

7
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES MORFOLOGICAS Y FISIOLOGICAS
DE: Candida albicans Y SU INFLUENCIA EN LA
ACTIVIDAD DE CANDIDINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
LAURA ARANA PATLAN



ASESOR: CUDBERTO CONTRERAS PEREZ

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

PRESIDENTE : **CUDBERTO CONTRERAS PEREZ.**
VOCAL : **GUADALUPE VIDAL GAONA.**
SECRETARIO : **JOAQUIN CIFUENTES BLANCO.**
1er. SUPLENTE : **M. ANTONIO HERNANDEZ MUÑOZ.**
2do. SUPLENTE : **MARGARITA H. VILLEGAS RIOS.**
SUSTENTANTE : **LAURA ARANA PATLAN.**

LUGAR DE REALIZACION:
INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS.
(I.N.D.R.E.)

AGRADECIMIENTOS:

**A MIS PADRES
MARIA LUISA Y NICOLAS
POR HABERME DADO LO ESENCIAL
QUE ES LA VIDA, PORQUE SIN
SU APOYO, LA CONCLUSION DE
MI META NO SERIA POSIBLE.**

**A EL DIRECTOR DE TESIS,
DRP. ROBERTO CONTRERAS
PEREZ POR LA ASESORIA
TECNICA Y COMPANERISMO.**

A MI HONRABLE JURADO.

**A MIS HERMANOS:
LUZ, ENRIQUE, RAUL,
JANIER, JORGE, JOSE LUIS,
POR EL APOYO Y MOTIVACION
QUE ME HAN BRINDADO.**

**A MIS FAMILIARES Y AMIGOS,
POR LA AYUDA RECIBIDA.**

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	7
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	14
DISCUSION.....	30
CONCLUSION.....	34
APENDICE.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	39

RESUMEN

La conservación de organismos en Microbiología por periodos prolongados de tiempo presenta para las diversas instituciones educativas o del sector salud donde se realiza la elaboración de antígenos, problemas en la mayoría de los casos, debido a que los organismos presentan alteraciones morfológicas o fisiológicas.

Tradicionalmente la preparación de antígenos se ha realizado con cepas que presentan morfología típica. El propósito del presente trabajo es comparar la eficiencia de los tres métodos de conservación de cepas que a continuación se mencionan: en agua destilada, en aceite mineral y en refrigeración a 4° C.

Los organismos en estudio son 12 cepas de *Candida albicans* conservadas durante 7 años, en cada uno de los métodos mencionados.

La elaboración de antígenos (Candidina), se realizó a partir de la selección de cepas que mostraron morfología típica y rugosa. La actividad de ambos antígenos fue valorada por pruebas intradérmicas en un grupo de voluntarios. Así mismo se determinó si dichas alteraciones influyen en la actividad de antígenos para las pruebas intradérmicas.

INTRODUCCION

Candida albicans (Robin) Berkhout 1853 es un hongo levaduriforme que constituye parte de la flora normal del tubo digestivo de casi todos los mamíferos, incluyendo el hombre y aves (4,28). En el organismo humano, penetra en los primeros días del nacimiento y tiene como habitat natural el tubo digestivo y las regiones mucocutáneas (13,28,30).

Bajo determinadas condiciones esta levadura adquiere patogenicidad, y puede causar trastornos que van desde infecciones superficiales autolimitadas, hasta enfermedades sistémicas serias (27).

En la actualidad el género *Candida*, agrupa 81 especies de hongos levaduriformes y se ha considerado a *C. albicans* como la especie más importante del punto de vista médico. (10,12,19).

La morfología típica del hongo en Agar Sabouraud Dextrosa consiste en colonias blancas o cremas de aspecto húmedo y consistencia blanda, con olor característico a levadura.

La imagen microscópica revela al inicio del desarrollo células unicelulares hialinas de forma esférica u oval de 2.5 a 4 μ m de diámetro, que se reproducen por gemación, con formación posterior de pseudomicelio e hifas poco desarrolladas, esta característica varía dependiendo de el medio de cultivo usado y la cantidad de oxígeno (8). Forma tubo germinativo cuando se cultiva en suero humano o albúmina de huevo a 37° C, en un lapso de 2 a 3 horas (28). En agar harina de maíz tween 80 azul de tripano a temperaturas de 21 a 25°C, durante 72 horas, *C. albicans* produce clamidoconidias que miden entre 8 a 12 μ m de diámetro y pueden ser terminales o intercalares (6,11).

Las propiedades fisiológicas comprenden la exploración del metabolismo oxidativo y fermentativo, donde cada especie muestra un comportamiento particular (3,20).

El patrón bioquímico para *Candida albicans* se muestra en el cuadro 1.

CUADRO 1

REACCIONES DE ASIMILACION Y FERMENTACION DE
Candida albicans

ASIMILACION											
G1	Ma	Sa	La	Me	Ce	In	Xy	Ra	Tr	Du	Ga
+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+

FERMENTACION					
G1	Ma	Sa	La	Ga	Tr
AG	AG	-	-	AG	AG

NOTA:

G1 = Glucosa La = Lactosa Ce = Celobiosa Ra = Rafinosa

Ma = Maltosa Ga = Galactosa In = Inositol Tr = Trealosa

Sa = Sacarosa Me = Melobiosa Yx = Xylosa Du = Dulcitol

+ = Reacción Positiva. En asimilación indica desarrollo con vire del indicador.

- = Prueba negativa sin vire del indicador.

AG = Reacción positiva. En fermentación indica producción de gas con vire del indicador.

Fuente: (Ballows, 1981).

Los cultivos de referencia en el área de micología médica tienen un valor muy importante, ya que son herramienta para diferentes actividades como son la enseñanza, investigación y producción de antígenos. En estas actividades las micotecas juegan un papel importante porque conservan prácticamente en su totalidad los hongos y actinomicetos patógenos de importancia médica.

La conservación de cepas en el laboratorio implica varias dificultades debido a que los medios de cultivo se deshidratan en poco tiempo y es necesario realizar transferencias periódicas para mantener la viabilidad de los cultivos. Estas actividades resultan laboriosas por el consumo de tiempo, material y medios nutritivos; asimismo, existen factores que afectan el crecimiento y las características de los cultivos como son el contenido nutritivo del medio, la cantidad de medio en las placas, el pH, el grado de hidratación y la aereación (22,25,31).

Los resultados observados en diferentes investigaciones demuestran que el comportamiento de cepas que se tienen conservadas en el laboratorio presentan variaciones cuando se comparan con aislamientos recientes. Las alteraciones más frecuentes son, el pleomorfismo, la contaminación por bacterias, ácaros, levaduras y otros hongos filamentosos (28).

Las primeras observaciones realizadas por Castellani, Gracia y Araujo, por el método de conservación en agua destilada demostraron que *C. albicans* presenta viabilidad del 100% y variaciones morfológicas mínimas cuando se conservan por este método durante dos años. (7,16). Publicaciones posteriores incluyen estudios de cepas con tiempos de conservación más amplios (de 5 a 10 años), y realizan la observación de las características fisiológicas mediante pruebas bioquímicas (21,33).

Los trabajos consultados para el estudio de las cepas por el método de aceite mineral, presentan solamente observaciones de viabilidad y morfología macroscópica por periodos cortos de tiempo, (hasta 2 años), (1,6).

En investigaciones posteriores, se ha encontrado que la especie presenta variaciones importantes en su morfología (22,29,31 y 32), pero se desconoce si existen alteraciones en sus propiedades fisiológicas.

Dichas variaciones morfológicas no se han tomado en cuenta en la preparación de antígenos para reactividad cutánea (candidina), de ahí el interés de conocer las variaciones que se presentan al conservar *C. albicans* en aceite mineral estéril, agua destilada y en refrigeración, y si estas alteraciones influyen o no en la actividad de los antígenos para intradermorreacción.

OBJETIVOS

1. Determinar la viabilidad de los diferentes aislamientos de *Candida albicans* conservados en aceite mineral y agua destilada durante siete años.
2. Conocer las alteraciones morfológicas y fisiológicas que presenta *C. albicans* por los métodos de conservación en aceite mineral, agua destilada y refrigeración a 4° C.
3. Valorar la actividad de candidina preparada de cultivos con morfología típica y pleomórfica, en un grupo de voluntarios.
4. Determinar si las alteraciones morfológicas y fisiológicas de *Candida albicans* influyen en la producción de antígenos para intradermorreacción (candidina).

MATERIAL Y METODOS

El trabajo comprende el estudio de 12 cultivos de *Candida albicans* aislados de pacientes que asistieron al INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) en el periodo de 1948 a 1982. Dichas cepas fueron resembradas periódicamente y conservadas en tubos de ensayo de 15 x 150 mm con medio fresco de Agar Sabouraud Dextrosa a temperaturas de refrigeración 4°C hasta 1982. A partir de esta fecha, se realizaron también réplicas de los cultivos para conservarlos en aceite mineral y agua destilada así como también se conservaron a temperaturas de refrigeración a 4°C.

Paralelamente, se incluyeron 7 cepas aisladas en 1989 como cultivos de referencia, para el estudio de las características morfológicas y fisiológicas típicas de esta especie. La tabla 1 describe el número de registro de los cultivos como se encuentran en el INDRE, con la fecha de aislamiento y su determinación taxonómica.

a) DETERMINACION DE LA VIABILIDAD EN AGUA DESTILADA Y ACEITE MINERAL.

Las cepas conservadas por ambos métodos, fueron resembradas en medio fresco de Agar Sabouraud Dextrosa, transfiriendo una pequeña porción de cultivo e incubando los tubos a 28°C. Las evaluaciones del desarrollo se realizaron como máximo a los 7 días y los tubos negativos (ausencia de desarrollo), se resembraron para confirmar dichas observaciones.

TABLA 1

NUMERO DE REGISTRO, FECHA DE AISLAMIENTO Y DETERMINACION TAXONOMICA DE LOS CULTIVOS DE *Candida albicans*.

Número de registro	Fecha de aislamiento	Determinación taxonómica
2001	12-07-48	<i>Candida albicans</i>
2031	03-03-65	" "
2033	04-03-67	" "
2034	20-07-73	" "
2036	04-08-68	" "
2037	06-10-68	" "
2052	22-10-74	" "
2053	22-10-74	" "
2058	30-03-77	" "
2059	08-03-76	" "
2065	05-09-78	" "
2066	19-04-82	" "
2067*	25-07-89	" "
2068*	19-07-89	" "
2069*	31-07-89	" "
2070*	29-07-89	" "
2071*	11-07-89	" "
2072*	17-07-89	" "
2073*	30-08-89	" "

NOTA: * Indica cepas utilizadas como referencia de las características morfológicas y fisiológicas típicas de esta especie.

b) MORFOLOGIA MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA.

Con respecto a la morfología macroscópica se revisaron las características de color, consistencia y superficie. La morfología microscópica se estudió a través de preparaciones en fresco tomadas directamente de los cultivos, atendiendo la presencia de levaduras con blastoconidias, pseudomicelio y micelio septado. El procedimiento se realizó dos ocasiones.

c) PRODUCCION DE TUBO GERMINATIVO.

La prueba fue realizada por duplicado inoculando cada uno de los cultivos con 0.5 ml de suero humano, homogeneizado en un rotor mecánico e incubando por dos horas a 37°C. Al término de la incubación fueron realizadas preparaciones en fresco, depositando una gota de suspensión y se revisó su morfología microscópica.

La prolongación del citoplasma adoptando el aspecto de un tubo fue indicativo de una prueba positiva, mientras que la presencia de células esféricas solas o con blastoconidias fue considerada como una prueba negativa.

d) FORMACION DE MICELIO O CLAMIDONIDIAS.

El medio de cultivo utilizado fue el Agar Harina de Maíz Tween 80 Azul de Tripiano. Las placas con este medio se dividieron en cuatro partes y en cada región se sembró un cultivo con dos estrías paralelas separadas a una distancia aproximada de 1 cm. Posteriormente se cubrieron con un cubreobjetos, ejerciendo pequeña presión sobre el agar, efecto que reduce la tensión de oxígeno. Los medios se incubaron a 28°C durante 4 días. El procedimiento se realizó por duplicado.

Las lecturas se realizaron a partir de las 48 horas, observando directamente el cubreobjetos con el microscopio óptico en cada cultivo. La presencia de

hifas septadas ramificadas indicó la producción de micelio, y la presencia de células esféricas de pared gruesa intercalares, laterales o terminales de clamidoconidias.

e) PRUEBAS BIOQUIMICAS

e-1) METABOLISMO OXIDATIVO

El medio Base de de Asimilación de Carbohidratos utilizado fue el Caldo Sabouraud, modificando la concentración del 1% al 0.5% de peptona y variando la fuente de carbono de acuerdo al patrón bioquímico de los azúcares descritos para esta especie (3). El medio fue distribuido en tubos de ensaye de 10 x 130 mm con pipetas estériles de 10 ml. en cantidades de 4.5 ml en cada tubo, y esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Los tubos fueron sometidos a prueba de esterilidad incubando el medio a 37°C durante 48 horas.

Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, a cada tubo le fue agregado con una pipeta milimétrica de 5 ml, 0.5 ml. de cada uno de los carbohidratos, previamente esterilizados en filtración y preparados a una concentración final de 2%. Los carbohidratos utilizados fueron: glucosa, maltosa, lactosa, galactosa, inositol, rafinosa y sacarosa.

Cada lote de tubos ya sembrado fue incubado con su tubo control correspondiente a 28°C durante 7 días, realizándose observaciones a partir de las 48 horas. El procedimiento se realizó por duplicado, las pruebas positivas correspondieron al viraje del indicador del medio (azul de bromotímol), a el color amarillo.

e-2) METABOLISMO FERMENTATIVO.

Fue utilizado el método propuesto por Durham (3,9), con el Medio Base de Caldo Rojo Fenol en cantidad de 4.5 ml, contenidos en tubos de ensaye de 10

x 130 mm, y esterilizado a 121°C durante 15 minutos, los carbohidratos estudiados fueron: glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa. Cada uno de los azúcares fue agregado en cantidad de 0.5 ml con pipetas estériles a los tubos con el Medio Base para dar una concentración final del azúcar al 2%.

Los tubos sembrados fueron incubados a 28°C durante 7 días, y las lecturas fueron revisadas a partir de las 48 horas. Las pruebas positivas correspondieron a el viraje del indicador del medio del color rojo a amarillo y a la producción de gas, que se observó en el tubo invertido en el medio de cultivo. El procedimiento se realizó por duplicado.

f) ANTIGENOS PARA INTRADERMORREACCION. (CANDIDINA).

Fueron separados dos antígenos en suspensión celular de acuerdo a las indicaciones por Conant y colaboradores (9). En el primero, (Lote 1) se seleccionaron tres cepas con superficie lisa, (2034 Agua, 2036 Agua, 2037 Agua) y en el segundo (Lote 2), tres cepas con superficie rugosa, (2033 Refrigeración, 2052 Aceite, 2053 Aceite).

Cada cepa fue sembrada en tubos con Agar Sabouraud Dextrosa e incubada a 37°C durante 48 horas.

Posteriormente, por separado el crecimiento de las cepas con superficie lisa y rugosa fue transferido a matraces Erlenmeyer, utilizando para desprender el crecimiento solución salina fisiológica estéril, y ajustada la concentración de células al tubo No. 5 del Nefelómetro de Mcfarland's, equivalente a una concentración aproximada de 15×10^6 células/ml.

Los matraces fueron colocados en Baño María a 60°C durante una hora, por dos ocasiones. Posteriormente de cada matraz fueron tomadas alícuotas de 2 ml. para sembrar 5 tubos en Agar Sabouraud por cada lote y se incubó a 37°C durante 48 horas.

La ausencia de desarrollo en los tubos fue indicativo de que las células levaduriformes no eran viables.

Asimismo fueron sembrados también alícuotas de 2 ml. en 5 tubos de ensaye de 15 x 150 mm con Caldo Soya Trypticosa y en 5 tubos de Caldo Tioglicolato para descartar contaminación bacteriana del antígeno. Por último se procedió a envasar en antígeno en viales de 2 ml y 5 ml en condiciones de esterilidad.

g) APLICACION DE INTRADERMOREACCION EN VOLUNTARIOS.

Los antígenos fueron aplicados por vía intradérmica en cantidad de 0.1 ml. en la porción media del antebrazo de 52 voluntarios tomados al azar. En la parte superior del antebrazo fue aplicado el antígeno de las cepas de superficie lisa, mientras que en la parte inferior del mismo fue administrado el antígeno de las cepas rugosas.

La lectura fue realizada a las 48 horas, la presencia de induración igual a 5 mm o mayor correspondió a una prueba positiva, mientras que la ausencia de reacción o induración menor de 5 mm fue indicativo de una prueba negativa (19).

RESULTADOS

a) VIABILIDAD DE LAS CEPAS DE *C. albicans*, CONSERVADAS EN ACEITE MINERAL Y AGUA DESTILADA DURANTE 7 AÑOS.

En las tablas 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos. El total de las cepas por los dos métodos presenta una viabilidad del 100%. El crecimiento de las cepas fue franco y todas las cepas exhibieron desarrollo a la primera resiembra.

b) CEPAS CONSERVADAS EN ACEITE MINERAL.

MORFOLOGIA COLONIAL.

Del total de 12 cepas que se mantuvieron por este método, 8 presentaron alteraciones importantes en su morfología colonial, en donde la superficie fue rugosa o pleomórfica. El color de la colonia fue crema y la consistencia blanda (Tabla 2). El resto de las cepas (cuatro) reveló colonias de superficie lisa con morfología típica del hongo. Las cepas se conservaron a temperatura ambiente.

MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

La observación microscópica de las cepas rugosas reveló la presencia de células levaduriformes, con predominio de pseudomicelio mientras que las cepas con superficie lisa revelaron sólo presencia de células esféricas con blastoconidias. La formación de micelio en Agar Harina de Maíz Tween 80 Azul de Tripiano y en Agar Sabouraud Dextrosa ocurrió en 11 de las 12 cepas, mientras que una cepa no mostraba presencia de pseudomicelio.

TABLA 2

**VIABILIDAD Y MORFOLOGIA MACROSCOPICA Y
MICROSCOPICA DE C. albicans CONSERVADA
POR EL METODO DE ACEITE MINERAL.**

No. DE REGISTRO	VIABILIDAD A LOS 7 AÑOS	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA		MICROSCOPICA	
			NICELIO AHN ^N	PSEUDONICELIO ASD ^N	TUBO GERMINATIVO	CLAMIDOCOMIDIAS
2801	+	PLEOMORFICA	+	+	-	-
2831	+	TIPICA	-	+	+	+
2833	+	PLEOMORFICA	+	-	+	+
2834	+	TIPICA	+	+	-	+
2836	+	TIPICA	+	+	+	-
2837	+	PLEOMORFICA	+	+	+	-
2852	+	PLEOMORFICA	+	+	-	+
2853	+	PLEOMORFICA	+	+	+	+
2856	+	PLEOMORFICA	+	+	+	+
2859	+	PLEOMORFICA	+	+	+	-
2865	+	TIPICA	+	+	+	+
2866	+	PLEOMORFICA	+	+	+	-

NOTA: (+) PRESENTE
 (-) AUSENTE
 AHN^N AGAR HARINA DE MAIZ TWEEN 80 AZUL DE TRIPANO
 ASD^N AGAR SABOURAUD DEXTROSA
 TIPICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE LISA
 PLEOMORFICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE RUGOSA

El tubo germinativo se desarrolló favorablemente en el suero humano, en 9 de las 12 cepas, mientras que las clamidoconidias se formaron en 7 cepas.

c) CEPAS CONSERVADAS EN AGUA DESTILADA.

MORFOLOGIA COLONIAL.

Las cepas conservadas en agua destilada son las que presentan las características más estables en cuanto a la morfología colonial típica, la que se observó en 8 de las 12 cepas, mientras que cuatro exhibieron pleomorfismo las cepas se conservaron a temperatura ambiente (Tabla 3).

MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

Las colonias de superficie lisa revelan células levaduriformes de forma oval o esférica con presencia de blastoconidias. Las cepas con morfología rugosa presentan además abundante pseudomicelio. Todas formaron micelio en Agar Harina de Maíz Tween 80 Azul de Tripano. Todas las cepas revelaron formación de tubo germinativo y con respecto a la producción de clamidoconidias, sólo dos cepas no produjeron estas células.

d) CEPAS CONSERVADAS EN REFRIGERACION A 4°C.

MORFOLOGIA COLONIAL.

Las cepas conservadas en refrigeración, tuvieron como substrato el medio de Agar Sabouraud Dextrosa y al igual que en las cepas conservadas en aceite mineral, presentan variaciones importantes en su morfología colonial. De las 12 cepas, 7 presentaron pleomorfismo.

TABLA 3

**VIABILIDAD Y MORFOLOGIA MACROSCOPICA Y
MICROSCOPICA DE C. albicans CONSERVADA
POR EL METODO DE AGUA DESTILADA.**

No. DE REGISTRO	VIABILIDAD A LOS 7 AÑOS	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA		MICROSCOPICA	
			MICELIO AHM [*]	PSEUDOMICELIO ASD [*]	TUBO GERMINATIVO	CLAMIDOCONIDIAS
2801	+	PLEOMORFICA	+	-	+	+
2831	+	TIPICA	+	+	+	+
2833	+	PLEOMORFICA	+	-	+	+
2834	+	TIPICA	+	+	+	+
2836	+	TIPICA	+	+	+	+
2837	+	TIPICA	+	+	+	-
2832	+	TIPICA	+	-	+	+
2853	+	TIPICA	+	+	+	+
2856	+	TIPICA	+	+	+	+
2859	+	PLEOMORFICA	+	+	+	+
2865	+	TIPICA	+	+	+	+
2866	+	PLEOMORFICA	+	+	+	-

NOTA: (+) PRESENTE
 (-) AUSENTE
 AHM^{*} AGAR HARINA DE MAIZ THEEN BB AZUL DE TRIPANO
 ASD^{*} AGAR SABOURAUD DEXTROSA
 TIPICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE LISA
 PLEOMORFICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE RUGOSA

MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

Las observaciones microscópicas tanto de las cepas con morfología rugosa y lisa son similares a las descritas en los métodos de agua destilada y aceite mineral. Las clamidoconidias se formaron en refrigeración, en sólo el 50% de las cepas (seis). El micelio se produjo en diez cepas pero el comportamiento varía en Agar Harina de Maíz Tween 80 Azúl de Tripano. El tubo germinativo se formó en 9 cepas (TABLA 4).

e) CULTIVOS DE REFERENCIA. (AISLAMIENTOS RECIENTES)

MORFOLOGIA COLONIAL.

Las cepas recién aisladas delatan una morfología colonial típica, presentando todas las colonias superficie lisa.

MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

Los 7 cultivos revelaron al principio células levaduriformes esféricas con presencia de blastoconidias. El micelio se produjo en los siete aislamientos, así como también hubo formación de tubo germinativo y clamidoconidias (TABLA 5).

TABLA 4

MORFOLOGIA MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA DE
C. albicans CONSERVADA EN REFRIGERACION
 A 4^o C.

No. DE REGISTRO	VIABILIDAD A LOS 7 AÑOS	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCOPICA			CLAMIDOCOMIDAS
			NICELIO AM ⁿ	PSEUDONICELIO ASD ⁿ	TUBO GERMINATIVO	
2881	+	PLEOMORFICA	+	-	-	+
2831	+	TIPICA	+	+	+	-
2833	+	PLEOMORFICA	+	+	+	+
2834	+	PLEOMORFICA	+	+	+	+
2836	+	TIPICA	+	-	+	+
2837	+	PLEOMORFICA	-	+	+	-
2852	+	PLEOMORFICA	-	+	+	-
2853	+	TIPICA	+	+	+	+
2856	+	TIPICA	+	+	-	+
2859	+	TIPICA	+	+	+	-
2865	+	PLEOMORFICA	+	+	+	-
2866	+	PLEOMORFICA	+	+	-	-

NOTA: (+) PRESENTE
 (-) AUSENTE
 AMⁿ AGAR MARINA DE NAIZ TWEED 88 AZUL DE TRIPANO
 ASDⁿ AGAR SABOURAUD DEXTROSA
 TIPICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE LISA
 PLEOMORFICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE RUBOSA

TABLA 5
CULTIVOS DE REFERENCIA DE C. albicans
DE AISLAMIENTO RECIENTE.

No. DE REGISTRO	MORFOLOGIA COLONIAL	MORFOLOGIA		MICROSCOPICA		CLAMIDOCONIDIAS
		NICELIO AHN [*]	PSEUDONICELIO ASD [*]	TUBO GERMINATIVO		
1	TIPICA	+	+	+		+
2	TIPICA	+	+	+		+
3	TIPICA	+	+	+		+
4	TIPICA	+	+	+		+
5	TIPICA	+	+	+		+
6	TIPICA	+	+	+		+
7	TIPICA	+	-	+		+

NOTA: (+) PRESENTE
 (-) AUSENTE
 AHN^{*} AGAR HARINA DE MAIZ TWEEN 80 AZUL DE TRIPANO
 ASD^{*} AGAR SABOURAUD DEXTROSA
 TIPICA MORFOLOGIA COLONIAL DE SUPERFICIE LISA

RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS

CEPAS CONSERVADAS EN ACEITE MINERAL

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 6. Existen diferencias con el patrón típico de fermentación de esta levadura. Referente a la glucosa sólo 6 cepas produjeron gas, mientras una ni siquiera produjo ácido. Una situación similar ocurrió con la maltosa, donde sólo 3 cepas produjeron gas y 2 cepas no fermentaron el carbohidrato. Respecto a la sacarosa y lactosa, los datos que se tienen son similares a los descritos en la literatura.

En relación a los azúcares utilizados en asimilación, una cepa no asimiló la maltosa ni la galactosa y no se observaron diferencias en la glucosa, sacarosa, lactosa, inositol y rafinosa.

CEPAS CONSERVADAS EN AGUA DESTILADA

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 7. Los datos son similares a las cepas de aceite mineral, sólo que las cepas que no habían fermentado la glucosa y maltosa (2001, 2052), en este caso sí ocurrió la producción de ácido y en una de las dos cepas (2001) hubo formación de gas. Esta última característica se incrementó en estas cepas donde 7 de ellas lo formaron tanto en glucosa como en maltosa. El resto de las reacciones fue similar en sacarosa y lactosa.

En asimilación las reacciones en general fueron similares a las descritas en teoría, sólo que en la galactosa 3 cepas (2034, 2036, 2052) fueron positivos débiles.

TABLA 6
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS
DE CEPAS DE C. albicans CONSERVADAS EN
ACEITE MINERAL.

No. DE REGISTRO	FERMENTACION				ASIMILACION							
	GL	MA	SA	LA	GL	MA	SA	LA	GA	IM	NA	
2001	K	K	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2031	AG	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2033	AG	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2034	A	A	-	K	+	+	+	-	+/-	-	-	
2036	AG	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2037	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2052	AG	K	-	K	+	-	+	-	-	-	-	
2053	AG	A	-	K	+	+	+/-	-	+	-	-	
2056	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2059	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2065	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2066	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	

NOTA:

(AG) PRUEBA POSITIVA CON VIRE
DEL INDICADOR Y FORMACION
DE ACIDO SOLO O CON GAS

(K) PRUEBA NEGATIVA CON VIRE
DEL INDICADOR PERO SIN
FORMACION DE ACIDO O GAS

(A) FORMACION DE ACIDO
(-) NEGATIVO
(+) POSITIVO
(+/-) POSITIVO DEBIL

TABLA 7

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS
DE CEPAS DE C. albicans CONSERVADAS EN
AGUA DESTILADA.

No. DE REGISTRO	FERMENTACION				ASIMILACION							
	GL	MA	SA	LA	GL	MA	SA	LA	GA	IN	RA	
2801	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2831	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2833	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2834	AG	A	-	K	+	+	-	-	+/-	-	-	
2836	AG	A	-	K	+	+	-	-	+/-	-	-	
2837	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2852	A	A	-	K	+	+	+	-	+/-	-	-	
2853	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2856	AG	AG	-	K	+	+	-	-	+	-	-	
2859	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2865	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2866	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	

NOTA:

(AG) PRUEBA POSITIVA CON VIRE
DEL INDICADOR Y FORMACION
DE ACIDO SOLO O CON GAS

(K) PRUEBA NEGATIVA CON VIRE
DEL INDICADOR PERO SIN
FORMACION DE ACIDO O GAS

(A) FORMACION DE ACIDO
(-) NEGATIVO
(+) POSITIVO
(+/-) POSITIVO DEBIL

CEPAS CONSERVADAS EN REFRIGERACION A 4°C.

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 8. En estas cepas existen mayores diferencias. La formación de gas en glucosa ocurrió sólo en cuatro cepas, y en producción de ácido dos cepas fueron positivas débiles y una fue negativa. En maltosa cinco cepas formaron gas y una fue negativa. En sacarosa y lactosa no hubo cambios de importancia.

En las pruebas de asimilación en glucosa, maltosa, sacarosa y galactosa hubo presencia de reacciones positivas débiles y negativas en unas cuantas cepas. En lactosa, rafinosa e inositol no ocurrieron cambios.

CULTIVOS DE REFERENCIA (CEPAS RECIENTE AISLADAS)

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 9. En este grupo de cepas las reacciones fueron muy similares a las descritas en el modelo bioquímico característico de esta levadura. La formación de gas ocurrió en la mayoría de las cepas tanto en maltosa (6 de 7) como en glucosa (6 de 7). En el resto de los azúcares, por fermentación y también por asimilación los resultados no presentaron variación alguna con los datos descritos en la literatura.

TABLA 8

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS
DE CEPAS DE C. albicans CONSERVADAS EN
REFRIGERACION A 4⁰C.**

No. DE REGISTRO	FERMENTACION				ASIMILACION							
	GL	MA	SA	LA	GL	MA	SA	LA	GA	IN	RA	
2001	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2031	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2033	+/-	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2034	-	-	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2036	+/-	A	-	K	-	+	+/-	-	+	-	-	
2037	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2052	AG	A	-	K	+/-	-	+	-	-	-	-	
2053	AG	AG	-	K	+	+	-	-	+	-	-	
2056	AG	AG	-	K	+	+	-	-	+/-	-	-	
2059	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2065	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2066	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	

NOTA:

(AG) PRUEBA POSITIVA CON VIRE
DEL INDICADOR Y FORMACION
DE ACIDO SOLO O CON GAS

(K) PRUEBA NEGATIVA CON VIRE
DEL INDICADOR PERO SIN
FORMACION DE ACIDO O GAS

(A) FORMACION DE ACIDO
(-) NEGATIVO
(+) POSITIVO
(+/-) POSITIVO DEBIL

TABLA 9

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DE LOS
CULTIVOS DE REFERENCIA DE C. albicans
< CEPAS RECIENTE AISLADAS >

No. DE REGISTRO	FERMENTACION				ASIMILACION							
	GL	MA	SA	LA	GL	MA	SA	LA	GA	IN	RA	
2891	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2831	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2833	+/-	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2834	-	-	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2836	+/-	A	-	K	-	+	+/-	-	+	-	-	
2837	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2852	AG	A	-	K	+/-	-	+	-	-	-	-	
2853	AG	AG	-	K	+	+	-	-	+	-	-	
2856	AG	AG	-	K	+	+	-	-	+/-	-	-	
2859	A	A	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2863	AG	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	
2866	A	AG	-	K	+	+	+	-	+	-	-	

NOTA:

(AG) PRUEBA POSITIVA CON VIRE
DEL INDICADOR Y FORMACION
DE ACIDO SOLO O CON GAS

(K) PRUEBA NEGATIVA CON VIRE
DEL INDICADOR PERO SIN
FORMACION DE ACIDO O GAS

(A) FORMACION DE ACIDO

(-) NEGATIVO

(+) POSITIVO

(+/-) POSITIVO DEBIL

INTRADERMORREACCIONES CON CANDIDINA

Los resultados obtenidos se indican en las tablas 10 y 11. Las reacciones cutáneas exhibieron gran variabilidad. Es de interés señalar el porcentaje elevado de reactores positivos a ambos antígenos. De los 52 voluntarios en total, 42 fueron, reactores positivos y 10 negativos con el antígeno preparado de cepas lisas, mientras que en el antígeno de cepas rugosas ocurrieron 48 reactores positivos y 4 negativos.

La diferencia de reactores negativos parece tener significado, mientras que con el antígeno de cepas lisas ocurrían 10 casos negativos, con el antígeno de cepas rugosas sólo se presentaron 4 casos negativos. De los casos positivos con ambos antígenos, 22 de ellos exhibieron diámetro de induración muy similares, mientras que 10 casos con cada antígeno presentaron diferencias significativas de 5 mm o más en el mismo voluntario.

También es de interés señalar que 3 casos positivos con el antígeno de cepas rugosas no exhibieron ninguna respuesta con el antígeno de cepas lisas; mientras que con este último antígeno un paciente positivo no reveló respuesta alguna con el antígeno de cepas rugosas. Se presentó, el caso de dos infantes (de 5 y 9 años respectivamente), que no respondieron para ningún antígeno.

TABLA 10

**RESULTADOS DE REACCIONES INTRADERMICAS CON CANDIDINA
A PARTIR DE CEPAS LIBAS <LOTE 1> Y CEPAS RUGOSAS**

<LOTE 2>

NOMBRE	EDAD	LOTE 1	LOTE 2
(INICIALES)	(MOS)	(INDURACION EN mm.)	(INDURACION EN mm.)
1.- JPA	27	5	6
2.- FBB	28	11	13
3.- OVT	28	12	13
4.- YNF	25	12	14
5.- LPB	44	17	24
6.- SBP	18	18	8
7.- TFS	43	18	8
8.- FPS	43	3	5
9.- APS	48	16	8
10.- HMB	32	18	38
11.- HSA	38	7	5
12.- LHAP	44	23	28
13.- SZR	11	35	15
14.- BAV	9	--	--
15.- JAP	33	18	15
16.- RAP	35	8	7
17.- JAP	38	28	--
18.- INR	33	11	18
19.- PVDF	37	19	18
20.- LVN	25	15	25
21.- EPM	68	19	19
22.- NDS	58	11	18
23.- MPF	11	12	8
24.- FPM	54	17	18
25.- DHA	38	28	15
26.- AVN	48	42	38

CONTINUA EN LA SIGUIENTE PAGINA.

TABLA 10

**RESULTADOS DE REACCIONES INTRADERMICAS CON CANDIDINA
A PARTIR DE CEPAS LISAS (LOTE 1) Y CEPAS RUGOSAS**

<LOTE 2>

NOMBRE (INICIALES)	EDAD (AÑOS)	LOTE 1 (DURACION EN mm.)	LOTE 2 (DURACION EN mm.)
27.- VNR	32	-	25
28.- GGM	6	15	10
29.- GGD	45	20	19
30.- HMK	40	10	20
31.- MLGT	25	3	3
32.- EVR	35	3	5
33.- PGG	35	5	0
34.- CCP	37	6	0
35.- JLAP	28	20	22
36.- BBR	32	30	25
37.- JBR	10	-	-
38.- BBR	10	10	0
39.- ERN	51	-	10
40.- MVR	20	4	5
41.- MHA	20	20	10
42.- MHA	13	-	5
43.- MAC	25	20	26
44.- IBG	25	10	12
45.- AVD	32	25	24
46.- MEJ	20	19	26
47.- EEER	25	31	10
48.- MLPH	65	16	10
49.- EAP	37	15	10
50.- TSA	20	10	17
51.- LAP	26	4	5
52.- LGB	26	20	30

NOTA: (-) AUSENCIA DE REACCION.

. DISCUSION

Las doce cepas de *C. albicans* conservadas por 7 años en el método de agua destilada y aceite mineral, exhibieron un porcentaje de viabilidad del 100%. Estas observaciones son similares a las citadas en la literatura, sólo que en dichos trabajos se ha incluido un número reducido de aislamientos de la especie y las cepas se han conservado por periodos cortos de tiempo.

En aceite mineral las cepas se han mantenido por periodos de 1 a 2 años con 1 a 9 ejemplares de *C. albicans*, (1,6), y en agua destilada el tiempo de conservación varía en las diferentes publicaciones de 1 hasta 10 años, con 1 hasta 15 ejemplares de la especie en estudio. (7,16,21,33).

El fenómeno de variación morfológica se ha citado por diferentes autores en la literatura (5). Negroni en 1935 introduce el término de "cepas lisas" para designar a el fenotipo normal con colonias de superficie lisa y de "cepas rugosas" para el fenotipo pleomórfico. Esta designación la usó Besta en 1938, Langeron y Guerra en 1939 y Cavallero.

Posteriormente, en 1988, Rikkerink y colaboradores en sus investigaciones observan que el fenotipo normal los constituyen células esféricas y ovoides. Y el fenotipo pleomórfico lo constituyen células que pueden ser de longitud y volumen celular mayor y con dos veces la masa de las células normales.

Las variaciones encontradas se han producido de manera espontánea o han sido inducidas. Tal es el caso de colonias atípicas con múltiples formas coloniales que han sido descritas (29,31,32). Siendo producidos estos cambios por modificaciones en la concentración de sustancias nutritivas, en la cantidad de agar, por bajas dosis de rayos ultravioleta, o han sido inducidos con sustancias químicas (24).

Los resultados obtenidos demuestran que los aislamientos de *C. albicans* presentan variaciones en los tres métodos de laboratorio utilizados para su conservación. Los datos indican que el pleomorfismo se presenta en menor frecuencia en las cepas conservadas por el método de agua destilada, en donde del total de 12 cepas, 4 resultaron pleomórficas. En el método de aceite mineral y refrigeración a 4°C se encontró una mayor proporción de cepas que presentaron este fenómeno, (8 y 7 cepas respectivamente).

La formación de micelio, característica fundamental del género presenta pequeñas variaciones y sólo en refrigeración (a 4°C) y aceite mineral, algunas cepas pierden la capacidad de formarlo en los medios de cultivo convencionales.

Una situación diferente ocurre en la formación del tubo germinativo y clamidoconidias, características que se ven seriamente afectadas en la conservación de aceite mineral y refrigeración a 4°C, hecho que prácticamente no ocurre en las cepas conservadas en agua destilada.

Por este método se obtuvo un 100% de producción en las características de micelio y tubo germinativo, así como también la mayor producción de clamidoconidias.

Los cultivos de referencia revelan que las características morfológicas se mantienen estables por periodos cortos de tiempo, realizando resiembras periódicas, hecho conocido desde hace mucho tiempo en la conservación de hongos de importancia médica.

Los resultados de las pruebas bioquímicas demostraron que en general, las cepas conservadas por los tres métodos exhibieron niveles bajos de fermentación.

El mayor número de cepas donde hubo fermentación fue por el método de agua destilada con siete cepas para la glucosa y maltosa, continuando con el método de aceite mineral en donde seis cepas fermentaron la glucosa y tres cepas la

maltosa y por último el método de refrigeración con cuatro cepas que fermentaron la glucosa y cinco la maltosa. Con respecto a la sacarosa y la lactosa no parece haber cambios en alguno de los tres métodos y los resultados obtenidos coinciden con los descritos en la literatura.

Referente a las pruebas de asimilación existen pequeños cambios pero consideramos que pueden tener importancia al seleccionar cepas para producción de antígenos. Los azúcares que presentan variaciones son glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa.

Algunas cepas pierden la capacidad de sintetizar las enzimas que hidrolizan dichos substratos o los producen en pequeñas cantidades originando reacciones positivas débiles.

En el caso de lactosa, inosinol y rafinosa no se encontraron diferencias bioquímicas, pero es importante señalar que *C. albicans* carece de las enzimas para hidrolizar estos substratos.

La interdermorreacción con antígeno de *C. albicans* (candidina), no tiene en general, utilidad práctica en el diagnóstico de Candidiasis, pues la reacción es positiva en un 60% de la población sana (11,19). Su utilidad es indirecta y permite valorar la inmunidad celular tardía de un individuo.

El antígeno convencional (candidina) utilizado ha sido preparado con cepas lisas. Los resultados obtenidos en este trabajo son de bastante interés porque con el antígeno de cepas lisas hubo menor porcentaje de casos positivos (80%), mientras que con el antígeno de cepas rugosas ocurrió mayor porcentaje de casos positivos (92%).

Estos datos fueron inesperados, pues al utilizar cepas pleomórficas se esperaba que el porcentaje de positivos fuera menor con este antígeno. Existe también gran variabilidad en la reactividad cutánea con ambos antígenos, 24 reactores

positivos exhibieron diámetros mayores de induración con el antígeno de cepas lisas, mientras que 21, lo revelaron con el antígeno de cepas rugosas.

También es de interés señalar que existen casos negativos (3) con el antígeno de cepas lisas, y que son positivos con el antígeno de cepas rugosas.

Estos resultados sugieren que las alteraciones morfológicas y fisiológicas presentes en las cepas pleomórficas no influyen de manera determinante en la preparación de candidina para reactividad cutánea, aunque cabe aclarar que el grupo de voluntarios se eligió al azar, independientemente de la edad y del estado de salud.

Estas dos variables se reflejan en los resultados aquí obtenidos y muestran un panorama general de la respuesta de un grupo pequeño y heterogéneo de individuos a la actividad de la candidina elaborada a partir de cepas lisas y rugosas.

CONCLUSIONES

El estudio surge de la necesidad de conocer a nivel comparativo la efectividad de los métodos de conservación de agua destilada, aceite mineral y refrigeración a 4°C, para *C. albicans*.

Como resultado de trabajos anteriores se tenía conocimiento, de que los tres métodos de conservación utilizados en la realización de este trabajo, restringen la actividad metabólica de las cepas de *C. albicans*.

El método de agua destilada a temperatura ambiente, es el que demostró ser el más eficiente y recomendable para conservar las cepas de esta especie por periodos de varios años, manteniendo más estables las características morfológicas y fisiológicas típicas de esta especie. Se confirmó que el método es sencillo, económico y permite mantener grandes micotecas con poco esfuerzo y en poco espacio.

El método de refrigeración a 4°C, es el que tradicionalmente se utiliza para la conservación de cepas en diversas instituciones. Es un método útil, pero es necesario hacer resiembras periódicas para mantener las cepas en buen estado, requiriéndose de manera constante de medios de cultivo fresco y de personal especializado. Sin embargo es el recurso de los aquí estudiados que mayor grado de pleomorfismo origina en la especie.

La morfología colonial de *C. albicans* demostró un elevado porcentaje de pleomorfismo con el método de refrigeración a 4°C y aceite mineral. Aunque la morfología microscópica para ambos métodos no resultó severamente dañada, en el aspecto fisiológico sí se encontraron alteraciones presentándose de manera más acentuada en las pruebas de fermentación que en las de asimilación.

Se puede deducir que el método de aceite mineral, pierde su eficiencia al

transcurrir varios años, como en el presente trabajo en donde las cepas se mantuvieron durante siete años por este método, observándose altos porcentajes de pleomorfismo.

Con respecto a las reacciones intradérmicas cabe aclarar, que anteriormente no se habían utilizado cepas con variaciones morfológicas para preparación de antígenos y no se había realizado la comparación de reactividad de antígenos de cepas lisas y rugosas.

La proporción aproximadamente similar de la reactividad positiva en las pruebas intradérmicas para ambos lotes de cepas; lisas y rugosas, demuestra que las alteraciones morfológicas y fisiológicas observadas no influyen de manera determinante por lo menos en la actividad de los antígenos para intrademorreacción.

APENDICE

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

1. AGAR SABOURAUD DEXTROSA

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Glucosa.....	40.0
Peptona.....	10.0
Agar.....	15.0
Agua destilada.....	1000.0

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos de ensaye, siete ml del medio, esterilizar a 118°C (no más de 15 lbs. de presión) durante 15 minutos.

pH final 5.6[±] 0.2

2. AGAR HARINA DE MAIZ TWEEN 80 AZUL DE TRIPANO

Fórmula aproximada en gramos

Harina de maíz.....	20.0
Agar.....	10.0
Tween 80.....	5.0
Azul de Tripano en solución al 0.5%.....	0.5 ml

En un matraz Erlenmeyer colocar el harina de maíz y agregar 500 ml de agua destilada lentamente, con agitación constante. Llevar a Baño María a 65°C durante una hora, agitando ocasionalmente el matraz. Filtrar dos veces y adicionar el agar, el tween 80 y el azul de tripano. Disolver el agar por calentamiento

y esterilizar el medio a 121°C (15 lbs), durante 20 minutos. Dejar enfriar el medio aproximadamente a 45°C, y en condiciones estériles distribuir 25 ml en cajas de Petri de 15 x 150 mm.

3. MEDIO BASE DE ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS

CALDO SABOURAUD CON PEPTONA AL 0.5%

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Peptona.....	10.0
Azul de bromotimol.....	1.0 ml al 1.6%

Disolver la peptona en un litro de agua destilada, agregar el indicador de azul de bromotimol de la solución al 1.6% y verificar que el pH sea equivalente a 7. Distribuir el medio en tubos de ensaye de 10 x 100 mm colocando 4.5 ml en cada tubo y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

4. MEDIO DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

BASE DE CALDO ROJO FENOL

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Peptona de caseína.....	10.0
Cloruro de sodio.....	0.5
Rojo fenol.....	0.018

Disolver en un litro de agua destilada 15g del medio deshidratado. Adicionar el indicador rojo fenol. En los tubos de ensaye de 10 x 100 mm colocar los tubos Durham y envasar 4.5 ml del medio base. Esterilizar a 121°C, (15 lbs) durante 15 minutos.

5. CALDO SOYA TRIPTICASA

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Peptona de caseína.....	17.0
Peptona de soya.....	3.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato dipotásico.....	2.5
Dextrosa.....	2.5

En un matraz Erlenmeyer suspender 30 gr del medio deshidratado en un litro de agua destilada . Mezclar y calentar ligeramente hasta lograr la solución. Distribuir y esterilizar a 121°C (15 lbs. de presión), durante 15 minutos. pH final 7.3[±] 0.2

6. CALDO TIOGLICOLATO

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Peptona de caseína.....	15.0
L-Cisteína.....	0.5
Glucosa anhidra.....	5.5
Extracto de levadura...	5.0
Cloruro de Sodio.....	0.5
Tioglicolato de sodio.	0.5
Resazurina.....	0.001
Agar.....	0.750

Suspender 29.5 gr. del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Agitar y calentar con frecuencia hasta disolver. Distribuir en tubos de ensayo y esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar y guardar a temperatura ambiente (entre 20 y 30°C). pH final 7.1[±] 0.1

BIBLIOGRAFIA

1. Ajello, L.P. Grant, Q.V. and Gutzke, A. M. 1951. Use of mineral oil in the maintenance of cultures of fungi pathogenic for humans Am. Med. Assoc. 63, 747-749.
2. Añorve, Hernández Norma. 1986. Incidencia de la candidosis tegumentaria en los padecimientos dermatológicos. Tesis. Tec. laboratorista clínico. IPN (CECYT). México Distrito Federal. 1986.
3. Ballows, A. Hawsler, J. W. 1981. Diagnostic procedures for bacterial, micotic and parasitic infections. American Public Health Association. Estados Unidos Americanos 1075.
4. Bonifaz, A. 1980. Micología médica básica. Fco. Méndez Cervantes. México 302.
5. Brown-Thomsen, J. 1968. Variability in *Candida albicans*. (Robin) Berkhout. I. Studies on morphology and biochemical activity . Hereditas 60, 355-398.
6. Buell, C.B. and Weston, W.H. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungus cultures. Amer. J. Bot. 34, 555-561.
7. Castellani, A. 1963. The "Water cultivation" of pathogenic fungi. J. Trp. Med. an Hyg. 66, 283-384.
8. Conant, N. F. Smith, D.T. Calaway, D. R. 1972. Manual de micología clínica. Nueva Editorial Interamericana México 425.
9. Conant, N. F. Smith, D.T. 1971. Micología. Interamericana. Méx. 3a. ed. 282.

10. Drouhet, E. 1976. Biologie des *Candida*. Rappel mycologique et physiopathologique. Rec. Franc. Allergol. 16. 5, 233-235.
11. Emmons, C. W. Binford, C. H. Utz, J. P. and Kwon-Chung, K. J. 1963. Medical mycology. 3rd. edition. Lea & Febiger Philadelphia. 144.
12. Fitzpatrick, G. H. 1988. Dermatología en la medicina general. Ed. Médica Panamericana. 27, 2482.
13. González, O. A. 1957. Monilias y moniliasis. (Valoración de los diversos recursos para el diagnóstico de la moniliasis). Rev. Inst. Sal. Trops. 17, 13-27.
14. González, O. A. Orozco, C. B. Bravo, M. A. 1964. El papel de las levaduras del género *Candida* como patógeno único, patógeno asociado y saprófito. Rev. Inst. Sal. Enf. Trops. 24, 89-97.
15. González, O.A. Sandoval, M.A. 1956. Levaduras en padecimientos intestinales no tratados con antibióticos. Rev. Inst. Sal. Enf. Trops. 16, 15-19.
16. Gracia, Jover S. y C. Araujo de Pérez. 1967. Viabilidad de los hongos en agua destilada. Rev. Lat-amer. Microbiol. y Parasitol. 9, 59-60.
17. Koneman, W. E. Allen, A.S. Dowell. V.R. Andonmms, M.H., 1983. Diagnóstico microbiológico. Ed. Med. Panamericana. Argentina.
18. López, Martínez R. 1974. Características inmunológicas de Candidosis. Prensa Med. Mex. México Nos. 11-12.
19. López, Martínez R. Macotela Ruiz, E. Capellini, G.E. 1971. Valoración de diferentes reacciones inmunológicas en pacientes de Candidiasis. Medicina cutánea. Científico-Médica. Barcelona. Año V 4, 299-304.

20. McGinnis, R.M. 1980. Laboratory Handbook of medical mycology. Academic Press. London. 560.
21. McGinnis, R. M. Padhye, A. A. and Ajello, L. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. Applied Microbiology. 28 2, 218-222.
22. Miguens, P. M. 1985. Métodos de conservación de cultivos. Mikosen. 28 3, 134-137.
23. MyrVic, P. S. 1977. Bacteriología y micología médicas. Interamericana. México Distrito Federal 465.
24. Odds, F.C. and Merson-Davies, L. A. 1989. Colony variations in *Candida* species. Mycoses. 32 6, 275-283.
25. Odds, F. C. 1979. Candida y candidosis. Leicester University Press. Estados Unidos Americanos 382.
26. Pollack, H. J. Hashimoto, T. 1987. The role of glucose in the pH regulation of germ-tube formation in *Candida albicans* J. General Microbiol. 133, 415-424.
27. Restrepo, M. A. Moncada, F.H. Quintero de Mejía, M. Correa, R. I. Calle, V. G. Candidiasis: La multiplicidad de sus manifestaciones clínicas. Tribuna médica. (Suplemento especial), México 15-23.
28. Rippon, W.J. 1990. Tratado de micología médica. Interamericana McGraw-Hill. 885.
29. Rikkerink, E. H. A. Magee, B. B. P. T. Magee, P. T. 1988. Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 170, 895-899.

30. Silva, H. M. 1969: La Monilia psilosis de Ashford y la *Candida albicans* de hoy. Bol. Asoc. Med. P.R. 61-64.
31. Slustky, B. J. Buffo, D. R. Soll, 1985. High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans* Science, 230, 666-669.
32. Slustky, B. M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller, D. Soll, R. 1987. The "white-opaque transition": a second switching system in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 169, 189-197.
33. Van Gelderen de Komaid A. 1988. Viability of fungal cultures after ten years of storage in sterile distilled water at room temperature. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30, 219-221.