

5
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

NUEVA METODOLOGIA PARA LA TIPIFICACION
DEL GENERO Candida

(Estudio de 200 cepas)



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS MANCOMUNADA

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
presentan:

MINERVA ALCUBIERRE MOYA
LAURA ALICIA RAMIREZ CHAVEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1990



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.

INDICE

| | Página. |
|-----------------------------------|---------|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| OBJETIVOS..... | 3 |
| ANTECEDENTES | |
| DEFINICION..... | 5 |
| ETIOLOGIA..... | 5 |
| EPIDEMIOLOGIA..... | 6 |
| FACTORES PREDISONENTES..... | 7 |
| - DIAGNOSTICO DE LABORATORIO | |
| EXAMEN DIRECTO..... | 9 |
| CULTIVOS..... | 10 |
| PRUEBAS INMUNOLOGICAS..... | 11 |
| SEROLOGIA..... | 11 |
| - TIPIFICACION | |
| PRUEBAS BIOLOGICAS..... | 13 |
| PRUEBAS FISIOLOGICAS..... | 19 |
| MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS..... | 23 |
| METODOLOGIA..... | 27 |
| RESULTADOS..... | 34 |
| DISCUSION DE RESULTADOS..... | 62 |
| CONCLUSIONES..... | 70 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 72 |

INTRODUCCION

Sin duda alguna, la candidosis es la micosis más frecuente y que más se diagnostica en todo el mundo; la mayoría de autores citan como principal agente etiológico de ésta a C. albicans, la cual es aislada en un 60-65% de los casos, dependiendo de la topografía clínica. Del resto de las especies no se tienen datos fidedignos, debido a que hay muy pocos estudios que las determinen.

En general los criterios para tipificar a C. albicans son muy pobres; muchos estudios se basan únicamente en la formación de tubos germinativos, pero ahora sabemos que ésta no es una prueba determinante sino nada más orientadora.

Otro problema para la tipificación de las diversas especies de Candida, es que los criterios bioquímicos y fisiológicos varían de autor a autor, lo que ocasiona que de acuerdo a la fuente consultada, sea clasificada la especie en estudio; esto origina que una misma cepa pueda ser nombrada con dos o más especies diferentes.

En la actualidad existen muchos criterios de tipificación inmunológica, los cuales ofrecen ventaja debido a su exactitud, ya que emplean variantes antigénicas específicas para cada especie. Sin embargo no pueden usarse en forma rutinaria ya que tienen un costo muy elevado.

De acuerdo a lo anterior, pretendemos hacer un estudio de 200 cepas aisladas de casos patológicos comprobados, y hacer una correlación de las especies obtenidas con algunos aspectos epidemiológicos y clínicos como topografía clínica, frecuencia, etiología, sexo, edad, etc. Además de utilizar los métodos convencionales para la tipificación, plantearemos nuevas posibilidades basándonos en pruebas fisiológicas sencillas y rápidas, que puedan utilizarse en los diversos laboratorios de rutina.

OBJETIVOS

- Aislar y tipificar 200 cepas de Candida sp, mediante la metodología habitual.
- Proponer y evaluar nuevas técnicas fisiológicas para la tipificación del género Candida.
- Estandarizar los criterios de tipificación del género Candida, de acuerdo a la metodología habitual y la propuesta.
- Correlacionar los agentes etiológicos aislados de acuerdo a sexo, topografía clínica, etc.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Definición

La candidosis es causada por diversas especies de Candida, generalmente C. albicans, es una infección aguda o subaguda en la cual el hongo puede producir lesiones en boca, vagina, piel, uñas y ocasionalmente en bronquios, pulmones o vísceras (1,2).

Etiología

Aunque C. albicans es el agente etiológico comúnmente encontrado en las diversas formas de candidosis, existen algunas especies que presentan un poder patógeno menor y que producen por lo general un sólo tipo clínico de candidosis (3). Las especies de Candida que destacan son :

- Candida albicans (65-85%)
- Candida stellatoidea
- Candida tropicalis
- Candida parapsilosis
- Candida krusei
- Candida pseudotropicalis
- Candida guilliermondii
- Candida zeylanoides

Epidemiología

La candidosis es una enfermedad cosmopolita y sin duda alguna es la micosis que más se presenta en todo el mundo, ocurre en todas las edades y razas y en ambos sexos (1,2).

El hábitat de las diversas especies de Candida es el humano y algunos animales homeotérmicos. No se aísla del suelo, ni de los detritus vegetales (1).

Algunas especies de Candida son componentes de la flora habitual del cuerpo ; penetran en los primeros días del nacimiento y se instalan preferentemente en las mucosas (4). C. albicans no forma parte de la flora de uñas, su aislamiento de éstas por lo general indica candidosis (1).

Este microorganismo puede ser aislado de la boca, tracto gastrointestinal, vagina, y en menor proporción de la piel, aproximadamente en el 40% de la población normal (5). Su presencia como parte de la flora habitual, puede variar en individuos de diferente localización geográfica y dentro de una misma población, en grupos con diferentes tipos de dieta (6).

Factores Predisponentes

Como ya se mencionó, C. albicans es un microorganismo comensal extensamente propagado, sin embargo, un cierto número de eventos exógenos pueden inducirlo a actuar como patógeno (1) :

- Factores fisiológicos. Cambios de pH en vagina y boca, embarazo, prematurez, etc.

- Enfermedades o procesos debilitantes. Diabetes, tuberculosis, amibiasis hepática, desnutrición, etc.

- Inmunodeficiencias primarias o adquiridas. Leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, SIDA y para el caso específico de la candidosis mucocutánea generalizada, agamaglobulinemias y síndrome de Di George.

- Iatrogénicos. Tratamientos prolongados con antibióticos, corticoesteroides y citotóxicos; tratamientos anticonceptivos orales y dispositivos intrauterinos.

- Ocupacionales. Especialmente candidosis interdigital y onicomiosis de las manos en personas que mantienen éstas húmedas, como lavanderas, amasadoras de pan y tortilla, limpiadoras de fruta y pescado, etc.

- Miscelánea. Dermatitis inflamatorias previas (dermatitis de contacto y del Área del pañal), traumatismos ungueales, mal estado de la dentadura, prótesis mal adaptadas y humedad (1).

Aunque en la mayoría de los casos la candidosis se adquiere de forma endógena al presentarse cualquiera de los factores anteriormente descritos, en algunas ocasiones puede adquirirse de forma exógena, como en el caso de drogadictos que utilizan jeringas contaminadas o al mantener relaciones sexuales con una persona enferma.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La toma de muestra es variable, ya que la candidosis se puede presentar en todas partes del cuerpo, así que los productos que se recolectan son : exudados, escamas, sangre, expectoraciones, orina, L. C. R., etc.

- Examen directo : Si el material a examinar es cutáneo o de las uñas, se trata con hidróxido de potasio al 20-30%, en caliente, entre porta y cubreobjetos. Si se trata de un exudado, pus, expectoración o cualquier otra sustancia de consistencia semilíquida, la observación se realiza tras colorear con las técnicas de Gram, Giemsa o PAS. Las especies de Candida son Grampositivas. Al microscopio se observan grandes acúmulos de blastoconidios de aproximadamente 2 a 4 μ de diámetro y pseudomicelio corto o largo (3); esta imagen determina el estado patógeno y virulento de la levadura y nos afirma el diagnóstico. En el caso de piel y uñas por lo regular no se encuentra pseudomicelio, pero el solo aislamiento del hongo en los medios de cultivo, confirma la enfermedad debido a que Candida sp no es flora habitual de esta región (1).

- Cultivos : El material obtenido en forma estéril se debe sembrar en medios tales como : agar dextrosa Sabouraud, gelosa sangre, infusión cerebro corazón o extracto de levadura (1). Cuando se cultivan expectoración, pus y otros materiales contaminados, conviene agregar cloramfenicol y cicloheximida (actidione) al medio para evitar la contaminación de los cultivos por bacterias y hongos saprófitos respectivamente (2). Sin embargo, hay algunas especies que son inhibidas por la cicloheximida, por ejemplo, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei y C. zeylanoides, por lo que se recomienda sembrarlas siempre al par en medio Sabouraud. El desarrollo del organismo se manifiesta de 2 a 4 días a 28 °C o 37 °C presentando colonias blanquecinas, cremosas, de tamaño medio y de aspecto mate o húmedo. Hay medios de cultivo selectivos para el género Candida, como el Biggy (Nickerson), que contiene gran cantidad de citratos que eliminan la flora bacteriana y sulfitos, que al ser reducidos a sulfuros dan una coloración café a las colonias, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes (3); aunque en algunas ocasiones C. neoformans puede también pigmentar dando colonias café mucoides (7).

Para el criterio del diagnóstico de laboratorio, un cultivo positivo no indica necesariamente una candidosis, ya

que Candida es forma parte de la flora habitual y por esto es importante la correlación de los aspectos clínicos y micológicos para llegar al diagnóstico integral.

- Pruebas Inmunológicas : Se realizan aplicando en forma intradérmica una décima de antígeno llamado candidina. Este puede ser monovalente (de C. albicans) o polivalente (de diversas especies de Candida). Una reacción positiva posee poco valor diagnóstico, ya que indica únicamente primo contacto. Se ha observado en un 30-60 % de la población en general. En la actualidad esta prueba al igual que el PPD se utiliza para valorar hipersensibilidad tardía (1).

- Serología : Se ha reportado que del 20 al 40% de los adultos sanos pueden presentar anticuerpos aglutinantes contra C. albicans (5). Es por esto que la cuantificación de anticuerpos tiene un valor relativamente bajo y solo tiene utilidad en las candidosis sistémicas en correlación con la clínica y los datos micológicos.

Dolan y Stried (8) realizaron un trabajo sobre el diagnóstico serológico de infecciones por levadura. En estudios microbiológicos de pacientes post-mortem, obtuvieron resultados sorprendentes sobre el número de infecciones causadas por levaduras que no fueron detectadas

antes de la muerte del paciente, debido a la dificultad para diagnosticar una infección diseminada. Estos autores proponen la combinación de tres técnicas para el diagnóstico de una infección por levaduras. Las técnicas propuestas y los parámetros utilizados son:

- Título de aglutininas > 1:80.
- Título de antiglobulina humana > 1:128.
- Presencia de precipitinas (técnica de Ouchterlony).

Otra aportación a este respecto fue hecha por Monson y Wilkinson en 1961 (9). Sus estudios han sugerido que pacientes con candidosis invasiva se distinguen por tener elevadas concentraciones en suero de D-arabinitol y pacientes con candidemia, por un incremento en la concentración de manosa. La desventaja de esta determinación es que las sustancias se detectan mediante cromatografía gas-líquido, lo que requiere de equipo más sofisticado.

TIPIFICACION

Una vez aislado el agente etiológico en cualquiera de los medios anteriormente mencionados, se procede a su tipificación empleando diversos métodos :

- Pruebas biológicas :

a) Formación de tubos germinativos. Es una prueba presuntiva y rápida, que nos permite identificar a C. albicans, aunque no es determinante. La confiabilidad de esta prueba ha sido confirmada por varios autores (10,11,12,13). Consiste en sembrar la levadura en una pequeña cantidad de medio (suero humano) e incubar durante 3 a 3.5 horas a 37 °C. Al cabo de este tiempo sólo C. albicans forma un tubo germinal, de aproximadamente 5 a 15 μ de longitud, dando la imagen de un "espejo de mano" o de una "raqueta". Su nombre es debido al parecido que tiene con la fase inicial de la hifa de un hongo filamentoso (14). La lectura debe hacerse exactamente a las 3.5 horas ya que pasado este tiempo todas las especies de Candida presentan tubos germinativos. Debido a esto esta prueba no es muy confiable y debe apoyarse en otros datos como la formación de clamidoconidios y el zimograma.

Es importante remarcar que otras especies de Candida, como C. stellatoidea, C. utilis y C. rugosa pueden presentar los tubos germinativos a las 3 o 3.5 horas de incubación. Esto no representa mayor problema en el caso de las últimas dos especies ya que no se han reportado como oportunistas, en cambio C. stellatoidea si es un agente patogeno para el humano.

Esta prueba es sumamente útil en la mayoría de los laboratorios; sin embargo, puede generar un determinado número de resultados falsos positivos y negativos. Esto está determinado por ciertos factores, los que dependen tanto de la cepa como del suero e incluso de la cantidad de inóculo, ya que las células en exceso pueden provocar un resultado falso negativo (14).

Zaragoza Hernández y cols. (15) realizaron un estudio con el fin de evaluar la eficacia de distintos tipos de suero (normales y con diversas alteraciones) en la formación de tubos germinativos de Candida sp. Los resultados que obtuvieron indican que el mayor porcentaje de formación de tubos se obtiene empleando suero de personas sanas y en orden decreciente el suero humano icterico, suero humano lipemico, suero de caballo, albúmina de huevo y plasma de personas diabeticas. Este estudio demuestra que las

diferentes alteraciones en el suero, provocan resultados muy variables lo que resta importancia a esta prueba.

El empleo de suero para la formación de tubos germinativos, presenta desventajas por no ser un medio estandarizado, debido a esto y a que no se sabe con exactitud que componente o componentes del suero son los que inducen la producción de dichas estructuras, diversos autores han realizado estudios con el fin de obtener un medio más confiable. A continuación se citan algunos de los hallazgos más importantes :

- Joshi y cols. (13) reportaron haber obtenido excelentes resultados empleando suero bovino con diferentes diluyentes (trypticase soya caldo, agua peptonada y solución salina) a diversas concentraciones. Sus estudios los llevaron a comprobar que el trypticase soya caldo inducía la formación de tubos germinativos al cabo de 3 horas sin necesidad del suero. La ventaja de utilizar el trypticase soya caldo combinado con el suero bovino, es que el tiempo de incubación se reduce a 2 horas. Al adicionar al suero sales biliares el tiempo se reduce a 1.5 horas.

- Land y cols. (16) observaron que C. albicans forma tubos germinativos en un medio amortiguado de fosfatos con altas concentraciones de glucosa. Si la concentración de glucosa es baja, la filamentación sólo ocurre cuando varios

aminoácidos de la familia del glutamato, aspartato o piruvato, son usados como fuente de nitrógeno.

- Dabrowa y cols. (17) ensayaron un medio de prolina-biotina-amortiguador, en el cual la concentración de fosfato y glucosa era muy importante para la formación de tubos germinativos.

- El medio descrito por Lee y cols. (18) está compuesto por seis aminoácidos (metionina, lisina, fenilalanina, alanina, leucina y prolina), biotina, sales inorgánicas y glucosa. Este medio es útil para el crecimiento de la fase levaduriforme y micelial de C. albicans a 25 °C y 37 °C respectivamente.

- Mattia y Cassone (19) proponen como inductor de la formación de tubos germinativos a la N-acetil-glucosamina, además del suero.

- Shepherd y cols. (20) obtuvieron resultados similares utilizando N-acetil-glucosamina o glucosa-glutamina.

- Holmes y Shepherd en 1967 (21) publicaron un artículo en el cual describen un medio amortiguado de prolina o N-acetil-glucosamina donde C. albicans produce tubos germinativos en 60 a 90 minutos a 37 °C.

Comprobaron que la prolina es el único promotor de la formación de tubos germinativos en el medio de Lee, y que la fuente de carbono (glucosa) y de vitamina (biotina), fueron

requeridas únicamente para mantener el crecimiento de la levadura.

- En un estudio posterior realizado en 1988 (22), estos mismos autores describen que C. albicans forma tubos germinativos en una solución de glucosa-iones de amonio. Sostienen que la presencia, tanto del azúcar (glucosa, sacarosa o galactosa), como de una fuente de nitrógeno (ión amonio o un aminoácido que se metabolize vía glutamato), son críticos para la morfogénesis.

Algunas cepas presentan pseudomicelio desde su primoaislamiento en medios comunes como Sabouraud, biggy, extracto de levadura, gelosa sangre, etc., éste puede llegar a confundirse, ante ojos inexpertos, con los tubos germinativos. Para distinguirlos hay que tomar en cuenta que las características primordiales del tubo germinativo son muy diferentes a las del pseudomicelio, ya que el primero se encuentra invaginado en la levadura y se observa limpio en su interior y el pseudomicelio presenta inclusiones, además de que llega a ser muy largo y con estrangulamientos eventuales.

b) Formación de clamidoconidios. Los clamidoconidios, para algunos autores, son células de resistencia, por lo tanto su formación se ve favorecida por una baja tensión de oxígeno, deficiencia de nutrientes y una temperatura entre 16 °C y 25 °C. El medio se prepara en cajas y la cepa se siembra en forma de estria larga, se incuba durante 48 a 72 horas y se observa. Es importante remarcar que pasado este tiempo los blastoconidios presentes en el medio dificultan la observación. La lectura puede hacerse de dos formas :

- Tomando una asada de la colonia y colocandola entre porta y cubreobjetos con un colorante de contraste (azul de lactofenol).

- Colocando directamente la caja sobre la platina del microscopio.

El medio en el que se observan mejores resultados es el de harina de maíz (corn meal-agar) con algún agente tensoactivo como puede ser el Tween 80 al 1 %. También pueden utilizarse otros medios como el agar arroz - Tween 80 al 1% (23) o el papa zanahoria agar (24). Feo (25) reporta buenos resultados con medios como el Oxgall agar (a base de sales biliares) y leche diluida agar.

Morfología de los clamidoconidios : Su formación es a partir de pseudohifas; generalmente son esféricos, su tamaño

es mayor al de los blastoconidios (16 a 20 μ), presentan una doble membrana refringente y su localización, la mayoría de las veces es terminal, aunque se pueden presentar intercalados (25).

Esta prueba biológica es determinante para C. albicans y sólo en raras ocasiones C. stellatoidea y C. tropicalis pueden formar clamidoconidios (26). El resto de las especies sólo presentan pseudohifas y blastoconidios, y se distinguen por la doble membrana refringente y el tamaño.

- Pruebas fisiológicas :

1. Pruebas bioquímicas.

Se basan en la utilización (auxonograma) y fermentación (zimograma) de carbohidratos. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de Candida. Estas pruebas también son útiles para otros géneros y especies de levaduras.

a) Auxonograma. Las pruebas de asimilación de carbohidratos son de gran utilidad. Existen varios métodos de estudio : el de Wickerham en tubo y el auxonograma en placa con un medio base sin azúcares, al que se añaden los carbohidratos en discos de papel impregnado (27). Se siembra una aséda en el medio y se incuba durante 8 a 10 días a

temperatura ambiente. Las lecturas se realizan observando crecimiento en el medio, ya sea turbidez en el tubo o un halo de crecimiento alrededor de los discos. Es importante citar que aunque estas pruebas son confiables, la facilidad con que se contaminan los medios y el tiempo que requiere prepararlos representan un problema.

Martin y cols. (28) proponen realizar el auxonograma en tubos con agar inclinado al 2%, medio basal y el azúcar a una concentración final de 1%.

b) Zimograma. El estudio de la fermentación de carbohidratos complementa estas pruebas bioquímicas. Se utiliza un medio líquido-base al que se añade cada azúcar por separado, más un indicador de pH. Se incluye al tubo una campana de fermentación para captar los gases liberados. Esta prueba se lee a los 8 a 10 días de haber inoculado los tubos con una asada de la cepa. Se mantienen a temperatura ambiente. Un vire del indicador indica un resultado positivo. Debe anotarse si existe o no producción de gas dentro de la campana.

Para la detección de la producción de gas puede utilizarse un sello de parafina-vaselina (5 grs. en 1 ml.) en la superficie del medio, y la lectura se realiza observando un desplazamiento de éste (29).

11. Reducción de sales de tetrazolio. Esta prueba es importante sobre todo cuando hay confusiones entre C. stellatoidea con clamidoconidios positivos y C. albicans.

La cepa se siembra en caja en forma de estrias. Se utiliza el medio Pagano-Levin (30,31) que contiene un indicador biológico, lo que permite una simple y rápida diferenciación de C. albicans de otras especies. Los resultados se observan a las 48 a 72 horas de incubación a temperatura ambiente. La presencia de un antibiótico de amplio espectro incorporado al medio, impide la contaminación por bacterias. Este medio es ligeramente más rico en nutrientes que el Sabouraud. La diferenciación de C. albicans se basa en las distintas coloraciones que presentan las colonias en el medio. Estas se deben a la capacidad en diferente grado, por parte de las levaduras, de reducir un compuesto de tetrazolio, incluido en el medio, a partículas insolubles coloridas. Debido a que C. albicans tiene una capacidad muy limitada o casi nula de reducción, su coloración va de blanca a un rosa muy pálido. Aunque C. krusei también puede producir colonias blancas, es fácil su diferenciación ya que sus colonias aparecen planas, secas y mate, en contraste con la textura cremosa de las colonias de C. albicans (31).

MATERIAL Y METODOLOGIA

MATERIAL

- Algodón absorbente
- Asa bacteriológica
- Asa micológica
- Bisturí
- Bulbos de goma
- Cajas Petri desechables
- Campana de fermentación
- Cinta adhesiva (scotch)
- Cubreobjetos
- Espátula de aluminio
- Etiquetas
- Gradillas metálicas para 40 tubos
- Lápiz graso
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Mechero Bunsen
- Papel de estraza
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Pipetas graduadas de 0.2, 1.0, 5.0 y 10.0 ml.
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos
- Probeta de 50 y 250 ml.
- Soporte universal

- Termómetro
- Tubos de ensaye de 12 x 75 y 13 x 100 mm.
- Vasos de precipitados de 50 y 250 ml.

EQUIPO

- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufa
- Incubadora de 28 °C y 37 °C
- Refrigerador
- Microscopio Óptico

REACTIVOS

- Acido clorhídrico concentrado (HCl)
- Agua destilada (H₂O)
- Albúmina bovina al 22%
- Alcohol etílico (C₂H₅OH)
- Azul de lactofenol
- Cloramfenicol
- Cloruro de fenil tetrazolium (TTC)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Fosfato de potasio (K₂PO₄)

- Fosfato de sodio (Na_2PO_4)
- Galactosa
- Glucosa
- Hidróxido de potasio al 20% (KOH)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Lactosa
- Leche pasteurizada
- Maltosa
- Peptona
- Púrpura de bromocresol
- Sacarosa
- Solución salina
- Suero humano
- Sulfato de amonio (NH_4SO_4)
- Tween 80

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar bacteriológico
- Agar de micosel
- Agar de Sabouraud
- Agar de corn meal (harina de maíz)
- Caldo de trypticase soya
- Infusion de cerebro corazón

METODOLÓGIA

Se procedió a la tipificación de 200 cepas obtenidas de pacientes de la consulta externa de los diversos servicios del Hospital General de México S.S., así como de muestras provenientes de necropsias de pacientes fallecidos debido a alguna enfermedad hematológica, que presentaban infecciones por Candida sp, utilizando los métodos de rutina y algunas variantes de éstos que se detallan a continuación:

1. RESISTENCIA AL ACTIDIONE (Cicloheximida).

Se sembraron las cepas en medio micosel (agar Sabouraud con antibiótico) y se incubaron durante 48 horas a 28 °C para observar si se presentaba crecimiento que indicara la resistencia al actidione.

2. FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS.

- a) En suero humano con valores normales de azúcares, proteínas y lípidos (0.5 ml.).
- b) En sulfato de amonio 0.5% - glucosa 1% - trazas de fosfatos.
- c) En albúmina bovina, con las siguientes variantes :
 - 1 gota de albúmina en 2 ml. de agua destilada

- 1 gota de albúmina en 2 ml. de agua destilada con glucosa al 1%
 - Albúmina al 1%
 - Albúmina al 1% con glucosa al 1%
 - Albúmina al 1% con glucosa al 1% y trazas de fosfatos
 - Albúmina al 10% con glucosa al 2%
 - Albúmina al 10% con glucosa al 5%
 - Albúmina al 10% con glucosa al 10%
- d) En glucosa a diferentes concentraciones :
- Glucosa al 10%
 - Glucosa al 5%
 - Glucosa al 2%
 - Glucosa al 1%
 - Glucosa al 0.5%
 - Glucosa al 0.25%
 - Glucosa al 0.1%
 - Glucosa al 0.05%
- e) Caldo de trypticase soya (0.5 ml.).
- f) Infusión de cerebro corazón (0.5 ml.).

La prueba se realizó sembrando una asada de cada cepa en los diferentes medios. Se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente se homogeneizó el medio y se colocó

una gota del mismo entre porta y cubreobjetos para su observación al microscopio, y verificar así la formación de tubos germinativos. Las cepas que no presentaban dichas estructuras, se revisaron a las 3.5 horas para confirmarlas como negativas y desecharlas.

En el caso del medio de sulfato de amonio, se corrieron testigos a la par de la prueba para comprobar su eficacia. Los testigos utilizados fueron los siguientes :

- sulfato de amonio al 5%
- glucosa al 1%
- trazas de fosfatos
- agua destilada

3. FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS.

a) En corn meal - Tween 80 agar.

Se preparó el medio comercial de corn meal-agar (harina de maíz), agregando el Tween 80 al 1% y glucosa al 1%. Después de esterilizar y enfriar el medio, se vertió en cajas Petri. Ya solidificado el medio se procedió a la siembra de cada cepa en forma de estria, misma que se atravesó con un corte del bisturi sobre el medio con el fin de aumentar su contacto con el oxígeno. Se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente, luego de las cuales se observó al microscopio directamente colocando la caja sobre la

platina. Se buscaron pseudohifas y clamidoconidios (terminales o intercalados) identificándolos debido a su mayor tamaño y a su doble membrana refringente.

b) Leche 1% - agar 0.5%.

Se preparó un medio utilizando leche al 1% - agar al 0.5% de acuerdo a la técnica de Feo (25), con el fin de obtener un medio semilíquido. Se sembró una asada de cada cepa, agitando el medio. Se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente y se hizo una observación en fresco al microscopio para buscar los clamidoconidios.

4. ZIMOGRAMA.

Se prepararon los tubos utilizando un medio base el cual se le agregaron los diferentes carbohidratos a probar, a una concentración de 2%, así como el indicador. Cada tubo contenía una campana de fermentación con el fin de atrapar los gases producidos. Los carbohidratos empleados fueron: glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y lactosa. Se sembró cada serie de carbohidratos con las diferentes cepas, esterilizando el asa antes de cada siembra, para evitar el acarreo de un carbohidrato a otro. Se incubaron durante 8 días a temperatura ambiente, y se observó tanto el viraje del indicador como la formación de gases dentro de la campana de fermentación.

5. REDUCCION DE SALES DE TETRAZOLIO (TTC).

El medio se preparó en el laboratorio siguiendo la fórmula de Pagano-Levin que consiste en :

| | |
|------------------------|----------|
| - Peptona | 10 gr. |
| - Extracto de levadura | 1 gr. |
| - Glucosa | 40 gr. |
| - Agar bacteriológico | 15 gr. |
| - Agua destilada | 1000 ml. |
| - TTC | 100 mg. |
| - Cloramfenicol | 500 mg. |

El medio y el TTC (Cloruro de trifeníl tetrazolium) fueron esterilizados por separado, posteriormente se mezclaron y se repartieron en cajas Petri. Las cepas fueron sembradas en el medio sólido en forma de estrias, y se incubaron durante 48 a 72 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, se observaron las diferentes coloraciones adquiridas por las cepas, debidas a las distintas capacidades de reducción de las mismas. Una coloración púrpura se interpreta como ++, rosa como + y blanca como -.

6. RESISTENCIA A DIFERENTES pH's.

Se inocularon las cepas en tubos que contenían 0.5 ml. de solución salina a diferentes pH's variando el tiempo de incubación (32). Las técnicas empleadas fueron :

- Solución salina pH 2.5 durante 1 hora.
- Solución salina pH 1.0 durante 1 hora.
- Solución salina pH 1.0 durante 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se tomó una asada de cada medio y se sembró en cajas Petri con agar Sabouraud, las cuales se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas.

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados obtenidos mediante el presente estudio se reportan de la siguiente manera:

I. Marcha Rutinaria de Tipificación (Tabla I).

Incluye los resultados de :

- Resistencia al acidione.
- Formación de tubos germinativos en suero humano.
- Formación de clamidoconidios en agararina de maíz (corn meal agar) - Tween 80 al 1 %.
- Zimograma (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa y lactosa).
- Reducción de sales de tetracolio (TTC). Aunque esta prueba no es rutinaria, la utilizamos como apoyo para la tipificación.

La tipificación se realizó de acuerdo a la Tabla II anexa, según apuntes de Micología Médica del Instituto Pasteur (1987).

TABLA 1
 HORAS Y TIEMPO DE VERIFICACION

| No. Fiestas y actividades | Formación de nucleos directivos en su número | No. horas de clasificación y comparación | Ejercicios | | | | TTP | Ejercicios |
|------------------------------|--|--|------------|-----|-----|-----|------------------|------------|
| | | | 400 | 450 | 500 | 550 | | |
| 1 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 2 | + | + | + | + | + | - | C. Cereales | |
| 3 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 4 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 5 | + | + | + | + | + | - | C. Frutas | |
| 6 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 7 | + | + | + | + | + | - | C. Tropicales | |
| 8 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 9 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 10 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 11 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 12 | + | + | + | + | + | - | C. Frutas | |
| 13 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 14 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 15 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 16 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 17 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 18 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 19 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 20 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 21 | + | + | + | + | + | - | C. Tropicales | |
| 22 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 23 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 24 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 25 | + | + | + | + | + | - | C. Frutas | |
| 26 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 27 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 28 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 29 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 30 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 31 | + | + | + | + | + | - | C. Frutas | |
| 32 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 33 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 34 | + | + | + | + | + | - | C. Asteriscaceae | |
| 35 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 36 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 37 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 38 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 39 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |
| 40 | + | + | + | + | + | - | C. Aliscans | |

TABLE I
MARCHA FUTURARIA DE TIPIFICACION
(CONTINUACION)

| No. | Asistencia al accionero | Formacion de tubos germinativos en el tubo numero | Formacion de cianidiosporas en corn. A&B-100R | Indicador | | | | | EPC* | Especie |
|-----|----------------------------|---|---|-----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------------|
| | | | | Clu | Mal | Sec | Sal | Isc | | |
| 41 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 42 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 43 | - | + | + | + | + | + | + | - | - | C. tropicalis |
| 44 | - | + | - | - | + | + | + | - | ** | C. tropicalis |
| 45 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 46 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 47 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 48 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 49 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. albicans |
| 51 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. parapsilosis |
| 52 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 53 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 54 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 55 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 56 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 57 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 58 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 59 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 60 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 61 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 62 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 63 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 64 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 65 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 66 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 67 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 68 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | C. stellatoidea |
| 69 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 70 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 71 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 72 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 73 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 74 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 75 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 76 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 77 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | C. parapsilosis |
| 78 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. stellatoidea |
| 79 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | C. albicans |
| 80 | - | + | + | + | + | + | + | - | + | C. parapsilosis |

TABLE 1
MAPA FUTURIA DE TIFICACION
CONTRACCION

| No. | Asistencia al estudio | Formacion de tubos de tificacion en el tubo de tificacion | Formacion de clastocitos en corn real-pear | Diagnostico | | | | | TEC* | especie |
|-----|--------------------------|---|--|-------------|-----|-----|-----|-----|------|-----------------|
| | | | | du | rel | vac | cal | lec | | |
| 81 | - | + | - | + | + | + | - | - | ** | C. tropicalis |
| 82 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. stellatoidea |
| 83 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. stellatoidea |
| 84 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. stellatoidea |
| 85 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. stellatoidea |
| 86 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. stellatoidea |
| 87 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. albicans |
| 88 | - | - | - | + | + | - | - | - | + | C. truxes |
| 89 | + | + | + | + | + | - | - | - | ** | C. tropicalis |
| 90 | + | + | + | + | + | - | - | - | + | C. stellatoidea |
| 91 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 92 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 93 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 94 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 95 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 96 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 97 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 98 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 99 | - | - | - | + | + | + | - | - | ** | C. tropicalis |
| 100 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 101 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 102 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | C. parvifolia |
| 103 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | C. albicans |
| 104 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | C. albicans |
| 105 | - | - | - | + | + | - | - | - | + | C. truxes |
| 106 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | C. albicans |
| 107 | + | + | + | + | + | + | - | - | ** | C. tropicalis |
| 108 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 109 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 110 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 111 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 112 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | C. truxes |
| 113 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 114 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 115 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 116 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 117 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 118 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 119 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |
| 120 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | C. albicans |

TABLA 1
 NÚMERO FUENTE DE TIFICACIÓN
 (CONTINUACIÓN)

| No. | Resistencia al ácido | Formación de todos derivados en agua hirviendo | Formación de cristaloscópicas en con. real-agua | Isocoras | | | | TTC | Especie |
|-----|-------------------------|--|---|----------|----|-----|-----|-----|-----------------|
| | | | | Cl | ml | sec | ca. | | |
| 121 | * | - | * | * | * | * | * | ** | C. tropicalis |
| 122 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 123 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 124 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 125 | * | * | * | * | * | * | * | * | C. trusii |
| 126 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 127 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 128 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 129 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 130 | * | * | * | * | * | * | * | * | C. albicans |
| 131 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. trusii |
| 132 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 133 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 134 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 135 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. stellatoidea |
| 136 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 137 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 138 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 139 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 140 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 141 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 142 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 143 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 144 | * | * | * | * | * | * | * | ** | C. tropicalis |
| 145 | * | * | * | * | * | * | * | ** | C. tropicalis |
| 146 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 147 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 148 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 149 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 150 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 151 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 152 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 153 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 154 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 155 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 156 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 157 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 158 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. albicans |
| 159 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. stellatoidea |
| 160 | * | * | * | * | * | * | * | - | C. stellatoidea |

TABLE 1
 HSP70-FLUORENOL DE TYPIFICATION
 (CONTINUED)

| No. | Resistencia al acetone | Formacion de cuerpos derivativos en suero humano | Formacion de cristaloides en suero humano | Cuerpo 70 | | | | | ETC* | Especie |
|-----|---------------------------|--|---|-----------|-----|-----|-----|-----|------|------------------|
| | | | | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 | | |
| 161 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 162 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 163 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 164 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 165 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 166 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 167 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 168 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 169 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. parvulus |
| 170 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. parvulus |
| 171 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. parvulus |
| 172 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. parvulus |
| 173 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 174 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 175 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 176 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 177 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. parvulus |
| 178 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 179 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 180 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. parvulus |
| 181 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. tropicalis |
| 182 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 183 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 184 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 185 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 186 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 187 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 188 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 189 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. tropicalis |
| 190 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. streptococcus |
| 191 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 192 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 193 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 194 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 195 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 196 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. tropicalis |
| 197 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 198 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |
| 199 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | C. tropicalis |
| 200 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | C. albidus |

* Esta prueba sirve de apoyo para la tipificación, aunque no es definitiva.

TABLA II

 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DEL GÉNERO Candida
 (Según acuntes de micología Médica del Instituto Pasteur, 1967)

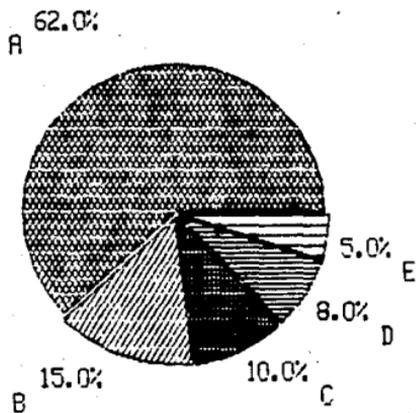
| | Candida albicans | Candida tropicalis | Candida krusei | Candida guilliermondii | Candida lusitanae | Candida kefyr | Candida lusitanae | Candida lusitanae |
|------------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------------|-------------------|---------------|-------------------|-------------------|
| MORFOLOGÍA | | | | | | | | |
| Freveciclosis | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cistozoosporas | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Filamentación en suero 2% C | + | + | + | - | - | - | - | - |
| ZIMOGRAFÍA | | | | | | | | |
| Glucosa | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Maltosa | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Sacarosa | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Galactosa | + | - | + | + | + | + | + | + |
| Lactosa | - | - | - | - | - | + | + | - |
| OTRAS CARACTERÍSTICAS | | | | | | | | |
| Producción retráctilo | - | + | ** | + | + | - | + | - |
| Sensibilidad al acetato | + | + | - | - | - | + | + | + |

II. Gráfica en porcentajes de las especies de Candida aisladas (anexa).

| | |
|--------------------------------|--------|
| A. <u>Candida albicans</u> | 62.0 % |
| B. <u>Candida stellatoidea</u> | 15.0 % |
| C. <u>Candida parapsilosis</u> | 10.0 % |
| D. <u>Candida tropicalis</u> | 8.0 % |
| E. <u>Candida krusei</u> | 5.0 % |

Debe tomarse en cuenta que de estos resultados el 36 % procede de pacientes afectados por alguna enfermedad hematológica y que el resto corresponde a personas que llegaban a consulta con una candidosis clínicamente confirmada.

GRAFICA EN PORCENTAJES DE LAS ESPECIES
DE Candida AISLADAS

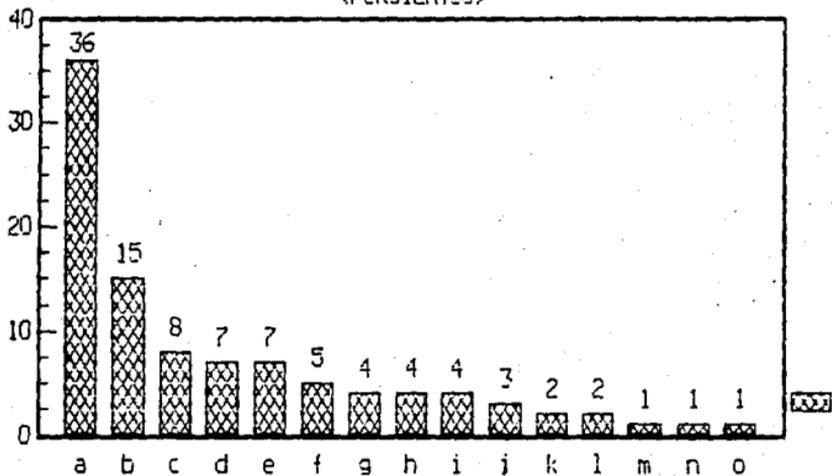


III. Topografía Clínica (Gráfica anexa).

| | |
|----------------------|--------|
| a. Boca | 36.0 % |
| b. Estómago * | 15.0 % |
| c. Esófago * | 6.0 % |
| d. Vagina - Riñón ** | 7.0 % |
| e. Heces | 7.0 % |
| f. Riñón * | 5.0 % |
| g. Pulmón * | 4.0 % |
| h. Expectoración | 4.0 % |
| i. Piel | 4.0 % |
| j. Sangre | 3.0 % |
| k. Oído | 2.0 % |
| l. Hígado * | 2.0 % |
| m. Uña | 1.0 % |
| n. Faringe * | 1.0 % |
| o. Bazo * | 1.0 % |

* Muestras tomadas de pacientes post-mortem.

** Muestras de orina de pacientes de sexo femenino, consideradas como infecciones vaginales y/o renales.

TOPOGRAFIA CLINICA
(PORCIENTOS)

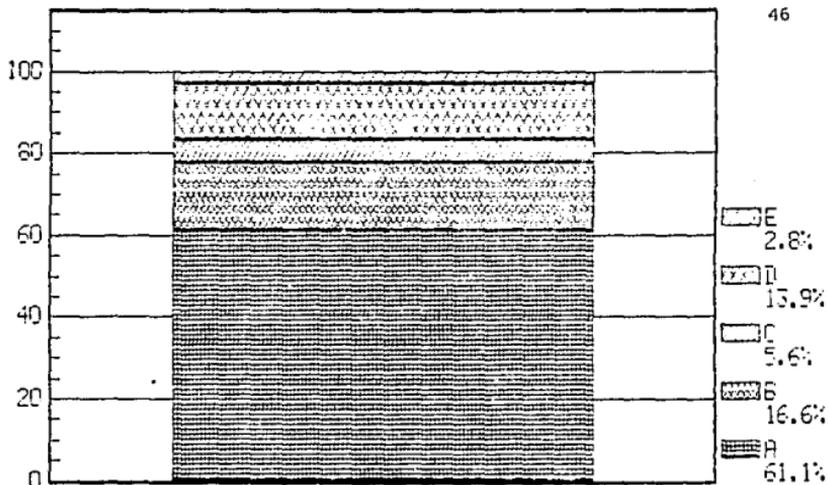
IV. Frecuencia de las especies de Candida de acuerdo a la topografía clínica.

- A. Candida albicans
- B. Candida stellatoidea
- C. Candida parapsilosis
- D. Candida tropicalis
- E. Candida krusei

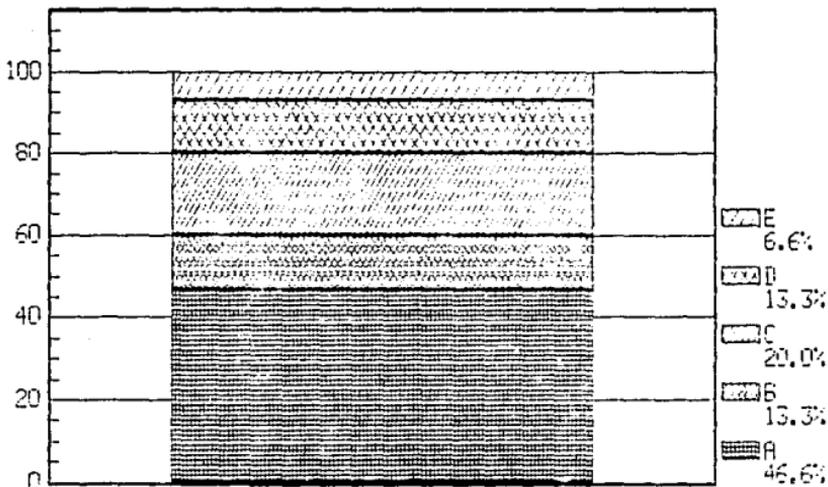
Nota : Los incisos A, B, C, D y E son los que se utilizan en las gráficas siguientes.

FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE Candida
EN BOCA

46

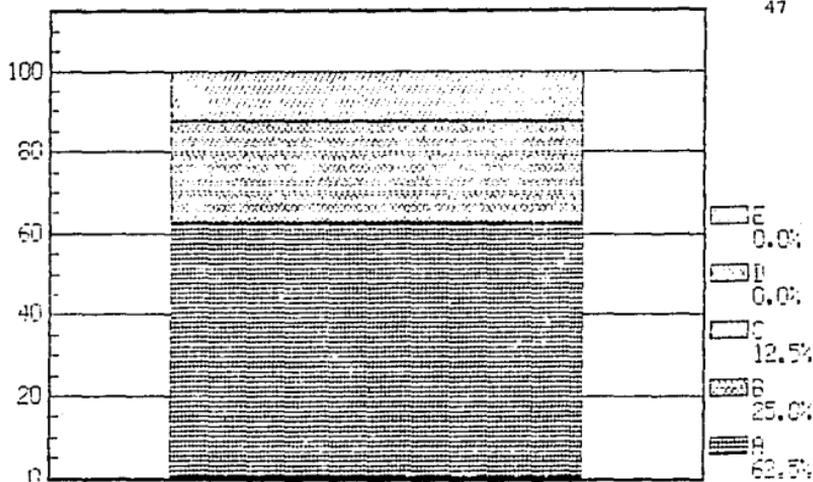


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE Candida
EN ESTOMAGO

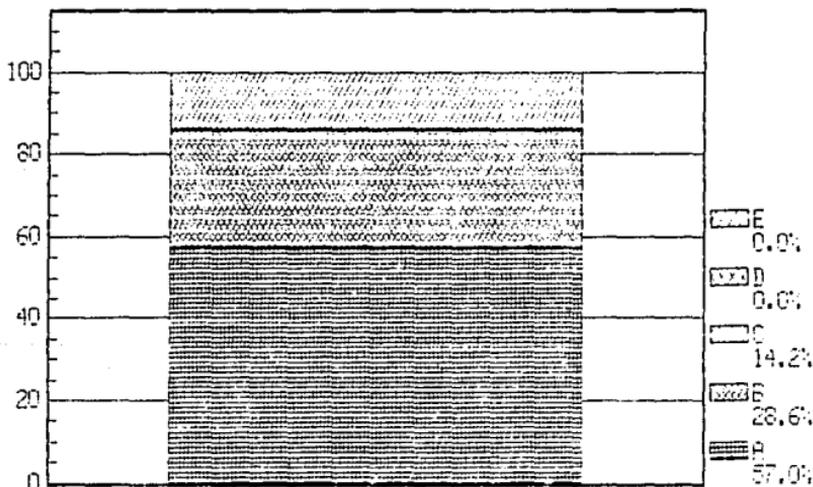


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN ESOFAGO

47

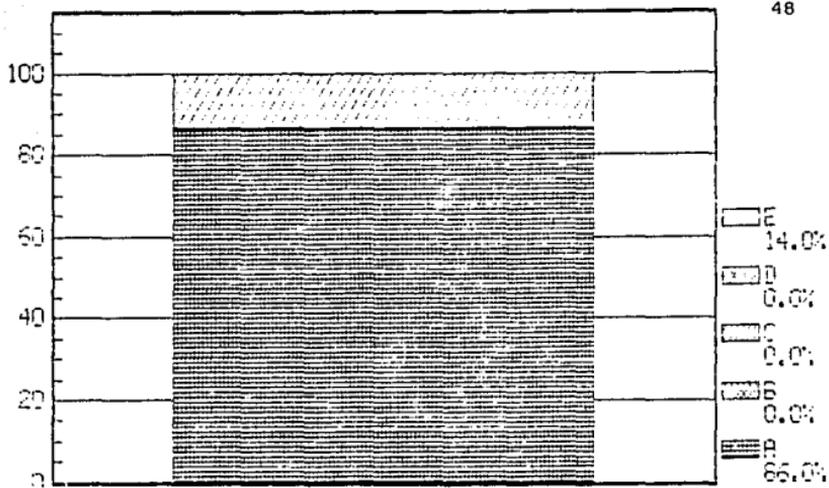


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN VAGINA-RIÑON

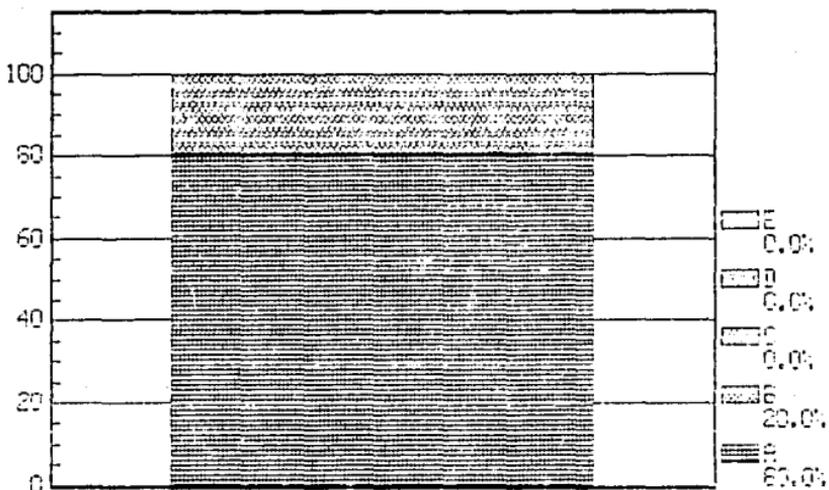


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN HECES

48

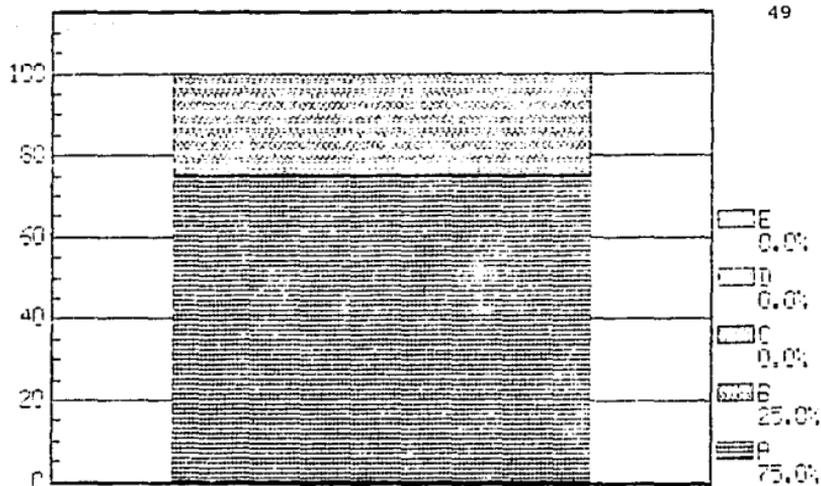


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN RINON

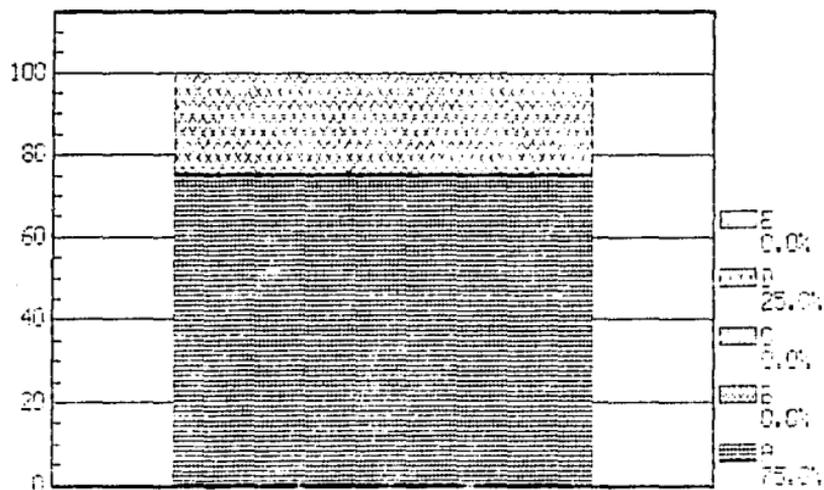


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN PULMÓN

49

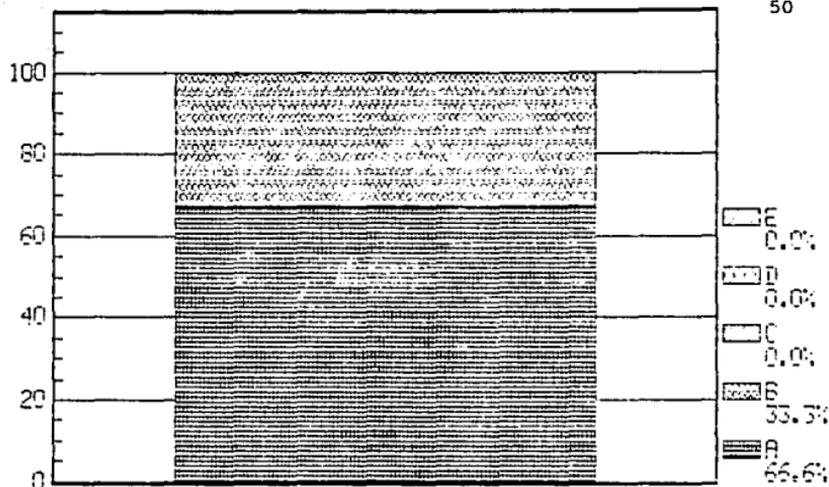


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN EXPECTORACION

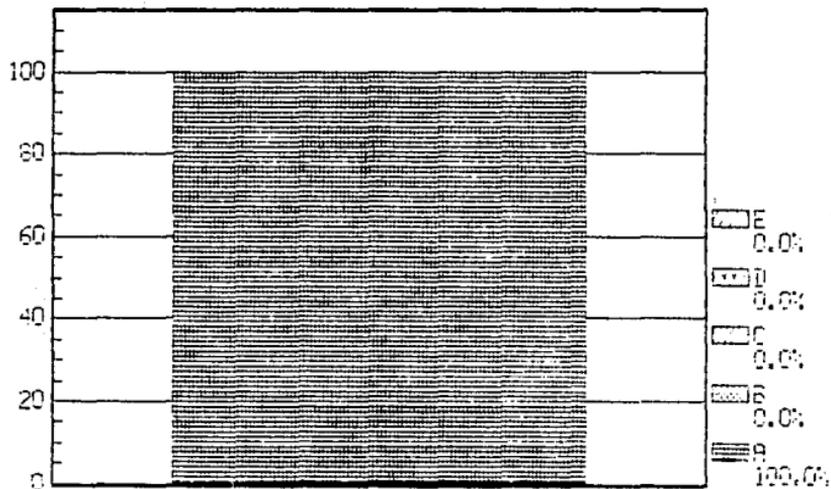


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN SANGRE

50

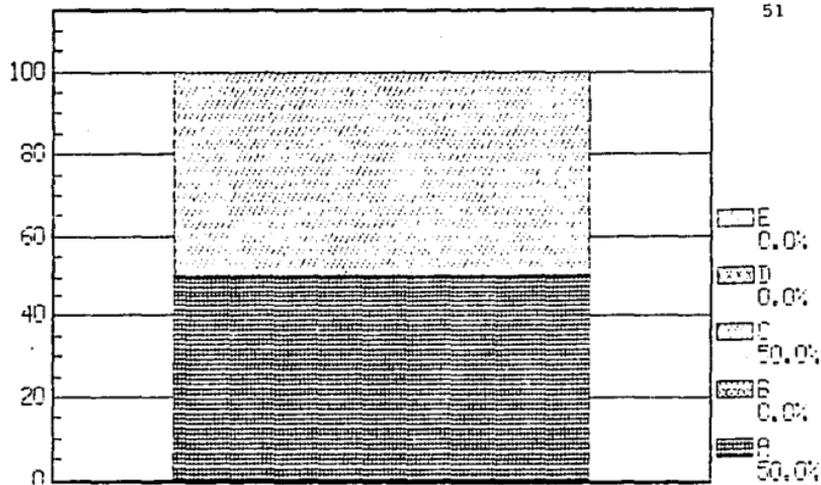


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN PIEL

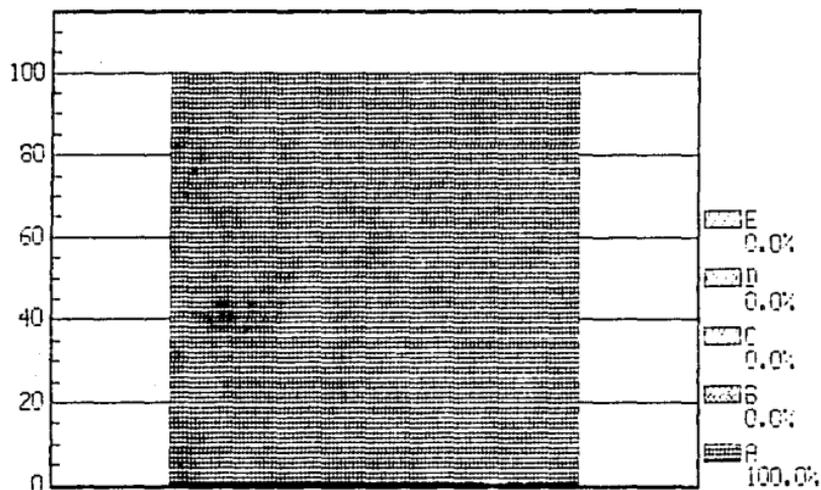


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN HIGADO

51

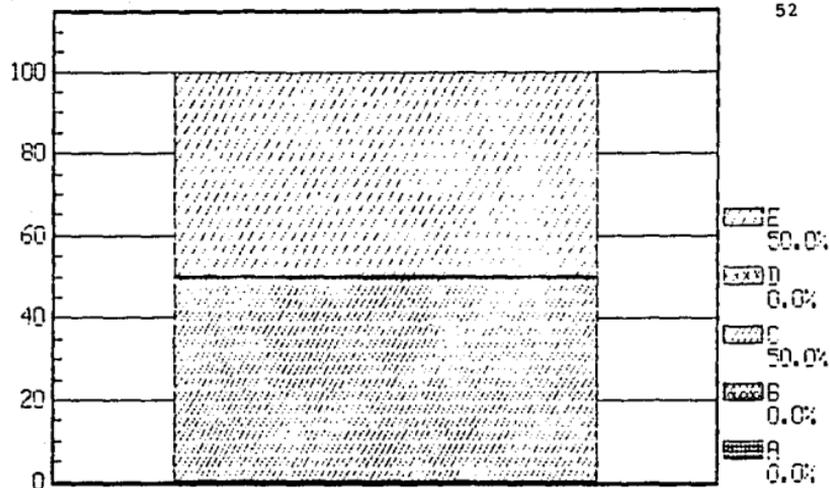


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN FARINGE

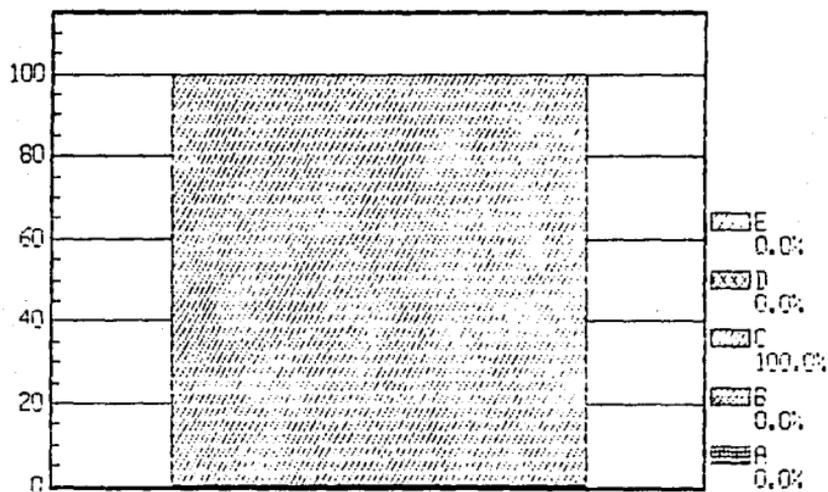


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN OIDO

52

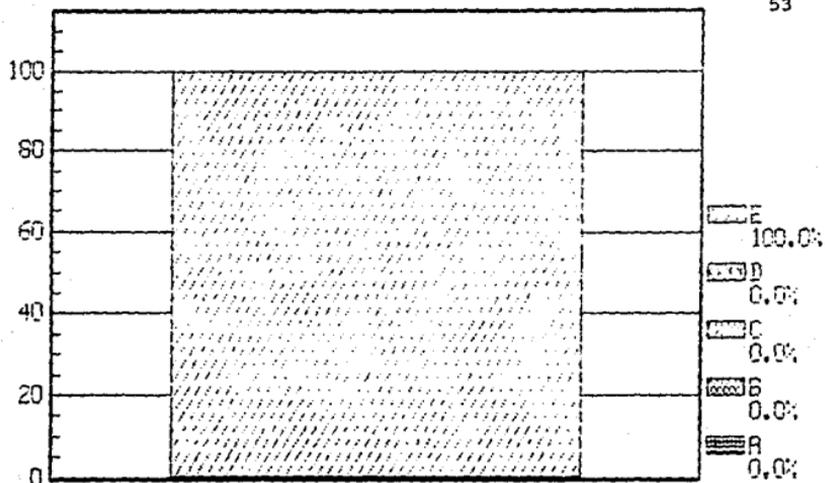


FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN UÑA



FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN BAZO

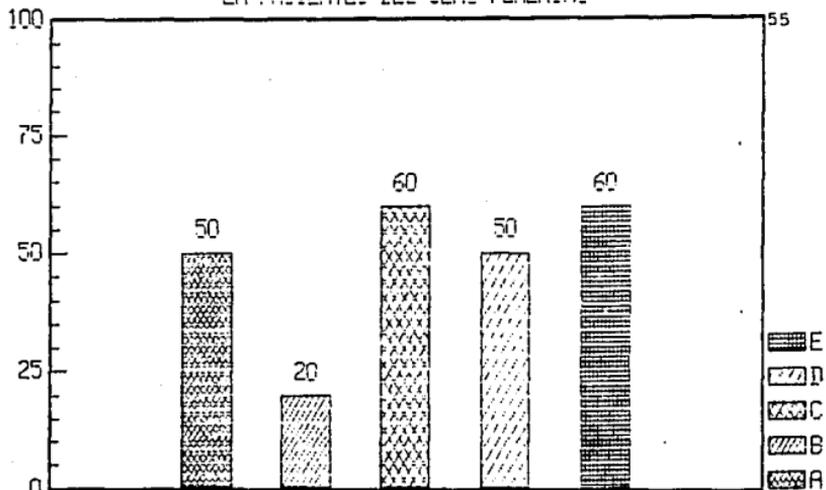
53



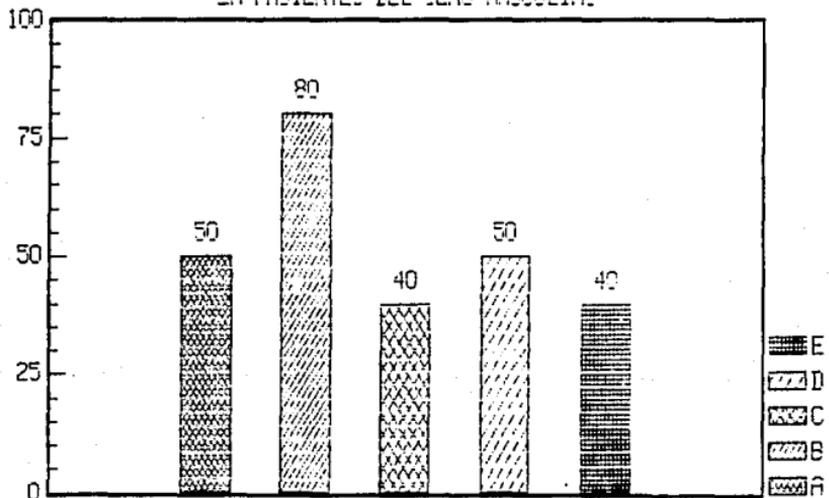
V. Frecuencia de las especies de Candida de acuerdo al sexo.

| Especie | Sexo Femenino | Sexo Masculino |
|--------------------------------|---------------|----------------|
| A. <u>Candida albicans</u> | 50 % | 50 % |
| B. <u>Candida stellatoidea</u> | 20 % | 80 % |
| C. <u>Candida parapsilosis</u> | 60 % | 40 % |
| D. <u>Candida tropicalis</u> | 50 % | 50 % |
| E. <u>Candida krusei</u> | 60 % | 40 % |

FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN PACIENTES DEL SEXO FEMENINO



FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida*
EN PACIENTES DEL SEXO MASCULINO



VI. Metodología en estudio.

En las gráficas se muestra el porcentaje de Candida albicans que dió positiva cada prueba en relación con las pruebas rutinarias; los resultados obtenidos para las demás especies se reportan a continuación:

1. Formación de tubos germinativos.

- En sulfato de amonio 0.5% - glucosa 1% - trazas de fosfatos.

| Especie | Resultados positivos |
|-----------------------------|----------------------|
| <u>Candida albicans</u> | 83.8% |
| <u>Candida stellatoidea</u> | 66.7% |
| <u>Candida parapsilosis</u> | 40.0% |
| <u>Candida tropicalis</u> | 75.0% |
| <u>Candida krusei</u> | 20.0% |

- En albúmina bovina utilizando las variantes antes mencionadas, no se observaron resultados positivos en ningún caso.

- En glucosa a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos fueron los mismos para todas las concentraciones utilizadas.

| Especie | Resultados positivos |
|-----------------------------|----------------------|
| <u>Candida albicans</u> | 100.0% |
| <u>Candida stellatoidea</u> | 93.3% |
| <u>Candida parapsilosis</u> | 10.0% |
| <u>Candida tropicalis</u> | 12.5% |
| <u>Candida krusei</u> | 0.0% |

- Caldo de trypticase soya.

| Especie | Resultados positivos |
|-----------------------------|----------------------|
| <u>Candida albicans</u> | 51.8% |
| <u>Candida stellatoidea</u> | 60.0% |
| <u>Candida parapsilosis</u> | 0.0% |
| <u>Candida tropicalis</u> | 12.5% |
| <u>Candida krusei</u> | 0.0% |

- Infusión de cerebro corazón.

| Especie | Resultados positivos |
|-----------------------------|----------------------|
| <u>Candida albicans</u> | 75.8% |
| <u>Candida stellatoidea</u> | 60.0% |
| <u>Candida parapsilosis</u> | 10.0% |
| <u>Candida tropicalis</u> | 50.0% |
| <u>Candida krusei</u> | 0.0% |

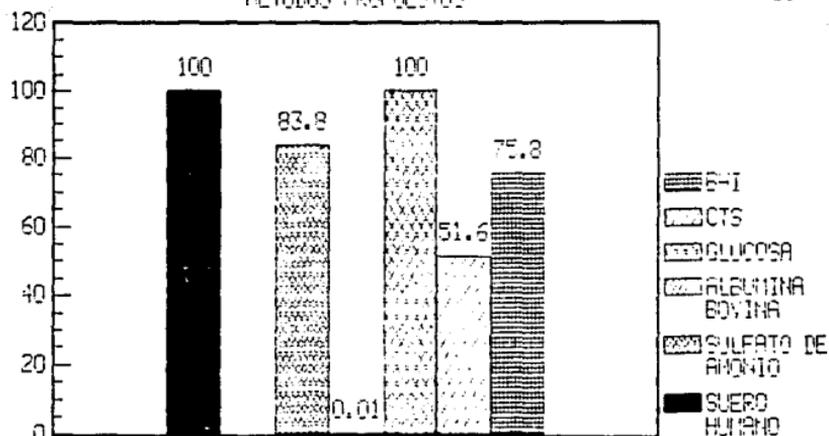
2. Formación de clamidooonidios.

- En leche 1% - agar 0.5%

| Especie | Resultados positivos |
|-----------------------------|----------------------|
| <u>Candida albicans</u> | 93.5% |
| <u>Candida stellatoidea</u> | 46.7% |
| <u>Candida parapsilosis</u> | 0.0% |
| <u>Candida tropicalis</u> | 50.0% |
| <u>Candida krusei</u> | 40.0% |

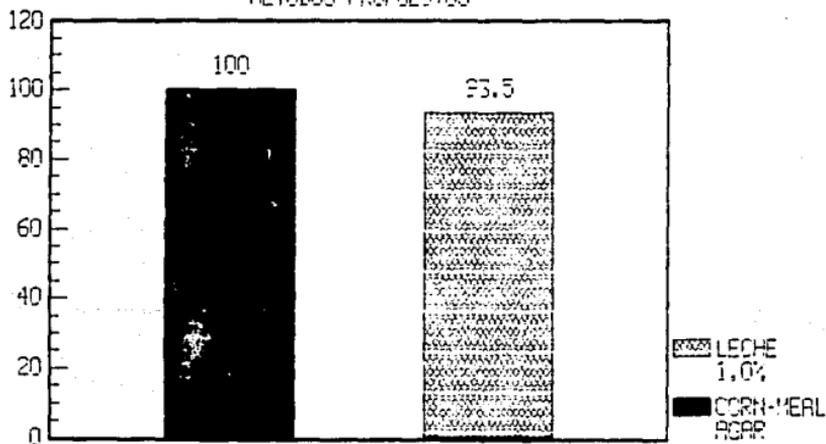
TUBOS GERMINATIVOS
COMPARACION DE LOS DIFERENTES
METODOS PROPUESTOS

59



RESULTADOS OBTENIDOS PARA C. albicans

CLAMIDOCOVIDIOS
COMPARACION DE LOS DIFERENTES
METODOS PROPUESTOS



RESULTADOS OBTENIDOS PARA C. albicans

3. Resistencia a diferentes pH's.

- Solución salina pH 2.5 durante 1 hora. Ninguna de las cepas fue inhibida.
- Solución salina pH 1.0 durante 1 hora.

| Especie | Resistencia |
|-----------------------------|-------------|
| <u>Candida albicans</u> | 33.9% |
| <u>Candida stellatoidea</u> | 6.7% |
| <u>Candida parapsilosis</u> | 20.0% |
| <u>Candida tropicalis</u> | 62.5% |
| <u>Candida krusei</u> | 60.0% |

- Solución salina pH 1.0 durante 48 horas. Todas las cepas fueron inhibidas.

ESTADISTICA :

El modelo utilizado en la investigación es de tipo descriptivo, por lo tanto bajo las reglas epidemiológicas, no se puede realizar un método estadístico como el de χ^2 ; en base a esto sólo se manejaron porcentajes, que explican los resultados obtenidos.

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

COMPARACION DE LA MARCHA RUTINARIA DE TIPIFICACION CON
RESPECTO A LA METODOLOGIA PROPUESTA.

MEDIOS DE CULTIVO DE PRIMOISLAMIENTO.

En este estudio comprobamos mediante la prueba de resistencia al actidione, que los mejores medios para el primoaislamiento son el Sabouraud y el Biggy, ya que en el micosel tuvimos un porcentaje de inhibición del 10% correspondiente a las especies C. tropicalis, C. krusei y C. parapsilosis. Otros medios que pueden utilizarse son el gelosa sangre y el BHI, pero tienen la desventaja de que al ser medios muy ricos, su manejo debe ser mas cuidadoso ya que favorecen la contaminación. Otra opción sería emplear Sabouraud adicionado de cloramfenicol.

FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS.

De acuerdo a los resultados obtenidos, reafirmamos que el mejor medio para la inducción de tubos germinativos es el suero humano con valores normales. Las ventajas que presenta son que se pueden utilizar paquetes de plasma, inclusive caducos, suero congelado, inactivado, hemolizado, etc. (12). El problema de este medio es que no

siempre se tiene la certeza de que realmente sus valores sean normales, ya que se realizan mezclas de diversos sueros.

En la bibliografía consultada se menciona que las fuentes de nitrógeno y de carbono son indispensables para la formación de tubos germinativos (22). Debido a esto, probamos utilizar un medio compuesto por sulfato de amonio, glucosa y trazas de fosfatos. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que solamente el 83.8 % de las especies de C. albicans dieron positiva la prueba y además, C. krusei y C. parapsilosis que están reportadas como negativas en el 100 % de los casos, presentaron filamentos en un 20 % y 40 % respectivamente. Ya que el medio que contenía una fuente de nitrógeno y una de carbono no dió los resultados esperados, decidimos enfocar nuestros estudios a las sustancias presentes en mayor proporción en el suero. Utilizamos soluciones de albúmina, glucosa y una combinación de ambas. En los medios en los cuales estaba presente la albúmina, observamos una inhibición total de la filamentos; en cambio, en los medios que contenían solamente glucosa a diferentes concentraciones, los resultados obtenidos fueron idénticos a los observados en el suero humano con valores normales; por lo tanto la limitante

para la formación de tubos germinativos es la fuente de carbono.

Siguiendo la recomendación de Joshi y cols. (13), probamos el trypticase soya caldo en el que reportaron haber obtenido resultados similares a los obtenidos en suero humano. Nuestras observaciones demostraron que este medio sí es específico para C. albicans, C. stellatoidea y C. tropicalis, sin embargo tuvimos falsos negativos en un alto porcentaje.

Pensamos en utilizar otro medio tan rico como el anterior pero que tuviera glucosa en una mayor concentración, y decidimos probar con el medio de intrusión cerebro corazón (BHI). Este medio superó al anterior en el aspecto de que no dio tantos falsos negativos, pero también se observaron resultados falsos positivos.

FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS.

Sin duda alguna, el mejor medio para la formación de clamidoconidios es el agar harina de maíz (corn meal) - Tween 80 al 1 %. Las desventajas que presenta esta prueba son el tener que utilizar cajas Petri, lo que incrementa el costo ya que se desperdicia gran cantidad de medio, además de que el material ocupa demasiado espacio, lo que dificulta el manejo.

Feo '25) recomienda el uso de un medio semilíquido compuesto de leche al 1 % y agar al 0.5 % que se reparte en tubos de ensaye, lo que facilita su manejo y disminuye la cantidad de medio empleado. El problema que encontramos al utilizar este medio fue que el inóculo no se distribuye homogéneamente en el medio, por lo que al momento de tomar la muestra existe el riesgo de no llevar en ella ningún clamidoconidio aunque si los hubiera. Esta prueba requiere de mucho tiempo ya que se necesita revisar todos los campos de la preparación, lo que no ocurre en el medio harina de maíz preparado en caja Petri, en el cual es posible, detectando la filamentación en el medio, ubicar la localización de los clamidoconidios para su observación al microscopio. Aún así, los resultados obtenidos fueron buenos ya que C. albicans presentó clamidoconidios en un 93.5 %, pero se observaron falsos positivos en el caso de C. krusei.

REDUCCION DE SALES DE TETRAZOLIO (TTC)

Esta prueba es un excelente complemento para la tipificación del género Candida. Supera al zimograma, ya que requiere una menor cantidad de medio, menor tiempo de preparación y el riesgo de contaminación es mínimo. Debido a esto basta con determinar tubos germinativos,

clamidoconidios y reduccion de sales de tetracolio (TTC), para identificar una especie dada.

RESISTENCIA A DIFERENTES pH's.

Trujillo A. (32), sugirió que solamente C. albicans sobrevive a un pH de 2.5. Al llevar a cabo esta tecnica obtuvimos resultados que no siguen ningún patron lógico y que por consiguiente no llevan a ninguna conclusion.

CORRELACION DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS AISLADOS DE ACUERDO A
LA TOPOGRAFIA CLINICA Y AL SEXO.

En este estudio observamos un fuerte predominio de C. albicans sobre las demás especies (62.0 %), lo cual coincide con los datos reportados en la bibliografía consultada (3). Aunque algunos autores reportan hasta un 85 %, esto puede deberse tanto a que el número de muestras manejadas sea menor al utilizado en el presente trabajo (al aumentar el número de muestras la proporción de C. albicans disminuye), como a una tipificación equivocada.

La topografía clínica estudiada demostró la preferencia de este microorganismo por las mucosas, principalmente el tracto gastrointestinal que abarca el 71 % del total de los órganos afectados.

Las muestras provenientes de pacientes post-mortem demuestran que Candida sp puede afectar a niveles profundos, incluso estómago, cuando se trata de enfermedades hematológicas (leucemias y linfomas) que generan inmunodepresión. Muchos autores señalan la imposibilidad de que Candida sp parasite estómago debido al pH tan ácido que presenta, pero este estudio demuestra que esto no depende del pH sino quizás del sistema inmune.

Con respecto al sexo, los datos obtenidos muestran que todas las especies aisladas de Candida afectan tanto a hombres como a mujeres en igual proporción.

CONCLUSIONES

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- Los mejores medios de primoaislamiento para el género Candida, son el Sabouraud y el Biggy.

- El mejor medio para la inducción de tubos germinativos es el suero humano con valores normales; un medio de elección que ofrece resultados óptimos es una solución de glucosa al 0.05 % que resulta más barato y su composición es conocida.

- Para la formación de clamidoconidios el medio que resulta más práctico y confiable, es el de harina de maíz (corn meal agar), adicionado de Tween 80 al 1 %.

- La prueba de reducción de sales de tetrazolio (TTC), es un excelente complemento para la tipificación del género Candida, que podría utilizarse en un laboratorio de rutina en lugar del zimograma.

- La prueba de resistencia a diferentes pH's no aportó ningún dato que facilite la tipificación.

- Para una tipificación práctica y confiable del género Candida, basta con observar la formación de tubos germinativos en una solución de glucosa al 0.05 %, la formación de clamidoconidios en el medio harina de maíz (corn meal agar) - Tween 80 al 1%, y la reducción de sales de tetrazolio (TTC).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bonifaz, A. *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez-Cervantes. México, D. F. 1990.
2. Conant, N. Smith, D. Baker, R. Callaway, J. *Micología*. Ed. Interamericana. México, D. F. 1972.
3. Zapater, R. *Micología Médica*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 1981.
4. González-Uchoa, A. Orozco, C. Bravo-Echeverría, M. A. El papel de las levaduras del género Candida como patógeno único, patógeno asociado y saprófito. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Mexico*. 1964, 24: 89-97.
5. Ryley, J. F. Pathogenicity of Candida albicans with particular reference to the vagina. *J. Med. Vet. Micol.* 1966, 24: 5-22.
6. Murillo de Linares, L. Marín, C. Frequency of yeasts of the genus Candida in humans as pathogens and as part of normal flora. *Proc. Four. Int. Conf. on mycoses. In : the white and black yeasts*. PAHO. Washington, D. C. 1978. pp. 124-133.
7. Bonifaz, A. Comunicación personal.
8. Dolan, C. T. Stried, R. P. Serologic diagnosis of yeasts infections. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973, 59: 49-55.
9. Monson, T. P. Wilkinson, K. P. Msnnose in body fluids as an indicator of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 1981, 14: 557-562.
10. Dolan, C. T. Ihrke, D. M. Further studies of the germ tube test for Candida albicans identification. *Am. J. Clin. Pathol.* 1971, 55: 733-734.
11. Griffin, E. R. The value of germ tube production test in the rapid identification of Candida albicans. *J. Med. Lab. Technol.* 1964, 21: 296-301.
12. Taschdjian, C. L. Burchill, J. J. Kozim, F. J. Rapid identification of Candida albicans by filamentation in serum and serum substitutes. *Am. J. Dis. Child.* 1960, 99: 212-215.

13. Joshi, K. R. Bremner, D. A. Gavin, J. B. Herdson, D. E. Parr, D. N. The formation of germ tubes by Candida albicans in sheep serum and trypticase soya broth. Am. J. Clin. Pathol. 1973, 60: 839-842.
14. Mackenzie, D. W. R. Serum tube identification of Candida albicans. J. Clin. Path. 1962, 15: 563-565.
15. Zaragoza-Hernandez, J. Espinosa-Texis, A. Morales-Carranza, A. Acción de diversos substratos sobre la formación del tubo germinal en el género Candida. Resúmenes del Segundo Congreso Nacional de Micología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1966, p. 17.
16. Land, B. A. MacDonald, W. C. Stjernholm, R. L. Friedman, L. Factors affecting filamentation in Candida albicans: Relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. Infect. Immun. 1975, 11: 1014-1023.
17. Dabrowsa, H. Taxer, S. S., Howard D. H. Germination of Candida albicans induced by proline. Infect. Immun. 1976, 13: 830-835.
18. Lee, K. L. Buckley, H.R., Campbell, C. C. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of Candida albicans. Sabouraudia. 1975, 13: 148-153.
19. Mattia, E. Cassone, A. Short Communication. Inducibility of germ tube formation in Candida albicans at different phases of yeast growth. J. Gen. Microbiol. 1979, 113: 439-442.
20. Shepherd, M. G. Yin, C. Ram, S. F. Sullivan, D. A. Germ tube induction in Candida albicans. Can. J. Microbiol. 1979, 26: 21-25.
21. Holmes, A. R. Shepherd, M. G. Proline-induced germ-tube formation in Candida albicans : Role of proline uptake and nitrogen metabolism. J. Gen. Microbiol. 1987, 133: 3219-3228.
22. Holmes, A. R. Shepherd, M. G. Short Communication. Nutritional factors determine germ tube formation in Candida albicans. J. Med. Vet. Micol. 1988, 26: 127-131.

23. Kelly, J. P. Funigiello, F. Candida albicans : A study of media designed to promote chlamydospore production. J. Lab. & Clin. Med. 1959, 53: 807-809.
24. Pollack, J. D. Benham R. W. The chlamydospores of Candida albicans : Comparison of three media for their induction. J. Lab. & Clin. Med. 1957, 50: 313-317.
25. Fao, M. Candida albicans : Studies on the production of chlamydospores. Proc. Four. Int. Conf. on mycoses. in : the white and black yeasts. PAHO. Washington, D. C. 1978, pp. 235-236.
26. Walker, L. Huppert, M. Corn meal - Tween 80 agar : An improved medium for the identification of Candida albicans. Am. J. Clin. Pathol. 1960, 33: 190-194.
27. Walker, L. Huppert, M. A rapid, reliable technic for the identification of Candida albicans. Am. J. Clin. Pathol. 1959, 31: 551-558.
28. Martin, M. V. Schneidau, J. D. Jr. A simple and reliable assimilation test for the identification of Candida species. Am. J. Clin. Pathol. 1970, 53: 875-879.
29. Widra, A. An improved fermentation method for rapid identification of Candida species. J. Infect. Dis. 1957, 100: 70-73.
30. Mendel, E. B. Haberman, S. Hall, O. K. Isolation of Candida from clinical specimens. Comparative study of Pagano-Levin and Nickerson's culture media. Obstet. Gynec. 1960, 16: 180-184.
31. Kutscher, A. H. Seguin, L. Zegarelli, E. V. Rankow, R. M. Campbell, J. B. Mercadante, J. Pagano-Levin culture medium for differentiation of Candida albicans. American type culture collection studies. I. Antibiot. Chemother. 1959, 9: 649-659.
32. Trujillo, A. Comunicacion personal.