EE)	-	+-	L,C.
	72	COBRE 928 (EE)	0.1	+-	L,C. LIGERAMENTE BRILLANTES.		COBRE 928 (EE)	1.3	+++	L,C,O. CRECIMIENTO MICELIAL ALREDEDOR DE LA COLONIA.		COBRE 928 (EE)	0.2	+	L,C,O.
	96	PRIMER ROJO CROMATO ZINC (E)	0.2	+	L,C. LIGERAMENTE BRILLANTES.		ROJO OXIDO 607 (CL)	1.8	+++	L,C,O. CRECIMIENTO MICELIAL ALREDEDOR DELA COLONIA.		ROJO OXIDO 607 (CL)	0.8	+++	L,C,O.
	120	ROBLE 917 (EE)	0.3	++	L,C,O. ANILLO METALICO ALREDEDOR DE LA COLONIA.		ROJO OXIDO 607 (CL)	1.8	+++	L,C,O. LARGO CRECIMIENTO MICELIAL LIGERA PROTUBERANCIA.		CAFE 118 (DT)	1.8	+++	L,C,O. LIGERO CRECIMIENTO MICELIAL.

N = 1

CUADRO No. 13b.

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO Bi-GGY.

CANDIDA PSEUDOTROPICALIS

	I					II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
1	24	-	-	-	-	1	CREMA 21 (OK)	-	+--	L,C.	1	-	-	-	-
1		INCOLORAS	<0.1	+-	L,C,O.	1	CHICLE 422 (VE)	<0.1	+-	L,C,B.	1	-	-	-	-
1	48	-	-	-	-	1	ALFOMBRA 18 (OK)	0.1	+-	L,C,B.	1	CREMA 21 (OK)	-	+--	L,C,B.
1		AMARILLO OXIDO 412	0.7	+	L,C. LIGERAMENTE BRILLANTES.	1	AMARILLO OXIDO 926 (VE)	0.8	++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA	1	-	-	-	-
1	72	ROBLE 917 (EE)	0.1	+-	L,C,B.	1	ALFOMBRA 18 (OK)	0.1	+	L,C,B.	1	CREMA 21 (OK)	-	+--	L,C,B.
1		ORO AMARILLADO 970 (E)	1.0	++	L,C,B. COLONIAS DISEMINADAS COLOR MARFIL 601 (C). ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA	1	CANELA 921 (EE)	1.0	+++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA	1	PERGAMINO 937 (EE)	0.2	+-	L,C,B.
1	96	PRIMER ROJO CROMATO ZN 974 (E)	0.7	+	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 926 (VE)	1.0	++	L,C,B.	1	LADRILLO 770 (UL)	0.4	+	L,C,B.
1		ROJO VENECIA 411 (VE)	1.3	+++	L,C,B.	1	COBRE 928 (VE)	1.4	+++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA	1	LADRILLO 770 (UL)	1.0	+-	L,C,B.
1	120	CAFE 424 (VE)	1.0	++	L,C,B.	1	CANELA 921 (EE)	1.2	+++	L,C,B.	1	LADRILLO 770 (UL)	0.9	+++	L,C,B.
1		LADRILLO 770 (UL)	2.0	+++	L,C,B.	1	COBRE 928 (VE)	1.7	++++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA	1	CAOBA 12 (OK)	1.5	+	L,C,B.

N = 2

CUADRO No. 15a

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO BI-GSY.

CANDIDA GUILLIERMONDII

	I					II					III				
	ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
	1	24	CREMA 916 (EE)	0.1	+-	-	1	MARFIL 919 (EE)	0.1	+-	-	1	-	-	+-	-
	1		MARFIL	0.1	+-	L,C.	1	MARFIL 681 (EE)	0.3	+	L,C,O.	1	-	-	+-	-
	1	48	AMARILLO OXIDO 926 (E)	0.7	+	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 629 (CL)	0.8	+	L,C,B.	1	AMARILLO OXIDO 629 (CL)	0.3	+	L,C, MUY BRILLOSAS.
	1		ANTE 917 (EE)	0.9	+	L,C,O.	1	CANELA 921 (EE)	1.2	++	L,C,O.	1	ALMENDRA 631 (CL)	-	+-	-
	1	72	CANELA 921 (EE)	1.0	++	L,C,B.	1	CANELA 921 (EE)	1.0	++	L,C. MUY BRILLOSAS.	1	CANELA 921 (EE)	0.9	+++	L,C. MUY BRILLOSAS.
	1		CAOBA 12 (OX)	0.8	++	L,C,O.	1	COBRE 920 (EE)	1.2	+++	L,C,O.	1	CANELA 921 (EE)	0.2	+-	L,C,O.
	1	96	OXIDO ROJO 927 (EE)	1.2	++	L,C. MUY BRILLOSAS.	1	CANELA 921 (EE)	1.2	+++	L,C. MUY BRILLOSAS. ANILLO CLARO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	1	COBRE 920 (EE)	1.2	+++	L,C. MUY BRILLOSAS.
	1		TABACO 904 (EE)	1.0	++	L,C,O.	1	COBRE 920 (EE)	2.0	++++	L,C,O. ANILLO COLOR ANTE 917 (EE) ALREDEDOR DE LA COLONIA.	1	LADRILLO 770 (VL)	0.7	++	L,C,O.
	1	120	COBRE 920 (EE)	1.4	+++	L,C. MUY BRILLOSAS. ANILLO COLOR CREMA 916(EE) ALREDEDOR DE LA COLONIA. LIGERA PROTUBERANCIA.	1	CANELA 921 (EE)	1.2	+++	L,C. MUY BRILLOSAS. ANILLO CLARO ALREDEDOR DE LA COLONIA.	1	COBRE 920 (EE)	2.0	+++	L,C. MUY BRILLOSAS.
	1		TABACO 904 (EE)	1.2	+++	L,C,O. LIGERO CRECIMIENTO MICELIAL ALREDEDOR DE LA COLONIA.	1	COBRE 920 (EE)	2.2	++++	R,C,O. LIGERO CRECIMIENTO MICELIAL. PROTUBERANTES.	1	TABACO 904 (EE)	1.3	++	L,C,O. LIGERO CRECIMIENTO MICELIAL. PROTUBERANTES.

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO Bi-GGY.

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

	I					II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
B	24	-	-	-	-	B	CREMA 886 (M)	0.1	+++	L,C,B.	B	CREMA	-	+--	-
C		INCOLORAS	0.1	+-	L,C.	C	MARFIL 484 (UE)	0.3	+-	L,C,B.	C	CREMA	-	+--	-
D		-	-	-	-	D	CANELA 921 (EE)	0.8	++	L,C,D.	D	CREMA	-	+--	-
KCN		-	-	-	-	KCN	MARFIL 484 (UE)	0.1	++	L,C,B.	KCN	CREMA	-	+--	-
B	48	-	-	-	-	B	MARFIL 601 (CL)	0.8	++++	L,C,B.	B	CREMA	-	+--	-
C		DURAZNO 435 (UE)	0.1	+-	L,C,B.	C	CANELA 921 (EE)	1.0	++	L,C,B. LIGERA PROTUBERANCIA.	C	ALMENDRA 10 (DX)	0.4	+-	L,C,B.
D		-	-	-	-	D	CANELA 921 (EE)	1.4	++++	L,C,B.	D	CREMA	-	+--	-
KCN		INCOLORAS	0.1	+--	L,C.	KCN	ALMENDRA 10 (DX)	0.4	++	L,C,B.	KCN	CREMA	-	+--	-
B	72	INCOLORAS	0.1	+--	L,C.					PERMANECEN IGUAL QUE A LAS 48 HORAS	B	CREMA	-	+--	-
C		AMARILLO OXIDO 926 (EE)	0.2	+	L,C,B.						C	CANELA 921 (EE)	0.7	+-	L,C,B.
D		ROBLE 917 (EE)	0.1	+-	L,C,B.						D	CREMA	-	+--	-
KCN		CHAMPAÑA 445 (UE)	0.3	+-	L,C,B.						KCN	LADRILLO 405 (UE)	-	+-	L,C,B.
	96				PERMANECEN IGUAL QUE A LAS 72 HORAS.					PERMANECEN IGUAL QUE A LAS 48 HORAS	B	OXIDO ROJO 927 (UE)	0.4	+--	L,C,B.
											C	COBRE 928 (EE)	1.3	+	L,C,B.
											D	LADRILLO 770 (UL)	0.2	+-	L,C,D.
											KCN	COBRE 928 (EE)	0.4	+	L,C,B.
B	120	CHAMPAÑA 445 (UE)	0.1	+-	L,C.					PERMANECEN IGUAL QUE A LAS 48 HORAS	B	ROJO OXIDO 607 (CL)	0.8	+-	L,C,B.
C		CANELA 921 (EE)	0.3	+	L,C,B. CENTRO PROTUBERANTE.						C	ROJO OXIDO 109 (OT)	2.2	+++	L,C. CENTRO DE LA COLONIA OPACO Y ALREDEDOR BRILLO METALICO.
D		CAFE 424 (UE)	0.1	+	L,C,B. ANILLO COLOR CREMA ALREDEDOR DE LA COLONIA.						D	ROJO OXIDO 109 (OT)	1.8	+	L,C,B.
KCN		AMARILLO OXIDO 926 (UE)	0.1	+	L,C,B. ANILLO COLOR CREMA ALREDEDOR DE LA COLONIA.						KCN	ROJO OXIDO 109 (OT)	1.2	+++	L,C,B.

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO Bi-CGY.

TORULOPSIS SP

I						II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
10	24	INCOLORAS	0.1	+-	L,C,O.	10	BLANCAS	-	+-	L,C,O.	10	-	-	-	-
10	48	BLANCAS	0.1	+-	L,C,O.	10	BLANCAS	0.4	++	L,C,O.	10	INCOLORAS	-	+-	L,O.
1	72	BLANCO OSTION 798(UL)	0.4	++	L,C,O.						9	BLANCAS	0.2	+	L,C,O.
											1	INCOLORAS	-	+-	L,O.
1		CHICLE 422 (OX)	0.4	++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR BLANCO.	2	ALMENDRA 10 (OX)	1.0	+++	L,C,O.					
1		PERGAMINO448(OX)	0.4	++	TODAS COLONIAS DISEMINADAS COLOR	8	LIGERAMENTE CAFES.	1.0	+++	L,C,O.					
2		AMARILLO OXIDO 926 (EE)	0.4	++	BLANCO										
5		MOSTAZA 769 (UL)	0.4	++											
	96	-	-	-	PERMANECEN IGUAL QUE A LAS 72 HRS.	10	ALMENDRA 10 (OX)	1.2	+++	L,C,O.	6	CREMA 21 (OX)	0.8	++	L,C,O.
											2	MARFIL 919 (EE)	0.8	++	L,C,O.
											1	ALMENDRA 10 (OX)	0.4	+	L,C,O.
											1	INCOLORAS	-	+-	L,O.
2	120	CANELA 921 (EE)	1.0	+++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR CHICLE 422 (UE)	5	PERGAMINO 937 (UE)	1.2	+++	L,C,O.	5	ALMENDRA 10 (OX)	0.8	++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR MARFIL 404 (UE)
2		LADRILLO 778 (UL)	1.0	+++	L,C,O. ALREDEDOR DE LA COLONIA ANILLO COLOR CANELA 921 (EE).	3	MARFIL 401 (C)	1.2	+++	L,C,O.	3	CREMA 21 (OX)	0.8	++	L,C,O.
1		LADRILLO 405 (UE)	1.0	+++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR ROJO VENECIA 411 (UE).	2	ALMENDRA 10 (OX)	1.3	+++	L,C,O. ALREDEDOR DE LA COLONIA ANILLO COLOR CANELA 921 (EE).	1	CANELA 921 (EE)	0.8	++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR MARFIL 404 (UE)
1		LADRILLO 405 (UE)	1.0	+++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR BLANCO.						1	INCOLORAS	-	+-	L,C,O.
1		ROJO VENECIA 411 (UE)	1.0	+++	L,C,O. ALREDEDOR DE LA COLONIA ANILLO COLOR ROJO OXIDO 17 (UE).										
1		CHICLE 422 (UE)	1.0	+++	L,C,O.										
1		MOSTAZA 769 (UL)	1.0	+++	L,C,O. COLONIAS DISEMINADAS COLOR BLANCO.										
1		CHAMPAÑA 445 (UE)	1.0	+++	L,C,O.										

N = 10

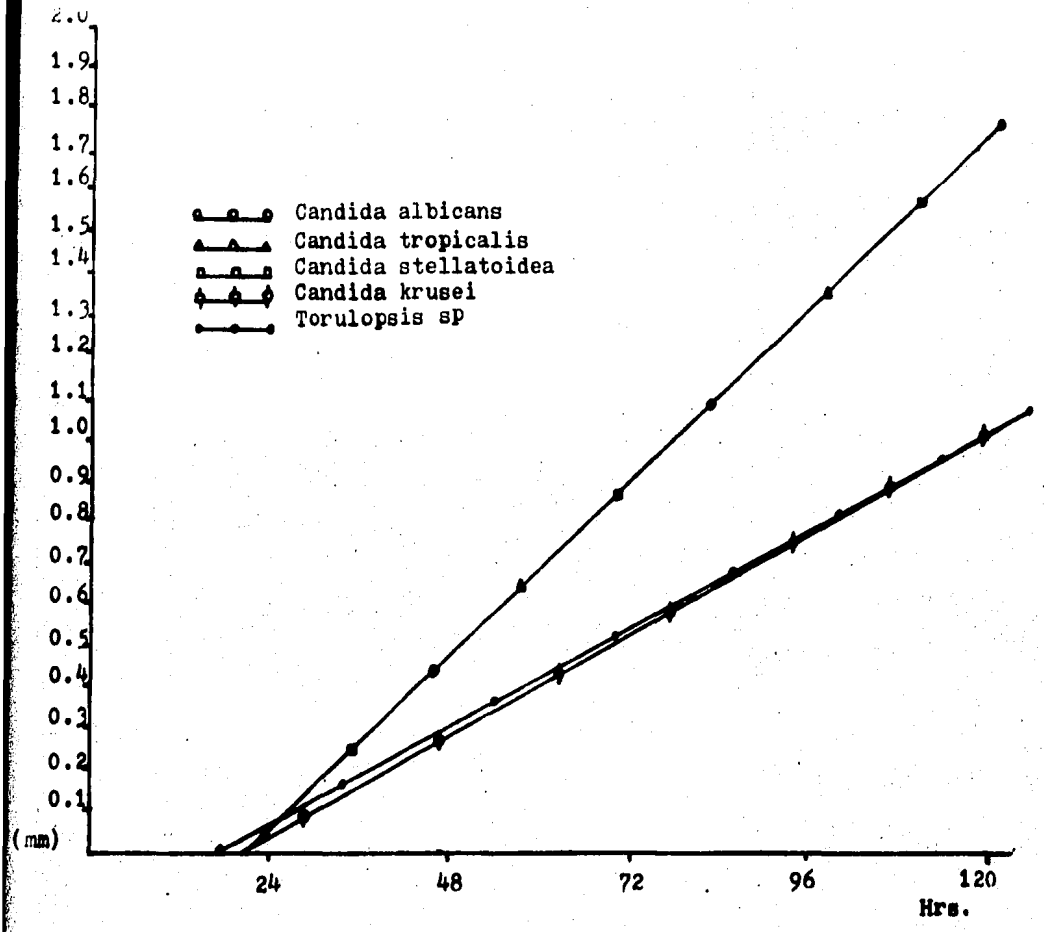
CUADRO No. 15a

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO AGAR SULFITO BISMUTO

TORULOPSIS sp

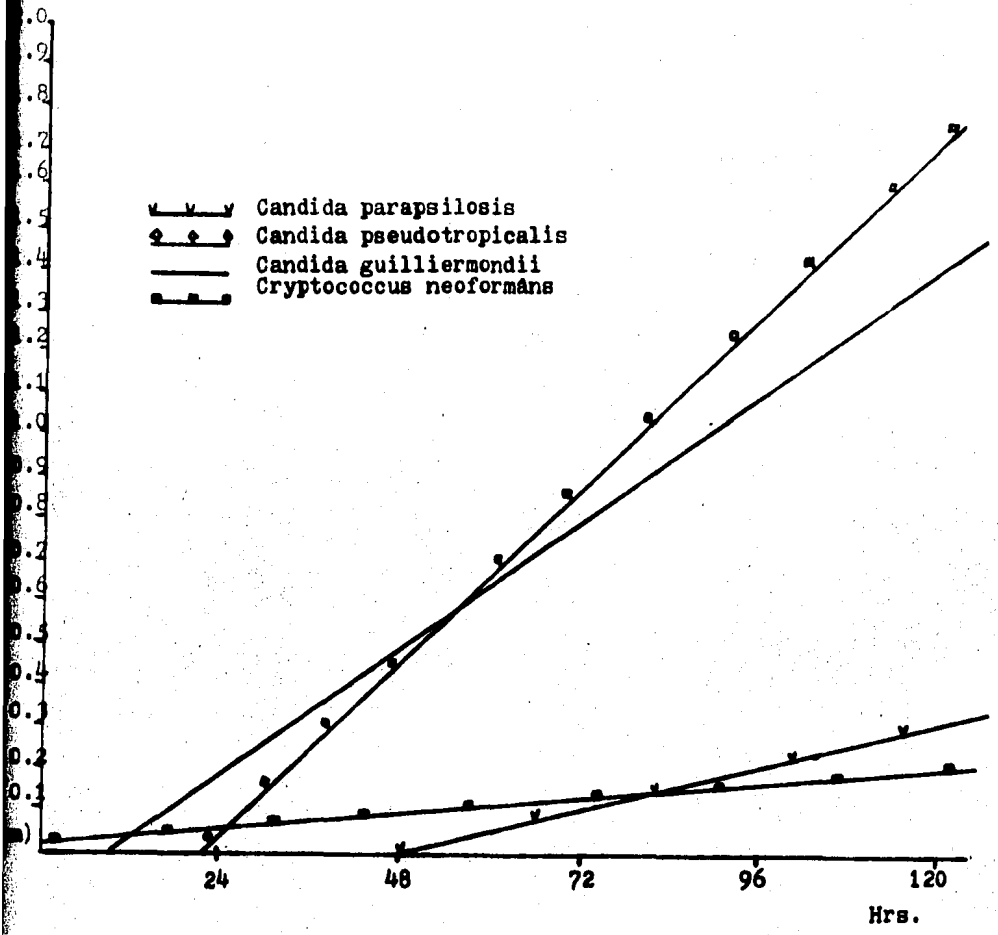
I						II					III				
ESPECIE	TIEMPO	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS	ESPECIE	COLOR	DIAMETRO	CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
10	24	CREMA	-	+-	L,C.	2	-	-	-	-	10	LIGERAMENTE CREMOSAS	-	+-	L,C.
10	48	CREMA	0.2	+	L,C,B.	9	CAFE TENUE	0.1	+-	L,C,B.	10	LIGERAMENTE CREMOSAS	0.5	+	L,C,B.
						1	CAFE TENUE	0.1	+	L,C,B.					
9	72	VERDE MANZANO 34 (UL)	0.5	+	L,C,B.	10	ORO 940 (UL)	0.8	+	L,C,B.	9	VERDE MANZANO 34 (UL)	1.0	+++	L,C,B.
1		VERDE MANZANO 34 (UL)	0.8	++	L,C,B.						1	VERDE MANZANO 34 (UL)	0.4	+++	L,C,B.
10	96	VERDE MANZANO 34 (UL)	1.0	++	L,C,B.	7	ORO 940 (UL)	1.0	+	L,C,B.	10	VERDE MANZANO 34 (UL)	1.2	+++	L,C,B.
						2	ORO 940 (UL)	1.0	++	L,C,B.					
						1	ORO 940 (UL)	1.0	+	L,C,B.					
10	120				PERMANECEN IGUAL	9	ORO 940 (UL)	1.2"	++	L,C,B.	7	VERDE MANZANO 34 (UL)	1.2	+++	L,C,B.
							ORO 940 (UL)	1.0	+	L,C,B.	3	VERDE MANZANO 34 (UL)	1.5	+++	L,C, MUY BRILLANTES. ANILLO CREMOSO ALREDEDOR DE LA COLONIA

N = 10



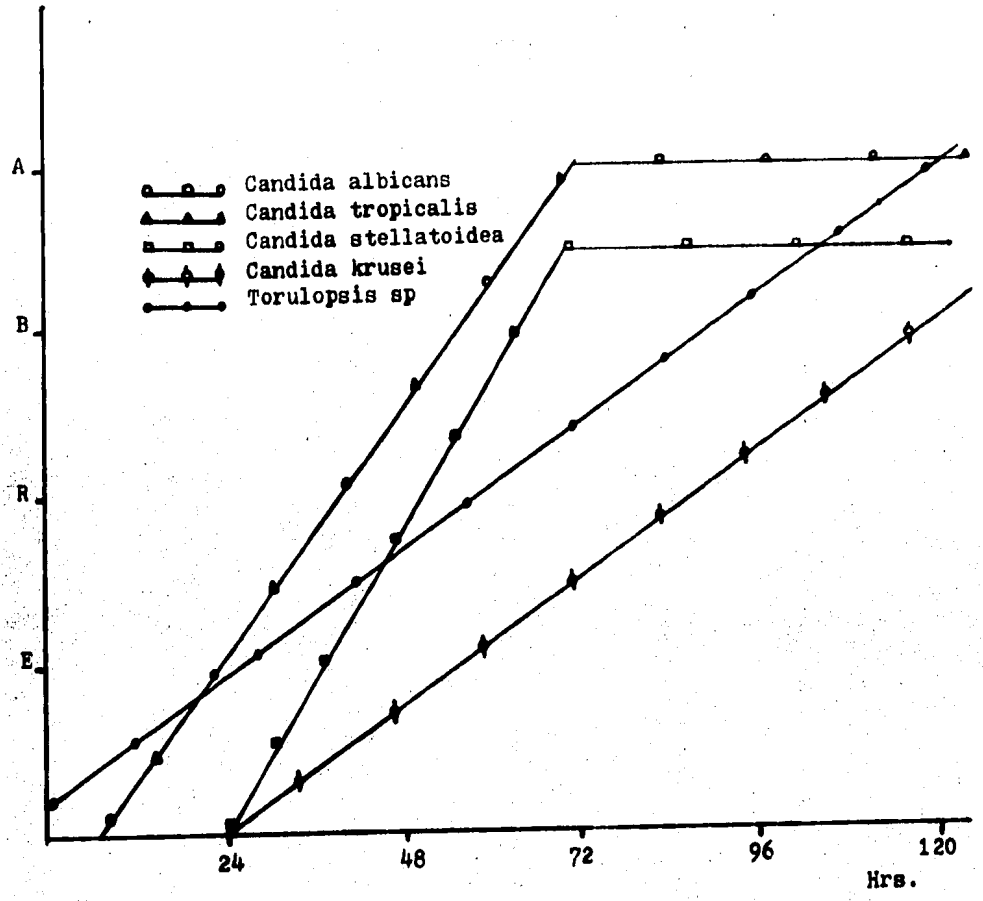
Gráfica A.- Diámetro de la colonia contra Tiempo de incubación.

El tamaño de la colonia tanto de C. albicans, C. tropicalis y C. stellatoidea son muy similares, a diferencia del tamaño para C. krusei y Torulopsis sp, aunque en estas dos últimas se puede - observar en el diámetro de la colonia cierta similitud.



Gráfica A'.- Diámetro de las colonias contra Tiempo de incubación.

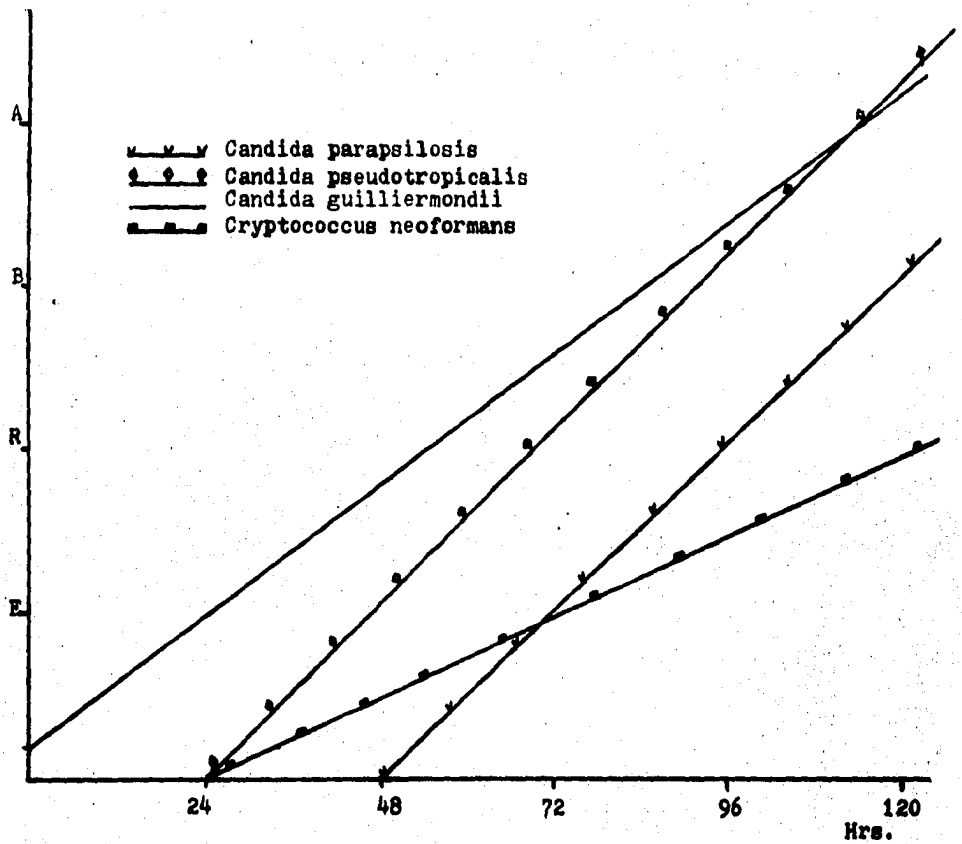
Se puede observar que existe cierta semejanza entre el diámetro obtenido de C. pseudotropicalis y C. guilliermondii, así como entre C. parapsilosis y Cryptococcus neoformans aunque el crecimiento de este se puede observar desde las 24 horas y para C. parapsilosis después de las 48 horas.



Gráfica B.- Crecimiento colonial contra Tiempo de incubación.

El crecimiento presentado por C. stellatoidea es menor en comparación con el de C. albicans y C. tropicalis, en cuyo caso es semejante. Torulopsis sp y C. krusei presentan similitud en el crecimiento, pero esta última lo tiene en menor proporción.

(A = Abundante; B = Bueno; R = Regular; E = Escaso).

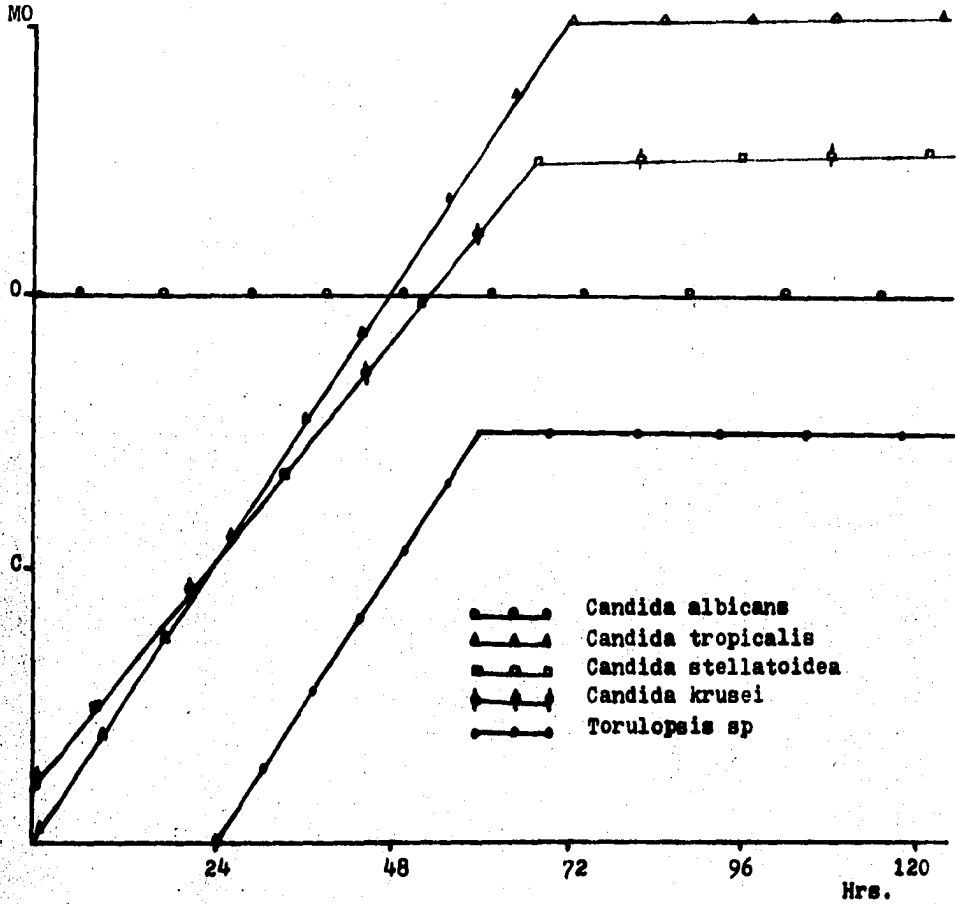


Gráfica B'.- Crecimiento colonial contra Tiempo de incubación.

El crecimiento para C. guilliermondii puede ser observado antes de las 24 horas, después de este tiempo se comienza a -- ver el crecimiento de C. pseudotropicalis y Cryptococcus neoformans

Posteriormente el crecimiento para C. parapsilosis se inicia.

(A = Abundante; B = Bueno; R = Regular; E = Escaso).

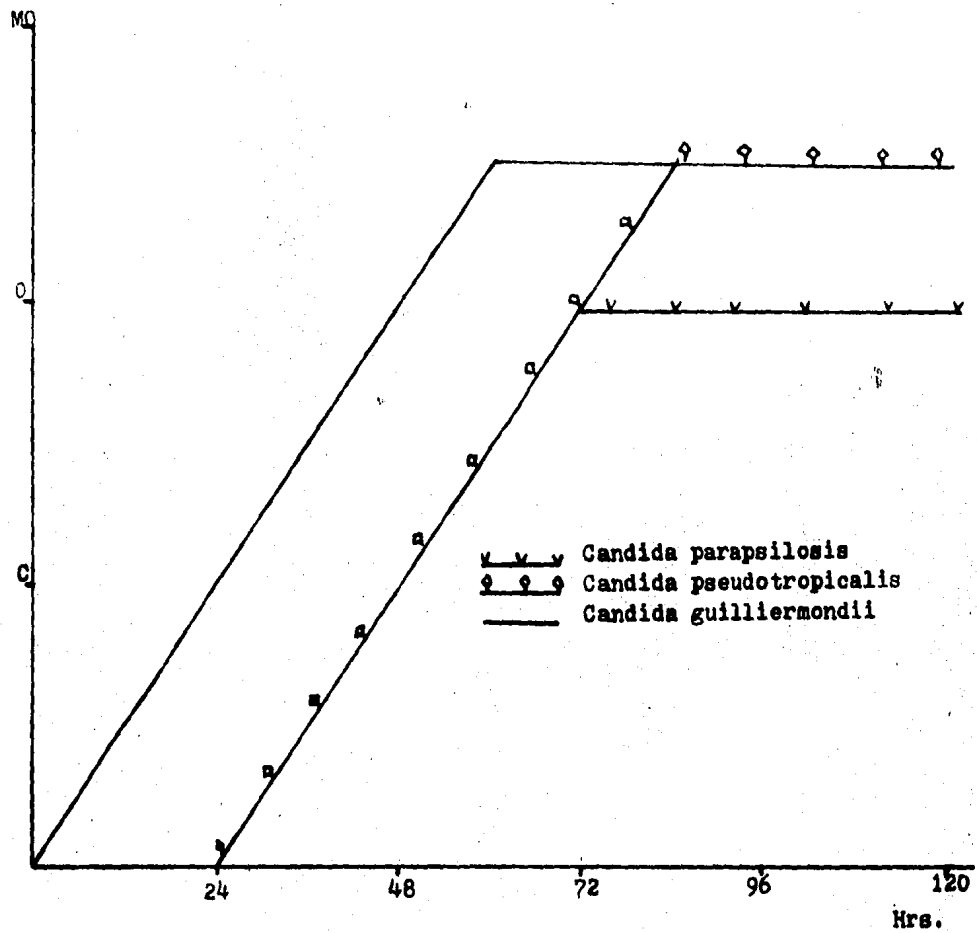


Gráfica C.- Color de las colonias contra Tiempo de incubación.

La intensidad de la coloración para C. stellatoidea, C. - Krusei y C. tropicalis es comparable, pero cerca de las 72 hrs. se observa que esta última adquiere mayor intensidad del color con respecto a las otras dos.

C. albicans desde un principio adquiere su máxima intensidad de color y se mantiene constante durante todo el tiempo de incubación, para el caso de Torulopsis sp, se puede observar - que la intensidad es menor con respecto a las otras.

(MO = Muy Oscuro; O = Oscuro; C = Claro).



Gráfica C'.- Color de las colonias contra Tiempo de incubación.

C. guilliermondii adquiere mayor intensidad después de las 48 horas, C. parapsilosis a las 72 horas y C. pseudotropicalis- cerca de las 96 horas.

(MO = Muy Oscuro; O = Oscuro; C = Claro).

5. DISCUSION

Con la colaboración de los métodos tradicionales de identificación realizados en las muestras proporcionadas, se determinó la prevalencia de las diferentes especies del género Candida que más comun mente se encuentran en el humano en las tres clínicas estudiadas.

Obteniendose una mayor prevalencia de C. albicans seguida de C. stellatoidea, C. tropicalis, C. krusei, C. pseudotropicalis, C. Parapsilosis, C. guilliermondii.

En 1963 el Dr. González Ochoa y Elsa García Ramos realizaron un estudio comparativo sobre la incidencia en México de las diferentes especies de Candida en mujeres, cuyos resultados son similares a los obtenidos por nosotros en este estudio[17].

Por otro lado, fué necesario determinar que no existian diferencias significativas en el muestreo de las tres clínicas en cuanto a la relación de especies del género Candida, lo cual se probó con un análisis estadístico de Xi^2, con un nivel de confianza del 95 %[25, 27].

En la mayoría de los laboratorios clínicos (si no es que en todos), la identificación de muestras sospechosas de candidosis se basa en la producción de tubo germinativo y en la coloración de las colonias de estos organismos en el medio de cultivo Bi-GGY, sin llevar a cabo la elaboración de las pruebas tradicionales de identificación. Lo cual nos indica un gran problema a nivel de laboratorio clínico, ya que se esta llevando a cabo un mal uso del medio de cultivo Bi-GGY, trayendo como consecuencia una identificación y por tanto un tratamiento equi

vocado.

Desafortunadamente, hasta ahora, no se ha encontrado un método - eficaz, rápido y exacto para la identificación de este tipo de microorganismos.

C. albicans, la más importante de todas las especies de este género, por ser la más patogéna tanto en humanos como en animales, presenta tres grupos antígenicos: A, B, C. De los cuales C. albicans - grupo A con C. tropicalis y C. albicans grupo B con C. stellatoidea - presentan una estrecha similitud antígenica[21, 22]. Mientras que el serotipo C, no se le ha encontrado similitud antigénica con las otras especies[40].

En lo que respecta a la evaluación del medio de cultivo Bi-GGY se encontraron varios inconvenientes, los cuales impiden el uso de - éste en el diagnóstico e identificación de Candida, siendo estos:

1) Las muestras proporcionadas en el medio de cultivo Bi-GGY de las tres clínicas, contienen mezclas de dos especies diferentes como fueron: C. albicans con C. krusei, C. krusei con Torulopsis sp, C. albicans con C. stellatoidea y C. albicans con C. tropicalis. (Datos no proporcionados en los resultados). Siendo esto de gran importancia debido a que no se puede establecer el agente causal de la infección, ya que se encontraban en diferentes proporciones, por ejemplo en algunas ocasiones C. albicans se encontraba en menor proporción que C. - Krusei.

2) Al principio de los estudios efectuados se encontraron diferencias en la morfología, consistencia y coloración de las cepas identi

ficadas como C. krusei cultivadas en SDA, por lo que fué necesario realizar otras pruebas como fueron formación de filamentos yfermentación de Trealosa,obteniendo que dichas cepas correspondían al género Torulopsis sp y no a C. krusei como se había supuesto, obteniendose así, una adecuada diferenciación de tales especies.

Lo cual nos indica un gran problema en el uso del medio Bi-GGY - para el diagnóstico clínico, donde además de observarse una gran prevalencia de este género en las muestras analizadas, se obtuvieron diferencias significativas en relación a las tres clínicas al someterlas al análisis estadístico de Xi^2.

3) Una falla muy importante del medio Bi-GGY fué que no fue posible diferenciar ninguna de las especies de Candida en este medio. Como se demuestra en los resultados obtenidos de las características de - crecimiento de las especies de Candida en el medio Bi-GGY, se observa claramente que este no fué eficaz para la identificación de especies a nivel diagnóstico, ya que presentan gran variabilidad en el color, crecimiento y características entre las diferentes especies y entre cepas de una misma especie, encontrandose iguales resultados para las cepas que se tomaron como referencia.

Esto difiere con lo informado por W. J. Nickerson, el cual dice que en el medio de cultivo Bi-GGY se puede llevar a cabo una diferenciación adecuada de cada una de las especies de Candida en base a su morfología, coloración y tiempo de crecimiento, el cual concluye que tal medio de cultivo es específico para tales microorganismos[38].

En lo que se refiere a los medios almacenados a diferentes condiciones no se pueden establecer patrones de referencia para la identificación de las especies, ya que en las tres condiciones de almacenaje se presentó gran discrepancia en todas las especies.

De acuerdo a lo estipulado por W. J. Nickerson (1953), el medio de cultivo Bi-GGY no debe de refrigerarse previo a su uso, sin embargo, en este trabajo se encontró que no importan las condiciones de almacenaje del medio preparado, ya que en ninguna de las condiciones se pudo establecer un parámetro de referencia para la diferenciación entre las especies del género Candida[38].

C. albicans y C. stellatoidea tuvieron crecimiento muy similar en dicho medio, no pudiendose llevar a cabo una distinción entre estas dos especies. Esto representa un serio problema debido a que C. stellatoidea no es considerada como patógeno importante y ultimamente ha sido considerada ser variante de C. albicans[8].

Otro aspecto a considerar es la similitud de crecimiento en el medio que presenta C. krusei y Torulopsis sp, en las primeras 48 horas; observando que C. krusei no es considerada una especie importante mientras que Torulopsis sp puede presentar alteraciones serias en casos de vulvovaginitis. En recientes estudios, Torulopsis sp se considera dentro del género Candida ya que se le ha encontrado similitud antigénica con las especies de este género[19].

4) El crecimiento de otros microorganismos como fueron Torulopsis sp y Cryptococcus neoformans presentando también pigmentación de sus colonias.

Esto aunado a lo anterior forma parte de los inconvenientes de este medio, ya que en un caso de Cryptococosis, empleando tal medio se obtendría un diagnóstico erroneo del agente causal y como consecuencia un tratamiento inadecuado.

6. CONCLUSIONES

Por lo que, como se observa se concluye que el medio de cultivo Bi-GGY no es eficaz para la identificación de las especies del género Candida como lo había establecido Nickerson.

A nuestro parecer, no es necesario el uso del medio de cultivo Bi-GGY en los laboratorios de diagnóstico, ya que se puede suplir con el uso del SDA y proporcionar un diagnóstico presuntivo, aunadas las pruebas tradicionales se puede llevar a cabo un adecuado estudio de-diferenciación.

Como un punto aparte, el Agar Sulfito Bismuto no fue eficaz para la diferenciación de las especies de Candida como se muestra en los resultados obtenidos.

Pero sí mostró ser útil de acuerdo a los resultados para poder diferenciar a C. krusei de Torulopsis sp. Siendo esto de gran importancia, debido a que estas especies presentan características similares de crecimiento en el medio de cultivo Bi-GGY como en la mayoría de sus pruebas de identificación.

7. BIBLIOGRAFIA

1.- Ajello,L;Georg,L.K;Kaplan,W. and Kaufman,L. (1980). Laboratory Manual for Medical Micology. Chapter: Classification of Yeast Li-Fungi. U. S. Deparment of Healh, Education and Welfare. Public He alth Service. Atlanta, Georgia. p: E-3.

2.- Alteras,I;Feuerman,E:J;David,M;Shobat,B. and Livni,E. (1979) Widely disseminated cutaneous candidosis in adults. Sabouraudia. - Vol. 17 p: 383 - 388.

3.- Barlow,A.J. (1967). Observations upon the growth of Candida albicans in serum. Proceedings of the 2nd. International Symposium on Medical Micology. October 6-8 th. Edited by Witold Sowins Ky, - Poznán Poland. p: 211 - 213.

4.- Barnett,J.A;Payne,R.W. and Yarrow,D. (1983). Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press Great Britain p: 38 - 46.

5.- Beneke,E.S. and Rogers,A.L. (1970). Medical Micology Manual. Chap ter Candidosis. Third edition. Minneapolis,Minn. Burges. Publishing Company. U.S.A. p: 40-41; 156; 165; 171.

6.- Burrows,W;William,M.J;Murdoch,L.R. and Willard,R.J. (1969). Tratado de Microbiología. Capítulo 32: Micología Médica. Hongos y Actinomicetos patógenos. 2a. Edición. Ed. Nueva Interamericana. S.A. de C.V. México. p: 670; 694.

7.- Campbell,M.C. and Stewart,J.L. (1980). The Medical Mycology Handbook. First Edition. A Widely Publications John Wiley & Sons. New

York.U.S.A. p:73-75;98-105;110-111;188-190;193-196;202-203;244-252.

8.- Chandler,W.F;Kaplan,W;Ajello,L. (1980). A Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases. Chapter 8. Candidosis. Wolfe Medical Publications LTD, p: 42 - 46.

9.- Currier,H.B. and Day,B.E. (1954). The Tetrazolium reaction in yeasts. Science. Vol. 119: 817.

10.- Davies,R.R. and Dening,T.J.V. (1972). Growth and form in Candida albicans. Sabouraudia. Vol. 10: 180 - 188.

11.- Dawson,C.O. (1962). Identification of Candida albicans in primary culture. Sabouraudia. Vol.I. Part I: 214-219. January 1961-1962.

12.- Denny,M.J. and Partridge,B.M. (1968). Tetrazolium medium as an aid in the routine diagnosis of Candida. J.Clin.Path. Vol.21:383-386.

13.-Emmons,Ch.W;Binford,Ch.H. and Utz,J.P. (1970). Medical Mycology. Chapter 14: Candidosis. Second edition. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. p: 178 - 179.

14.- Epstein,J.B;Truelove,E.L. and Izutu,K.T. (1984). Oral Candidosis Pathogenesis and Host Defense. Rew. of Infec. Dis. Vol. 6(1):96-102.

15.- Evans,E.G.V;Odds,F.C;Richardson,M.D. and Holland,K.T.(1974). The effect of growth medium on filament production in Candida albicans Sabouraudia. Vol.12: 112 - 119.

16.- Feo,M. y Pacheco,A (1976). Candida albicans: La leche en la producción de Clamidosporas. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 18 (1): 23 - 24. Enero - Marzo.

17.- Gonzalez-Ochoa,A. y García,E.R. (1963). Frecuencia de las monilias y moniliasis en vagina: Influencia de la antibioterapia. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Vol. XXIII. No.I y 2: 87 - 94.

18.- Gow,N.A.R. and Gooday,G.W. (1984). A model for the germ tube formation and micelial growth form of Candida albicans. Sabouraudia Vol. 22: 137 - 143.

19.- Hasenclever,H.F. and Mitchell,W.O. (1959). Antigenic relationship of Torulopsis glabrata and seven species of the genus Candida.- Bacteriology. Vol. 79: 657 - 681. September.

20.- Hasenclever,H.F. and Mitchell,W.O. (1961a). Pathogenicity of Candida albicans and Candida tropicalis. Sabouraudia.Vol.I.Part. I 16 - 21.

21.- Hasenclever,H.F;Mitchell,W.O. and Loewe,J. (1961b). Antigenic - studies of Candida. II. Antigenis relation of Candida albicans - group A and group B to Candida stellatoidea and Candida tropicalis. Journal Bacteriology. Vol.82. p: 574 - 577.

22.- Hasenclever,H.F. and Mitchell,W.O. (1961c). Antigenic studies of Candida albicans. III. Comparative pathogenicity of Candida albicans group A, group B and Candida stellatoidea. Journal Bacteriology. Vol. 82. p: 578 - 581.

23.- Hasenclever,H.F. (1971). The consistent formation of Chlamydospores by Candida tropicalis. Sabouraudia. Vol. 9: 164 - 166.

24.- Hendry,A.T. and Bakerspigel,A. (1969). Factors affecting serum -- inhibited growth of Candida albicans and Cryptococcus neoformans. Sabouraudia. Vol.7 Part 3: 219 - 229. October.

25.- Huldah,B. Introducción a la Bioestadística. Capítulo XII: La prueba de Xi cuadrado. Octava edición. Eudeba Manuales. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Nueva York.(1974) p: 159 - 178.

26.- Huppert,M;Harper,G;Sun,S.H. and Delanorelle,V. (1975), Rapid me-

thods identification of yeasts. Journal of Clinical Microbiology Vol. 2 (1): 21 - 34 July.

27.- Hurley,D.P;Aguilar,A.M;Garibay,J.R.B. y Landeros,J.V. Estadística Curso CINVESTAV-SEP:Depto. de Matemáticas,E.N.E.P - U.N.A.M. p: 82 - 95; 123.

28.- Joshi,K.R;Gavin,J.B. and Bremer,D.A. (1973). the formation of germ tube by Candida albicans in various peptone media. Sabouraudia. Vol. II: 259 - 262.

29.- Kamaya,T.M.D. (1968). Simple rapid identification of Candida albicans with emphasis on the differentiation between Candida albicans and Candida stellatoidea. Mycopathologia. Vol. 35: 105 - 112.

30.- Kennedy,M.J. and Volz,P.A. (1985). Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and disemination by Candida albicans Sabouraudia. Vol. 23; 265 - 273.

31.- Klotz,S.A;Drutz;D.J;Harrison,J.L. and Huppert,M. (1983). Adherence and penetration of vascular endotelium by Candida albicans. Infection and Inmunity. Vol. 42 (I): 374 - 384. October.

32.- Lategan,P.M;Erasmus,S.C. and DuPreez,J.C. (1981). Characterisation of pathogenic species of Candida by Chromatography: Preliminary - Findings. J. Med. Microbiology. Vol. 14: 219 - 222.

33.- Leegard,M. (1984). The incidence of Candida albicans in the vagina of "Healthy Young Women". Acta Obste Gynecol Scand. Vol. 63: 85-89

34.- Martin,M.V;Craig,G.T. and Lamb,D.J. (1984). An investigation of the role of true hypha production in the pathogenesis of experimental oral Candidosis. Sabouraudia. Vol. 22: 471 - 476.

35.- Martínez,C.E;Alba,F.J;Garza,G.D;Osorio,F;Ruiz,R.A;Sandoval,C.Ma. A;Tovar,T.C;Trujillo,G.A:(1982). Manual de Micología Médica. 3a.

Edición I.P.N. Departamento de Micología. México p: 13

6.- Muerkoester,G.C;Komorowski,R.A. and Farmer,S.G. (1979). A comparision of hyphal growth of Candida albicans in six liquid media. Sabouraudia. Vol. 17: 55 - 64.

7.- Nickerson,W.J. and Mankowski,Z.T. (1953a). A polisaccharide medium of know composition favoring Chlamydospore formation in -- Candida albicans. J. Infect. Dis. Vol. 92: 20 - 25. Jan-Feb.

8.- Nickerson,W.J. (1953b). Reduction of inorganic substances by yeasts I. Extracellular reduction of sulfite species of Candida. J. Infect. Dis. Vol. 93: 43 - 56. July - August.

9.- Odds,F.C. and Trujillo,G.A.(1974). Acid Phosphatase levels in - the genus Candida and their application to the taxonomy and identification of pathogenic Candida species. Sabouraudia. Vol.12:287-94.

0.- Odds,F.C (1979). Candida and Candidosis. First edition. University Park Press. Baltimore, U.S.A.

1.- Odds,F.C. and Abbott,A.B.(1980). A simple system for the presumptive identification of Candida albicans and differentiation of - strains within the species. Sabouraudia. Vol.18: 301 - 317.

2.- Odds,F.C.(1984). Demostration of septal pore in budding Candida-albicans yeasts cells. Sabouraudia. Vol 22: 505 - 507.

3.- Pagano,J;Levin,J,D, and Trejo,W.(1958). Diagnostic medium for differentiation of species of Candida. Antibiotics Annual. Vol. 1957 1958. p: 137 - 143.

4.- Rose,H.A. and Harrison,J.S. (1974).Biology of Yeasts Chapter 4: Yeasts as human an animal pathogens, Vol. 1 Third printing Academic Press Inc. London and New York p: 111 - 142.

45.- Rosenstein,E.(1982). Diccionario de especialidades Farmacéuticas 28a. Edición. Ed. P.L.M.S.A.México.

46.- Scherwitz,C;Martin,R. and Veberbeg.(1978). Ultraestructural investigation of the formation of Candida albicans germ tubes and septa. Sabouraudia. Vol. 16 p: 115 - 124.

47.- Segal,E;Soroka,A;Schecherter,A.(1984). Correlative relationship between adherence of Candida albicans to human vaginal epithelial cells in vitro and candidal vaginitis. Sabouraudia.Vol 22:191-200.

48.- Segretain,G;Drouhet,E. and Mariat,F.(1977). Diagnóstico de Laboratorio en Micología Médica. Capítulo Candidosis. La Prensa Médica Mexicana. 1a. Reimpresión México. p: 50 - 62.

49.- Silva,M.H. (1969). La Monilia psilosis de Ashford y la Candida albicans de hoy. Boletin Asoc. Méd.P.R. Vol 61(2): 61 - 64

50.- Soll,D.R. and Mitchell,L.H. (1983). Filament ring formation in the dimorphic yeasts Candida albicans. J.Cell.Biol. Vol 96:486-493

51.- Taguchi,M;Toukiji,M. and Tsuchiya,T (1979). Rapid identification of yeasts by serological methods a combined inmunological and biological methods. Sabouraudia. Vol 17: 185 - 191.

52.- Tamayo,R.P;Carrasco,M.D;Garza,M.V. and Victoria,R.V (1976). Zigomicosis y Candidosis rinocerebral,presentación de un caso. Sabouraudia. Vol. 14: 223 - 230.

53.- Torosantucci,A. and Cassone,A.(1983). Induction and morphogenesis of Chlamidospore in agerminative variant of Candida albicans. - Sabouraudia. Vol. 21: 49 - 57.

54.- The United States Pharmacopeia. (1975). U.S.P. XIX. Revisión Oficial p: 348 - 349.

55.- Velasco,C.O;Tay,Z.J. (1975). Micología para estudiantes de Medicina. Manual. Capítulo 1. Clasificación de los hongos. Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina. U.N.A.M. - México p: 1 - 5.

56.- Walker,G.M;Sullivan,P.A. and Shepard,M.G. (1984). Magnesium and - regulation of germ tube formation in Candida albicans. J. J. Gen-Microbiology. Vol. 30: 1941 - 1945.

57.- Yamaguchi,H. (1979). Micelial developmental and chemical alteration of Candida albicans from biotin insufficiency. Sabouraudia. Vol. 12 p: 320 - 326.

58.- Zapater,C.R. (1970). Introducción a la Micología Médica. Capítulo VI Acerca del género Candida. 2a. Edición. Ed El Ateneo. Buenos Aires. p: 60 - 61.