

2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DIAGNOSTICO DE CANDIDIASIS VAGINAL POR
CUANTIFICACION DE IgA SECRETORA
ESPECIFICA; DETERMINADA MEDIANTE LA
TECNICA DE ELISA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
ROSA CABRERA FERNANDEZ
ELSA SANCHEZ SORIA



EO NUMERO 438
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

MARZO DE 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO
L-313 DE INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" U.N.A.M.**

BAJO LA DIRECCION DE:

DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

DR. OSCAR VELASCO CASTREJON

JURADO

PRESIDENTE: DR. OSCAR VELASCO CASTREJON

VOCAL: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

SECRETARIO: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SUPLENTE: BIOL. JUANA DE LA PAZ LOPEZ

SUPLENTE: QFB. ROBERTO C. GONZALEZ M.

DEDICATORIAS

**A MIS PADRES
URIEL Y SUSANA**

Por el cariño y apoyo que siempre me
han brindado en todos los momentos difíciles.

**A MIS HERMANOS
URIEL, ROCIO, ANGELICA E ISAURO**

Por su confianza y comprensión.

A MIS TIOS

Por la confianza que depositaron en mí.

Elsa

A LA MEMORIA DE MI MADRE

Por toda la confianza, amor y comprensión
que me dió en vida.

A MI PADRE

Por darme su apoyo económico
en cualquier circunstancia y momento.

A MIS HERMANOS

Quienes siempre han confiado en mi.

Rosa

A EL DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

Por que en todo momento nos dió su apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

A LOS PROFESORES:

QFB. YOLANDA FLORES CABRERA

MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL

Por brindarnos su ayuda y amistad incondicionalmente.

A NUESTROS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Que compartieron parte de su vida con nosotros.

A NUESTROS PROFESORES

Por dejarnos lo más valioso de ellos, sus conocimientos.

I N D I C E

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	2
MARCO TEORICO	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DELTEMA	33
OBJETIVOS	36
HIPOTESIS	38
DISEÑO DE INVESTIGACION	40
- Tipo de estudio	
- Población	
- Criterios de inclusión	
MATERIAL Y EQUIPO	42
TECNICAS	47
DISEÑO ESTADISTICO	59
RESULTADOS	62
DISCUSION DE RESULTADOS	76
CONCLUSIONES.	79
BIBLIOGRAFIA	82
ANEXO	89

RESUMEN

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE) de la Secretaría de Salud y el Laboratorio de Inmunología de la FES-Zaragoza. Las muestras fueron recolectadas en el Hospital General de la Mujer, de exudados vaginales de mujeres de entre 16 y 50 años de edad, con vida sexual activa, que no hubieran tomado medicamentos una semana antes de tomar la muestra, sin aseo vaginal mínimo de 8 hrs y que presentaran signos y síntomas de infección. A cada una de las pacientes se le tomó un frotis de las paredes vaginales y un lavado de la misma área. El frotis se fijó y se tiñó por la técnica de Gram y el lavado vaginal se empleó en la determinación de IgA secretora específica anti-*Candida albicans* por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

El antígeno de *Candida albicans* fue obtenido a partir de un vial puro proporcionado por el Laboratorio de Inmunología de la FES-Zaragoza, del cual se obtuvo una cepa pura de *Candida albicans*. Posteriormente las colonias fueron cosechadas y sonicadas para obtener el contenido antigénico de la levadura en estudio y realizar la determinación de proteínas por el método de Lowry. Después de saber la concentración de proteínas se hizo la estandarización de la técnica de ELISA empleando tres muestras positivas para *Candida albicans* a diferentes concentraciones, así como diferentes concentraciones del antígeno obteniendo una mejor lectura con 10 microgramos por mililitros del antígeno y la muestra sin diluir.

Después de realizar la tinción al Gram de las muestras en estudio y de obtener el título de IgA secretora específica anti *Candida albicans* para cada una de las muestras; se realizó el análisis estadístico, para el cual se formaron cuatro grupos de acuerdo a los resultados obtenidos en la tinción de Gram, además de tomar en cuenta la presencia de flujo y daño vaginal observados en la toma de muestra. Al correlacionar los resultados obtenidos en la tinción al Gram y los títulos de IgA secretora en ELISA nos damos cuenta de que existe una gran concordancia entre una técnica y otra, ya que el grupo I donde todas las muestras fueron positivas a la tinción al Gram el porcentaje de positividad para la técnica de ELISA fue de un 78.5%, determinándose una no concordancia del 21.5%; esto lo podemos explicar debido a que en una primo infección podemos tener presencia de *Candida albicans* y una respuesta de IgA ausente. En el grupo II donde igualmente todas las muestras fueron positivas a la tinción al Gram, el porcentaje de positividad para ELISA fue de 11.1% y en el grupo III donde todas son negativas a la tinción al Gram, el porcentaje de positividad para ELISA fue de un 64.7%; en base a lo observado podemos decir que el porcentaje de positividad en la técnica de ELISA aumenta cuando aumenta el flujo y daño vaginal, ya que las pacientes del grupo II no presentaron estos signos y las del grupo III si lo manifiestan, esto probablemente se deba a que las células plasmáticas productoras de IgA, presentes en la submucosa, reciban más fácilmente la señal de los antígenos locales (de *Candida albicans*) y la secreción hacia la vagina, de las inmunoglobulinas específicas sea también más fácil en presencia del daño vaginal. El grupo IV fue considerado como testigo ya que todas las muestras fueron negativas a la tinción al Gram, no se presentó flujo ni daño vaginal aunque el porcentaje de positividad fue del 6.5% para la técnica de ELISA, por lo que estas muestras podrían considerarse falsos positivos, es decir personas que tuvieron

una infección por *Candida albicans* reciente ya superada, como una respuesta de memoria o como una infección subclínica.

MARCO TEORICO

MARCO TEORICO

EPIDEMIOLOGIA

Aunque *Candida albicans* da lugar a una de las infecciones más proteiformes que se conocen y puede proliferar, por lo general como invasor secundario, prácticamente en todo sistema del cuerpo humano, uno de los problemas patológicos que más frecuentemente causa es la candidiasis vaginal. La vagina viene a ser, por lo tanto, la fuente más común para el aislamiento de este microorganismo. (7) La colonización vaginal por especie de *Candida*, principalmente *Candida albicans* es muy frecuente y más aún durante el embarazo, ya que casi el 30% de las mujeres embarazadas albergan dichos hongos en la vagina, la mayor parte de las veces sin molestias importantes.(8,9) Los mecanismos por los cuales el embarazo estimula la colonización son complejos. Algunos autores (8,10) atribuyen la alta frecuencia de colonización y altos índices de ataque al incremento de contenido de glucógeno en el epitelio vaginal bajo la estimulación de las hormonas reproductivas. Sin embargo el problema es más complejo que la disponibilidad de una fuente de carbono la cual aumenta el crecimiento, multiplicación, adherencia y germinación de la levadura. Actualmente se ha reportado la presencia de receptores en el citosol de *Candida* para estrógenos y progesterona junto con el efecto estimulador observado de estas hormonas, promueven el crecimiento de *Candida* aumentando su virulencia. No solamente las hormonas están influyendo en el tracto vaginal, el pH, y el contenido de glucógeno, ambos están promoviendo a la levadura y probablemente también a los sitios receptores y de adherencia de las células

individuales del epitelio vaginal.

Durante el embarazo, el porcentaje de portadores de candida en vagina, quienes manifiestan síntomas de abierta vaginitis es también considerablemente alto entre mujeres embarazadas que no embarazadas. En diferentes estudios (8,11) la vaginitis sintomática fue observada de un 30% a 60% de portadoras vaginales embarazadas. De este modo la incidencia de Candidiasis vaginal sintomática es alta en el embarazo y aumenta durante el curso de la gestación.

La Candidiasis vaginal se desarrolla casi en el 10% de mujeres embarazadas durante el primer trimestre. Además, los ataques frecuentes son comunes en casi la mitad de mujeres sintomáticas, sugiriendo un segundo episodio durante el mismo embarazo.

Otro factor importante que influye en la predisposición de Candidiasis vaginal es el uso de anticonceptivos orales, aunque su mecanismo de acción no está bien definido. La mayoría de los estudios epidemiológicos han reportado como mínimo un rango de incremento en la colonización del 20 al 45%. Una vez más, el incremento en los portadores es quizás el resultado de los efectos de las hormonas femeninas o de la adherencia de células epiteliales o de la receptividad, o del glucógeno y sustratos disponibles para el microorganismo así como el efecto directo de los anticonceptivos orales sobre la virulencia de las levaduras.

Los antibióticos también contribuyen en el establecimiento de la candidiasis vaginal, ya que además de cumplir con su objetivo pueden reducir la

protección normal de la población bacteriana residente, particularmente las especies de lactobacilos y disminuyendo la resistencia de la colonización normal. Virtualmente ningún antibiótico está inmune de esta frecuente complicación; si bien los agentes de amplio espectro como son: La tetraciclina, ampicilina y cefalosporina aparecen como causantes comunes.

Hoy en día, los antibióticos son responsables del frecuente incremento de la colonización por *Candida* en mujeres; muchas pacientes notan el aumento de síntomas de candidiasis vaginal durante el curso de la terapia con antimicrobianos. La rapidez con que estos síntomas aparecen después de la administración de antibióticos, sugieren no solamente que los mecanismos de resistencia a la colonización vaginal estén suprimidos, sino posiblemente también que esos antibióticos actualmente estimulen la proliferación de levaduras.(12,13)

Una diabetes mellitus incontrolada acompañada con glucosuria e incremento de concentraciones de glucosa en secreciones vaginales puede propiciar una franca vaginitis sintomática. Algunas mujeres con candidiasis vaginal recurrente atribuyen la recurrencia de ésta a las indiscreciones dietéticas, por ejemplo el abuso en dulces y postres con alto contenido de azúcares, induciendo posiblemente una glucosuria transitoria.

La ropa y los hábitos personales son otro de los factores que contribuyen a la aparición de candidiasis vaginal. Muchas mujeres usan ropa ajustada, generalmente ropa interior y pantimedias de nylon, los cuales provocan una pobre ventilación y un incremento en la temperatura húmeda del perineo, estimulando la proliferación de levaduras. Igualmente, también un traje de baño húmedo puede

originar síntomas; esto es probablemente debido al cloro de las albercas que irritan la mucosa vaginal incrementan la posibilidad de desarrollar una candidiasis vaginal. Muchas mujeres creen que los desodorante en aerosol, el papel de tocador perfumado y las duchas comerciales actúan similarmente para exacerbar los síntomas.(8)

Todos los factores anteriores pueden actuar sensibilizando la mucosa por los mecanismos patogénicos de las levaduras residentes en la vagina e inducir síntomas.

La candidiasis vaginal es considerada una enfermedad de transmisión sexual, ya que en muchos de los casos las pacientes no manifiestan síntomas clínicos, por lo que pueden transmitir la infección a su pareja sexual. Desgraciadamente el tratamiento muchas de la veces no es en pareja, por lo que a pesar de que la infección se erradique en la mujer, el varón sigue actuando como fuente de contagio. Este mal se resuelve con la curación de la vaginitis en la mujer y la balanitis en el hombre en una pareja conyugal.(14)

Candida albicans es quizás uno de los agentes infecciosos más frecuentes que afligen al hombre. Sólo la sífilis presenta gran diversidad de cuadros clínicos como los observados en las diversas candidiasis. Todos los tejidos y sistemas orgánicos están sujetos a invasión y la patología provocada es tan variable como los síntomas clínicos. Además de infección activa, *Candida albicans* esta implicada también en varios trastornos alérgicos.

La candidiasis presenta diferentes cuadros clínicos de acuerdo con su localización en el organismo, como se muestra en el cuadro I.

1. Enfermedades infecciosas.

A. Afección mucocutánea.

1. Bucal: muguet, glositis, estomatitis,
2. Vaginitis y balanitis.
3. Bronquial y pulmonar
4. Alimentaria: esofagitis, gastritis, peritonitis, enfermedad entérica y perianal.
5. Candidiasis mucocutánea crónica

B. Afección cutánea

1. Candidiasis intertriginosa y generalizada
2. Paroniquia y onicomycosis
3. Granuloma por candidiasis

C. Afección generalizada

1. Vías urinarias
2. Endocarditis
3. Meningitis
4. Septicemia
5. Diseminación a otros sistemas orgánicos.

II. Enfermedades alérgicas.

- A. Candidiasis
- B. Eczema
- C. Asma

Cuadro I. Cuadro clínico de candidiasis de acuerdo a su localización en el organismo.

Fuente (Rippon, J.W 1991).

SINTOMATOLOGIA

Una de las frecuencias clínicas de *Candida albicans* es la vaginitis, esta invade conducto vaginal cuando hay una predisposición como las ya antes mencionadas. La vaginitis se caracteriza por la presencia de secreción espesa amarillenta, lechosa y placas de pseudomembranas de color blanco-grisáceo que se observan en la mucosa vaginal. Estas placas con aspecto de leche cuajada son similares en su aspecto a las que se ven en el muguet, que aparece en boca. En la candidiasis esofágica y en la enfermedad bronquial e intestinal, las lesiones varían desde ligera reacción eczematoide con eritema mínimo a un proceso patológico grave con pústulas, escoriaciones y úlceras. En la vaginitis toda el área está muy inflamada y por lo regular el prurito es muy intenso. Se pueden presentar lesiones papulares y rara vez ulcerativas pudiéndose extender el trastorno hasta afectar perineo, vulva y área inguinal completa. El prurito y el dolor en introito y labios menores se puede agravar al orinar, en la relación sexual o en el examen ginecológico. Muchas pacientes presentan los síntomas después de haber tomado un baño caliente. Este estado puede ser imitado, o puede coexistir con vaginitis por *Trichomonas*.(6,16,17)

CARACTERISTICAS.

Candida albicans es una levadura oval que produce pseudomicelio en cultivo en los tejidos y exudados.

En los frotis de exudados, *Candida* aparece como una levadura Gram positiva en gemación que mide 2 a 3 X 4 a 6 micromicras, estas levaduras

parecen células alargadas en gemación semejantes a hifas (seudohifas). En agar Sabouraud incubado a temperatura ambiente, se desarrollan colonias blancas, color cremoso, que tienen olor a levadura. El desarrollo superficial consiste de células ovales en gemación. El desarrollo sumergido esta formado por pseudomicelios, éste esta compuesto de seudohifas que forman blastoesporas y clamidiosporas.(1,18)

DIAGNOSTICO

Examen directo. El exudado de secreciones mucocutáneas se puede examinar directamente, o bien empleando el colorante de Wright o el de Giemsa. La Mezcla bastante característica de los microorganismos en fase de levadura y micelio, permite el diagnóstico rápido de esas infecciones, por ejemplo esputo, secreción vaginal, muestras de orina y heces, presenta más dificultad.

Como *Candida albicans* es una levadura de la flora normal del conducto vaginal el solo hecho de encontrar levaduras en esos materiales no es de importancia diagnóstica. Por lo tanto, unicamente debe examinarse muestras frescas, debido a que *Candida* se multiplica con rapidez en esos medios y con frecuencia se convierten en forma micelial con el tiempo. Esto podría dar origen a una impresión errónea respecto al número de microorganismos presentes y sugerir la posibilidad de colonización establecida.

Cultivos. Para el cultivo es indispensable que sólo se examinen las muestras recién obtenidas. A temperatura ambiente los microorganismos crecen

en forma rápida y pueden dar una falsa impresión acerca del número inicial existente. Puesto que la confirmación del diagnóstico de candidiasis, a menudo depende del recuento de las levaduras, esta precaución es extremadamente importante. Debido a errores inherentes a los métodos del cultivo se deben examinar múltiples muestras. Para *Candida* se recomienda agar Sabouraud con antibiótico antibacteriano a fin de realizar el aislamiento directo.(17,18,19)

Para el diagnóstico de *Candida albicans* una de las pruebas más frecuentemente usadas es la de tubo germinal, ésta prueba se realiza en no más de cuatro horas. Los tubos germinales se presentan como extensiones de las células de las levaduras semejantes a hifas que usualmente se producen sin una constricción en su punto de origen. En años anteriores se había señalado que *Candida stellatoidea* también producía tubo germinal y por ello también debía distinguirse de *Candida albicans*.

La última edición del texto "The Yeasts: A Taxonomic Study" de Kreger-Van Rij(19), indica que *Candida stellatoidea* ya no es considerada una especie y se considera como *Candida albicans*; en consecuencia la prueba de tubo germinal es específico para *Candida albicans*.

Otro método para identificación de *Candida albicans* se basa en la presencia de clamidosporas en agar harina de maíz con 1 por ciento de Tween 80 y Azul tripano incubada a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. Además, el aspecto semejante a una araña es típico de las colonias de *Candida albicans* en agar Eosina azul de metileno.(20)

FUNCION Y ESTRUCTURA DE LA IgA.

Las inmunoglobulinas son un grupo notable de moléculas proteicas efectoras de la rama humoral de la inmunidad; aunque no son simples moléculas que se combinen con antígenos en forma de llave y cerradura. Son proteínas muy complejas con características altamente especializadas, además de su capacidad de combinarse con el antígeno.

Aunque la IgA es la segunda inmunoglobulina sérica más abundante, su contribución a la inmunidad del individuo se halla en el sistema secretor externo. Esta importante inmunoglobulina secretora se produce en concentraciones elevadas por los tejidos linfoides que revisten las vías digestiva, respiratoria y genitourinaria. En estas secreciones (p. ej. saliva, flujo vaginal y lágrimas) la IgA está combinada con una proteína denominada componente secretorio, que facilita su transporte penetrando en las secreciones y brinda a la molécula cierta protección contra los efectos de enzimas proteolíticas que normalmente existen en otras regiones. La molécula de IgA no activa el complemento por vía clásica, pero puede hacerlo por la vía alternativa.

La IgA no cruza la barrera placentaria; sin embargo, contribuye a la inmunidad del recién nacido en virtud de su elevada concentración en el calostro. Hay receptores para IgA en linfocitos, polimorfonucleares y monocitos.(3, 17)

La globulina IgA pueden existir en forma polimérica en el suero. La IgA del suero, como la IgM, pueden polimerizarse por un residuo de sulfhidrilo cerca del

extremo carboxilo de la molécula con participación de la cadena J y el componente secretor (otra globulina no inmunitaria) Para producir un componente de alto peso molecular.

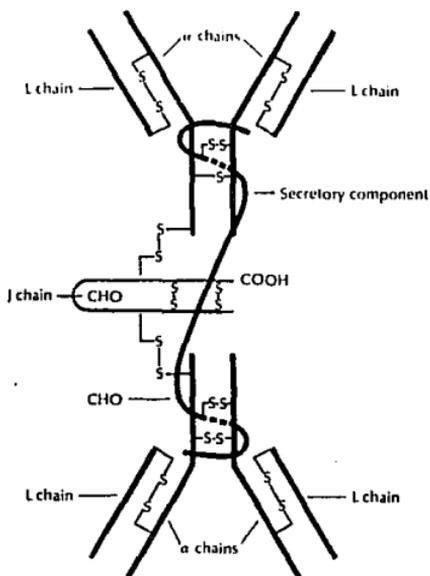


Fig 1. Modelo de la molécula de IgA secretora humana.

Fuente (Klein, J. 1990).

La clasificación de las globulinas IgA en dos subclases, IgA-1 e IgA-2, basandose en diferencias de estructura antigénica y variaciones en la disposición de los enlaces disulfuro entre las cadenas. Al paso de que la IgA-2 es un

componente menor de la IgA sérica, esta subclase es la forma que predomina en las secreciones. Las globulinas IgA son sintetizadas como monómeros dentro de las células plasmáticas, que también sintetizan cadena J, y están en contiguidad con células epiteliales que contienen el componente secretor. Después de atravesar el epitelio, la IgA se recupera como dímero que forma complejo con el componente secretor.

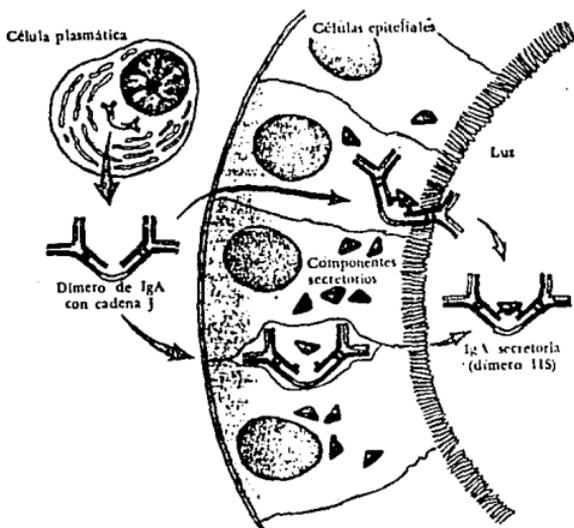


Fig 2. Representación esquemática de la formación de IgA secretora.

Fuente (Bellanli, J.A. 1986).

La IgA secretora tiene actividad de anticuerpo contra diversos agentes infecciosos o sus toxinas y enzimas. El mecanismo exacto mediante el cual la

IgA neutraliza o inactiva aún no se ha aclarado del todo, ya que la IgA no fija complemento , cuando menos por la vía clásica ni se fija células con actividad fagocítica o con actividad citotóxica ; pero al igual que otras inmunoglobulinas es capaz de fijarse específicamente a agentes infecciosos y toxinas, impidiendo que éstos se adhieran a los tejidos susceptibles y de ésta forma impedir la colonización necesaria para establecer el proceso de la enfermedad.(3,17,21)

ELISA (ENSAYO DE INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA).

Tradicionalmente el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se ha llevado a cabo mediante el cultivo, aislamiento e identificación del microorganismo infectante en el cultivo puro, utilizando un sistema in vitro o un animal de laboratorio. Sin embargo hay situaciones en las que el cultivo directo de un microorganismo a partir de una muestra clínica puede ser difícil de lograr lo bastante rápido como para ser útil en el tratamiento del paciente. Además, el cultivo de algunos microorganismos requiere técnicas disponibles solo en laboratorios centrales y/o de referencia. Considerando que, hay microorganismos bacterianos y fúngicos que, si bien pueden aislarse en cultivo puro, requieren períodos prolongados para una identificación exacta. Esto es particularmente cierto para algunas cepas de micobacterias, anaerobios, rickettsias y hongos patógenos.(17)

El ensayo de inmunoabsorbente ligado-enzima "ELISA" ha incrementado su aceptación durante las últimas décadas; es el método de elección en el diagnóstico de numerosos estados de enfermedad, el principio básico de ésta prueba es la combinación del uso de antígeno o anticuerpo inmóviles sobre una fase sólida con un antígeno o anticuerpo conjugado a una enzima.

El enzimoimmunoanálisis es también objetivo y automatizable; los reactivos usados se conservan durante un tiempo muy prolongado. Estas consideraciones, unidas al hecho de que sólo se necesita un equipo sencillo y económico, han llevado al desarrollo reciente de numerosos enzimoimmunoanálisis, muchos de los cuales son especialmente adecuados para su utilización en laboratorios

pequeños y en países en desarrollo.(5)

La idea característica de una prueba de diagnóstico es que sea rápida, sensible, específica, exacta, segura, de reactivos económicos así como de larga vida, potencialmente automatizable y además que tenga amplias aplicaciones. Ni en el radioinmunoanálisis ni en la inmunofluorescencia encontramos todos estos criterios. La búsqueda de un sistema de ensayo en el cual puedan encontrarse estos criterios ha conducido a la investigación de inmunoensayos homogéneos y heterogéneos.(22)

En los análisis homogéneos la enzima se conjuga con un hapteno. Cuando este conjugado reacciona con anticuerpo, se altera la actividad enzimática. Lo característico de este tipo de ensayo es que no requiere separación de combinado libre, pero se halla restringido a sustancias de bajo peso molecular. Los análisis heterogéneos, en los que la separación del reactivo combinado marcado con enzima del reactivo marcado libre, es una etapa esencial. Estos ensayos, generalmente conocidos como análisis por enzimas fijadas a inmunoabsorbentes (ELISA), depende del hecho de que los anticuerpos o el antígeno se pueda ligar a una enzima, reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como enzimática.

En estos ensayos, el antígeno o anticuerpo se adosan usualmente a un soporte de fase sólida para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados. Se ha hallado que antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente al material particulado, tal como celulosa y poliacrilamida, y que también se puede obtener una absorción pasiva satisfactoria a tubos, perlas,

discos o microplacas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno. Una parte esencial del inmunoensayo por enzimas es la conjugación del anticuerpo (o antígeno) fijado a una enzima. Es necesario que la enzima sea capaz de unirse a los inmunorreactivos en forma constante, constituyendo conjugados estables que retengan una elevada proporción de la actividad inmunológica y enzimática original de las moléculas marcadoras. Si bien un gran número de enzimas satisfacen estos requerimientos, hasta ahora la mayoría de los ensayos han utilizado peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y betagalactosidasa como marcador enzimático. Estas enzimas se fijan eficientemente a los inmunorreactivos por varios medios y se detectan en concentraciones de tan solo 10^{-12} moles/litro (aprox. 0.1 mg/ml), mediante instrumentos colorimétricos y en concentraciones un tanto más elevadas a simple vista por medios colorimétricos. La enzima debe degradar al sustrato el cual debe ser estable, además de un producto fácil de medir. Finalmente, las enzimas deben ser relativamente económicas y ser obtenibles en una forma pura.(17)

Todos los enzimoanálisis implican la unión de enzimas con inmunorreactivos. En algunos casos esto se lleva a cabo por enlace covalente directo de las enzimas con las moléculas de inmunoglobulinas. Este enlace covalente puede lograrse por uniones cruzadas de grupos epsilon-amino de residuos de lisina de la enzima y las moléculas de inmunoglobulina mediante reactivos bifuncionales como el glutaraldehído. Además en el caso de las enzimas glucosiladas como la peroxidasa de rábano, el hidrato de carbono puede ser oxidado por agentes oxidantes suaves y el enlace se forma mediante una unión covalente entre los grupos aldehído de la porción hidrocarbonada de la enzima y los grupos amino libres de la inmunoglobulina.

Los métodos de conjugación mencionados pueden utilizarse para generar conjugados estables enzima-inmunoglobulina. Sin embargo, la conjugación directa de la enzima con la inmunoglobulina puede producir un conjugado macromolecular con actividades inmunológica y enzimática disminuidas en comparación con las de las moléculas madres. Esta menor actividad es particularmente problemática en situaciones en las que se forma grandes polímeros, ya que éstos pueden exhibir una actividad disminuida en forma marcada debido al bloqueo estérico de sitios activos dentro del polímero. Muchos de los problemas inherentes a tal conjugación pueden superarse mediante la unión de las inmunoglobulinas con un marcador de bajo peso molecular. La reacción puede luego cuantificarse mediante una posterior reacción de este marcador con la enzima. El uso de un marcador de bajo peso molecular tiene la ventaja de que es improbable que se produzca la polimerización.(5,17,22)

La elección del sustrato es crítica en el enzimoanálisis. Los sustratos deben ser estables y deben ser solubles antes y después de la degradación. Los sustratos cromogénicos deben ser incoloros inicialmente y fuertemente coloreados tras la degradación. Para los conjugados de fosfatasa alcalina, es adecuado el p-nitrofenilfosfato; para los de peroxidasa, la o-fenilendiamina ha probado ser satisfactoria.(5,22)

Las condiciones del sistema de ELISA son las más fáciles de estandarizar de acuerdo con las titulaciones en general realizadas en bloques con los diversos componentes de la prueba para determinar la concentración óptima, de cada uno de los reactivos. Estas concentraciones dependen del tiempo de incubación así

como de la temperatura. Experimentando con los tiempos de incubación uno obtiene razonablemente los rangos de libertad para la estandarización de la prueba tal que ellos pueden ser realizados con un tiempo estructural preseleccionado con los deseados niveles de sensibilidad.(5)

ANALISIS DE ANTICUERPO

METODO INDIRECTO

El método indirecto es ampliamente utilizado para determinación de anticuerpo, ya que se necesita sólo unos pocos conjugados (v. gr. antiglobulinas humanas marcadas con enzimas) para analizar anticuerpos de una variedad de enfermedades. La técnica es la siguiente.

1. Las concavidades de las placas de poliestireno para microhemaglutinación se sensibilizan por *absorción* pasiva con el antígeno pertinente, y luego se lavan.
2. Las muestras a ensayar se incuban en las concavidades y las placas se lavan nuevamente; el anticuerpo presente reacciona con el antígeno inmovilizado en la superficie de las concavidades.
3. El conjugado de antiinmunoglobulina humana marcado con enzima, se incuba en las concavidades; éste reacciona con cualquier anticuerpo "capturado" en el paso 2. El exceso de reactivo se lava.

4. Se añade el sustrato enzimático y las placas se incuban; la velocidad de degradación se indica por el cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpo de la muestra del paso 2.
5. Se detiene la degradación y el color se determina visualmente o en el espectrofotómetro.(Fig.3)

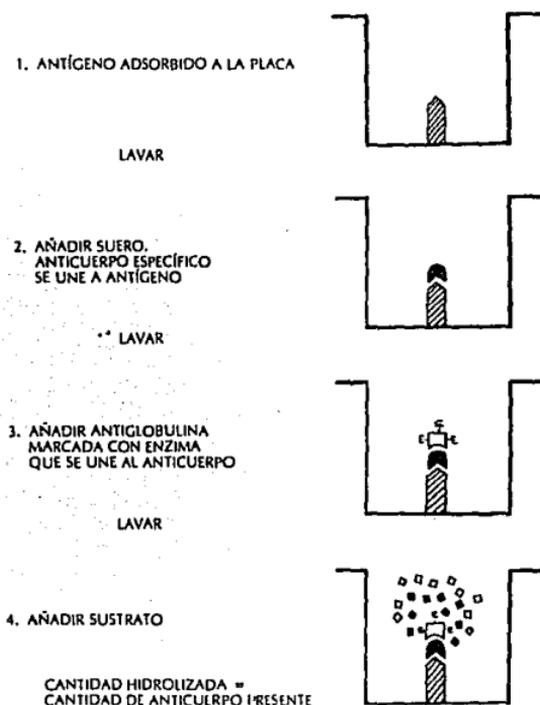


Fig 3. Método indirecto de ELISA en microplacas para detección de anticuerpos.

Fuente (Rose NR, conway de Macario E, 1991).

METODO COMPETITIVO

1. El antígeno se fija a la fase sólida.
2. Un conjugado de anticuerpo específico (o inmunoglobulina que contiene el anticuerpo), ligado a una enzima, se mezcla con la que presuntamente contiene anticuerpo y se incuba con la fase sólida. Tras la incubación se lava la fase sólida.
3. Se añade el sustrato enzimático. La diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado solo y el conjugado más la muestra ensayada, es proporcional a la cantidad de anticuerpo de ésta última.(Fig.4)

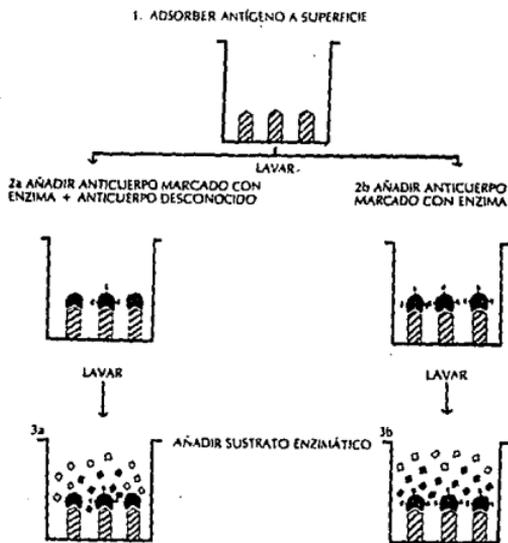


Fig 4. Método competitivo de ELISA en microplacas para detección de anticuerpos.

Fuente (Rose NR, Conway de Macario E. 1991)

ANALISIS DE ANTIGENOS

METODO COMPETITIVO

El método competitivo es análogo a la mayoría de los radioinmunoanálisis.

1. El anticuerpo específico (o inmunoglobulina que contiene anticuerpo específico) se fija a la fase sólida.
2. Un conjugado de antígeno marcado con enzima se mezcla con la muestra que contiene presuntamente antígeno, y la mezcla se incuba con la fase sólida, que luego se lava.
3. Se añade sustrato enzimático. La diferencia entre la degradación del sustrato entre el conjugado solo y el conjugado más la muestra ensayada, es proporcional a la cantidad de antígeno de la misma.(Fig.5)

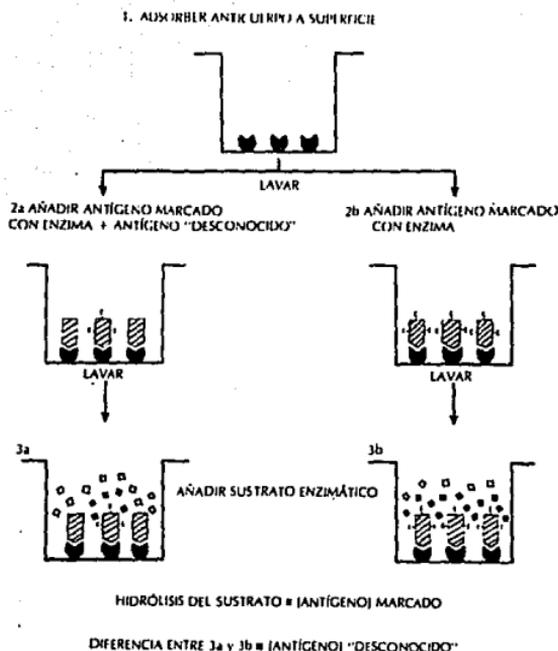


Fig 5. Método competitivo de ELISA en microplacas para análisis de antígenos.

Fuente (Rose NR, Conway de Macario 1991)

METODO "SANDWICH" DE DOBLE ANTICUERPO

1. El anticuerpo específico (o inmunoglobulina que contiene anticuerpo específico) se fija a la fase sólida.
2. La muestra ensayada (que presumiblemente contiene antígeno) se incuba con la fase sólida, que luego se lava.

3. Un conjugado de anticuerpo específico (como en 1, o un anticuerpo que reacciona con un sitio antigénico diferente) unido a una enzima se incuba y luego se lava (en esta etapa se puede utilizar anticuerpo no marcado, seguido de un conjugado de globulina antiespecie marcada con enzima).
4. Se añade sustrato enzimático. La degradación es proporcional a la

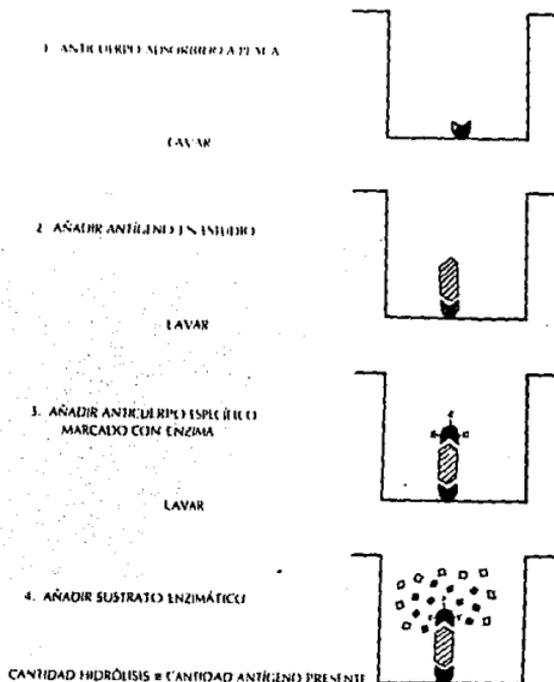


Fig 6. ELISA "sandwich" de doble anticuerpo en microplacas para detección y determinación de antígenos.

Fuente (Rose NR, Conway de Macario 1991).

METODO DE INHIBICION

1. El antígeno de referencia se fija a la fase sólida.
2. Un conjugado de referencia de anticuerpo específico marcado con enzima se mezcla con la muestra que se presume contiene antígeno, y la mezcla se incuba con la fase sólida, que luego se lava.
3. Se añade sustrato enzimático. La diferencia de degradación entre las pruebas con el conjugado de referencia solo y con el conjugado más la muestra ensayada, es proporcional a la cantidad de antígeno de la misma.(23,24)(Fig.7)

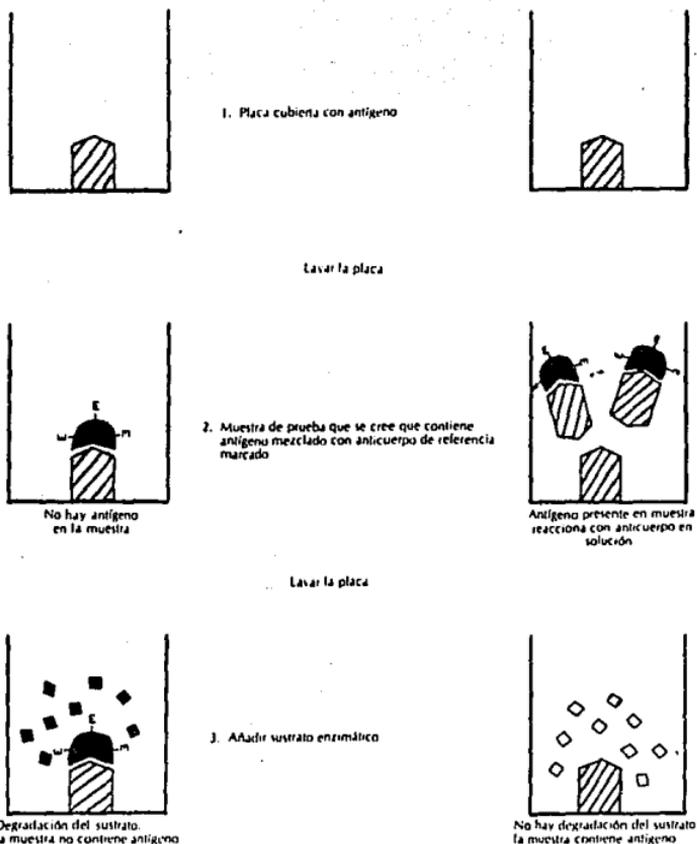


Fig 7. Método de inhibición de ELISA en microplacas para análisis de antígeno. La diferencia de hidrólisis entre el anticuerpo de referencia marcado con la enzima y el conjugado de referencia más la muestra. Es proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra.

Fuente (Rose NR, Conway de Macario 1991).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que *Candida albicans* es el más frecuente e importante de los hongos oportunistas como miembro de la flora normal de piel y mucosas, y muy frecuentemente lo encontramos como contaminante en exudado y otras muestras tomadas de estas áreas, siendo normalmente un hongo no patógeno en mujeres sanas pero que puede mostrarse virulento en personas diabéticas, embarazadas o en mujeres que ingieren anticonceptivos. Esto predispone a que se llegue a establecer una infección localizada en mucosa del aparato genital femenino produciendo así una vulvovaginitis que produce irritación, prurito intenso con secreciones vaginales frecuentes. Esta sintomatología es realmente molesta para las mujeres que la presentan y bien puede pasar que la candidiasis vaginal se confunda con la vaginitis por *Trichomonas*, por lo que se requiere de un estudio de laboratorio para su diferenciación. (6)

Tomando en cuenta lo anterior, se considera importante identificar al posible agente infeccioso para poder dar un tratamiento adecuado y no causar más daño a la mucosa vaginal.

Un prueba alternativa para el diagnóstico de *Candida albicans* es el análisis por enzimas ligadas a inmunoabsorbentes, conocida generalmente como prueba de ELISA. Este método es muy competitivo e incluye estabilidad de los reactivos, seguridad, una alta sensibilidad y facilidad de realización, pudiendose manejar un número mayor de muestras con volúmenes pequeños.

**FUNDAMENTACION DE LA ELECCION
DEL TEMA**

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Los hongos más comunes que infectan al hombre son los llamados oportunistas que normalmente son no patógenos en el hombre sano pero pueden mostrarse como virulentos en otros individuos.

La especie de *Candida albicans* está frecuentemente presente como miembro de la flora normal de boca, garganta, intestino grueso, conducto vaginal y piel, aunque es común encontrarlo en personas cuyas inmunodefensas están suprimidas por la enfermedad o por los efectos secundarios de las drogas usadas para su tratamiento, los que reciben terapia inmunosupresora o bien los que se encuentran en otras situaciones clínicas, por ejemplo con diabetes o empleando antibióticos de amplio espectro. Este microorganismo de la flora normal puede invadir los tejidos más profundos produciendo severas infecciones que ponen en peligro la vida. (1)

En infecciones vaginales se produce una elevación de anticuerpos de tipo IgA secretor que son específicos para el agente etiológico que esta causando daño en dicha zona.(2,3) Un método inmunoenzimático por el cual se puede cuantificar la presencia de estos anticuerpos es el método de ELISA, que en las últimas décadas ha tenido una gran aplicación en el diagnóstico de diferentes enfermedades.(4)

En la actualidad tanto en los laboratorios de instituciones gubernamentales como en los de la iniciativa privada, la identificación de *Candida albicans* se

realiza por métodos microbiológicos como son los medios de cultivo, los cuales requieren de tres a cinco días para su identificación; otro de ellos es la técnica de tubo germinal que para su realización se requiere de suero humano.

La técnica de ELISA nos ofrece ventajas sobre los métodos microbiológicos, ya que una vez estandarizada se puede trabajar con un número mayor de muestras, ocupando volúmenes pequeños de éstas; además de que el tiempo de su realización es en no más de cinco horas y el costo de los reactivos y del equipo utilizado no es alto, este método resulta a largo plazo relativamente económico puesto que se realiza un mayor número de determinaciones y los reactivos se conservan estables durante períodos más largos.

Por todo lo antes mencionado, se espera con este trabajo aportar una técnica alternativa más específica y con una alta sensibilidad en el diagnóstico de *Candida albicans*. (4,5)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.- Obtención del antígeno de *Candida albicans* a partir de un cultivo puro.
- 2.- Estandarización del método de ELISA para determinar anticuerpos de tipo IgA secretor anti-*Candida albicans*.
- 3.- Correlacionar los resultados del examen de microscopía (tinción de Gram) con el método de ELISA.

HIPOTESIS

H I P O T E S I S

La presencia de *Candida albicans* en vagina debe inducir una respuesta inmune local, presentandose títulos elevados de anticuerpos de tipo IgA secretor cuando más severa sea la infección.

DISEÑO DE INVESTIGACION

DISEÑO DE INVESTIGACION

Tipo de estudio: Observacional
Prospectivo
Transversal
Comparativo

Población: Mujeres de entre 16 y 50 años de edad con vida sexual activa.

Criterios de Inclusión:

No tomar medicamento una semana antes de realizarles el exudado vaginal.

Presentar síntomas y signos de infección.

No tener aseo mínimo de 8 horas del area para la toma de muestra.

MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de fluido vaginal

Conjugado Anti-IgA Peroxidasa de rábano de Cappel Labs, Westchester ,Pa.
U.S.A.

Antígeno protéico de *Candida albicans*

Albumina sérica bovina

REACTIVOS

ESPECIFICACIONES

Colorante para Gram

Monterrey

Cloruro de Sodio.

Monterrey

Cloruro de Potasio.

Merck.

Hidroxido de Sodio.

Monterrey.

Acido sulfúrico.

Merck.

Acido cítrico.

Merck.

Formaldehído.

J.T. Baker.

Sulfato de Cobre.

J.T. Baker.

Carbonato de sodio anhidro.

J.T Baker

Tartrato de sodio y potasio.

J.T. Baker

Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Sigma.

Fosfato de potasio monobásico.

J.T. Baker.

Fosfato de sodio monobásico anhidro.

J.T. Baker.

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado.	J.T. Baker.
Peróxido de Hidrógeno.	Monterrey.
Polisorbato tween 20.	Sigma.
Ortofenilendiamina.	Sigma

MATERIAL

Espejos vaginales metálicos	
Espátula de acero inoxidable	
Cajas de Petri de 10 cm. de diámetro.	Coming y Pyrex.
Tubos de ensaye de 13X100, 12X75 y 18X150 mm	Pyrex
Tapones de hule para tubos de 13X100	
Pipetas pasteur	
Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.	Pyrex.
Matraz balón de 500 ml.	Pyrex.
Refrigerante.	Pyrex.
Cabeza de destilación.	Pyrex.
Colector.	Pyrex.
Placas de microtitulación de 12.7X9.5 cm.	Cooke.
Pisetas de 500 ml.	
Vasos de precipitado de 100, 250 y 500 ml.	Pyrex.
Bulbos de plástico para pipetas pasteur	
Portaobjetos de 75X25 mm. Profesional.	
Celda para espectrofotómetro.	B & L.
Tijeras	
Soporte universal	

Tripié metálico

Pinzas de tres dedos

Gradilla de 20 y 36 tubos.

Tela de asbesto.

Papel parafilm

Papel aluminio

Algodón

Aplicadores de madera

Mechero bunsen

Mechero Fischer.

Asas bacteriológicas.

Puntas para pipeta automática.

Scientific Products.

EQUIPO

Termómetro

Balanza granataría.

Balanza analítica.

Incubadora.

Olla de presión de 10 litros.

Microscopio óptico.

Baño de agua con temperatura controlada.

Agitador vortex.

Agitador magnético.

Parrilla de agitación.

Refrigerador.

-10 a 200 C.

Ohaus.

Mettler. H80.

Riossa,EC

Presto.

Carl-Zeiss

Precision.

Genie.

Phillips 127-VCA

Espectrofotómetro.

Lector de ELISA

Estufa de incubación

Sonicador

Micropipetas de 25 y 50 microlitros

Pipetas automáticas de graduación variable .

B & L, Spectronic 20

Dynatech R 250

Mapsa.

Cook.

Brad Germany.

T E C N I C A S

TECNICAS

RECOLECCION DE MUESTRAS

Las muestras se tomaron de exudado vaginal, por lo que se indicó a la paciente se presentara sin aseo mínimo de 8 horas. Para tomar la muestra se utilizó un espejo vaginal previamente esterilizado, el cual fue introducido en la vagina de la paciente y una vez abierto se le hizo un raspado con un hisopo estéril por las paredes vaginales y se realizó un frotis para tinción de Gram. Enseguida se tomó una pipeta pasteur estéril con bulbo y se depositaron 2 mililitros de una solución amortiguadora de Fosfatos (PBS) estéril en la vagina de la paciente; se dejó actuar cinco segundos y se recogió el lavado depositandolo en un tubo de ensaye con tapón también estéril. Posteriormente se guardo en el refrigerador a menos 20 grados centígrados hasta reunir 180 muestras de pacientes entre 16 y 50 años de edad, con vida sexual activa, que no hubieran ingerido medicamento una semana antes de tomarles el exudado vaginal y que mostraban síntomas y signos de infección; que se presentaron al laboratorio del Hospital General de la Mujer con la solicitud del médico para realizárlas un análisis de exudado vaginal.

Todos los tubos y frotis recolectados fueron perfectamente etiquetados con una clave que correspondía a el nombre, edad, y número de expediente de la paciete a quien se le realizó el estudio.

Una vez obtenidas las 180 muestras de exudado vaginal se realizó la

determinación de anticuerpos de tipo IgA secretora anti *Candida albicans* por el método de ELISA.

Se formaron cuatro grupos de acuerdo a la tinción al Gram para *Candida albicans* tomando en cuenta la presencia de flujo y daño vaginal.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UNA CEPA PURA DE CANDIDA ALBICANS.

La cepa de *Candida albicans* se obtuvo a partir de un vial puro proporcionado por el Laboratorio de Inmunología de la FES-Zaragoza del cual se tomó una asada y se pasó un tubo con Caldo Tioglicolato en condiciones estériles, se agitó y se sembró en dos placas con agar Sabouraud por estria cruzada para su aislamiento. Se incubó durante 72 horas. Una vez obtenido el crecimiento se observaron las características del cultivo, se realizaron frotis de las colonias aisladas y se tiñeron por el método de Gram, para observar la morfología microscópica. Posteriormente se tomó una asada de dos a cinco colonias previamente identificadas como *Candida albicans* y en seguida se sembró en un tubo de ensayo de 13 X 100 que contenía 3 mililitros de suero humano, se incubó durante 3 horas a 37 grados centígrados y pasado ese tiempo se observó al microscopio la producción de tubo germinal que es una de las características de *Candida albicans*

TINCION DE GRAM

La coloración de Gram es un método arbitrario que incluye cuatro etapas:

1) Coloración primaria con cristal violeta, que suele contener un mordiente como oxalato de amoníaco; 2) Aplicación de solución yodurada diluida de lugol (1:15); 3) Decoloración, casi siempre con alcohol etílico de 95 por 100 y 4) Coloración de contraste con otro colorante, generalmente Safranina. Tiñendo bacterias con este método se pueden separar en dos grupos: Las gram positivas, que conservan el colorante primario y presentan color violeta oscuro, las gram negativas que se decoloran y quedan ligeramente teñidas por la coloración de contraste rosada en caso de Safranina.(18,20)

COLORACION DE GRAM (MODIFICACION DE HUCKER).(18)

1. Se preparó un extendido delgado del material en estudio, se secó y se fijó a flama directa.
2. Se cubrió el preparado con el violeta cristal y se dejó en contacto durante 10 segundos.
3. Se escurrió el colorante y se lavó con solución de yodo.
4. Se escurrió con la solución de yodo y se dejó actuar como mordiente durante 10 segundos.
5. Se lavó con agua corriente, sacudiendo el exceso.

6. Se decoloró con alcohol-acetona o alcohol al 95%, hasta no extraer más colorante. Usualmente esto demora unos 10 a 20 segundos dependiendo del espesor del extendido.
7. Se coloreó con Safranina durante 10 segundos, luego se lavó con agua.
8. Se secó dejando escurrir el exceso de agua y se examinó con el objetivo para inmersión.

EXTRACCION DEL ANTIGENO DE CANDIDA ALBICANS

Se han obtenido diversos antígenos de *Candida albicans* las cuales se subdividen en dos tipos a y b, los que cruzan antigénicamente con las otras especies de *Candida* y excepcionalmente con *T. glabrata* y especies de *Salmonella*.

El antígeno principal de *Candida albicans*, es un polisacarido de N-acetil glucosamina el cual es empleado en intradermorreacción (candidina) con varios fines.(4)

PROCEDIMIENTO

Con una cepa pura de *Candida albicans* obtenida de un cultivo puro se realizaron sembrados masivos en 6 cajas con agar Sabouraud y se incubaron a

37 grados centígrados por 48 horas. Una vez obtenido el crecimiento se hizo lo siguiente:

1. Se adicionó formalina al 0.6 % en las cajas sembradas con *Candida albicans* para cosechar las colonias.
2. Se colocó la cosecha en un tubo de ensayo de 13 X 100.
3. Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm. por 30 minutos.
4. Se decantó el líquido sobrenadante.
5. Resuspendiendo las células sedimentadas con formalina al 0.6%.
6. Se centrifugó a 3500 rpm. durante 30 minutos y se desechó el sobrenadante.
7. Se resuspendió el precipitado con formalina al 0.6 % y se dejó reposar durante 48 horas, recolectando el contenido de todos los tubos en un vaso de precipitado de 100 ml. limpio.

SONICACION DEL ANTIGENO PROTEICO

Se resuspendió por agitación lenta el contenido del vaso de precipitado obtenido 48 horas antes en la extracción del antígeno, colocándolo en un baño de hielo y se sometió a sonicación durante 10 minutos efectivos con intervalos de 30

segundo de descanso por minuto, durante los cuales se realiza un cambio del baño de hielo si es necesario.(4,27)

Una vez obtenida la fracción de antígeno somático soluble de *Candida albicans* se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.(25)

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

El cobre en solución alcalina forma un complejo de color azul con las proteínas el cual absorbe a 600 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas presentes.

Se realizó una curva patrón colocando una serie de 10 tubos con solución de Ovoalbumina en concentraciones de 25, 50, 100... hasta 250 microgramos por mililitro. (A partir de una solución de 250 microgramos por mililitro en agua destilada). El blanco se hizo con un mililitro de agua destilada. En otro tubo se colocó un mililitro de la muestra problema.

A todos los tubos se les agregaron 3 mililitros del reactivo de Lowry (preparado al momento). Se agitaron y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 0.1-mililitro del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, agitando ocasionalmente. Se tomo la lectura en un espectrofotómetro a 600 nm.(25)

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA

1. Se colocaron en una gradilla 8 tubos los cuales fueron etiquetados de la A a la H, en el tubo A se depositaron 0.3 ml. de antígeno más 3.075 ml. del amortiguador de recubrimiento, obteniéndose una concentración del antígeno de 10 microgramos por mililitro.
2. En los tubos del B al G se colocó 1.5 ml. de amortiguador de carbonatos y se realizaron diluciones al doble tomado con una pipeta 1.5 ml. del tubo A y vertiendolos al tubo B, así sucesivamente hasta el tubo G; éste tubo quedó finalmente con un volumen de 3 ml., mientras que el tubo H solo quedó con 1.5 ml. de buffer de carbonatos. Fue importante mezclar perfectamente bien todos los tubos de las diluciones.
3. Se adicionaron en los pozos de la fila H de la placa de microtitulación 100 microlitros del tubo H, se realizó lo mismo con el resto de los tubos G, F y por último el tubo A.
4. Se dejaron en cámara húmeda las placas de microtitulación durante 18 horas a 4 grados centígrados.
5. Se desechó el sobrenadante y se bloqueó con 300 microlitros de PBS-Albúmina sérica bovina al 1.0 % cada uno de los pozos. Se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6. El sobrenadante se desechó y se lavó 5 veces con PBS-Tween dejando actuar por un minuto la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante.
7. Se escogieron tres muestras positivas de *Candida albicans*. En la hilera 1 de la placa de microtitulación se adicionaron 100 microlitros de la muestra número 1 sin diluir, en la hilera 2 se adicionaron 50 microlitros de la misma muestra y 50 microlitros de la solución buffer de fosfatos, obteniendo una dilución de (1:2), en la hilera 3 se adicionó 25 microlitros nuevamente de la misma muestra y 75 microlitros de solución buffer de fosfatos, obteniendo una dilución (1:4). Se realizaron las mismas diluciones para las dos muestras restantes en las otras tres hileras por cada una es decir, 6 hileras más, utilizandose en total 9 hileras de la placa para las 3 muestras. A las hileras del 10 al 12 se les adicionó únicamente 100 microlitros por pozo de la solución buffer de fosfatos.
8. La placa de microtitulación se dejó 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
9. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween igual que en el paso 6.
10. Se realizó la dilución 1:1000 del conjugado anti-IgA con PBS (previamente titulada).
11. Se adicionaron 100 microlitros del conjugado anti-IgA a todos los pozos

de la placa y se dejó reposar durante una hora y media a 37 grados centígrados en cámara húmeda.

12. La placa se lavó cinco veces con PBS-Tween igual que en el paso 6.
13. Se preparó el sustrato de Peroxidasa y se adicionaron 100 microlitros a cada pozo.
14. La placa se incubó durante 15 minutos a 37 grados centígrados en cámara húmeda.
15. Por último la placa fue leída inmediatamente después a una densidad óptica de 492 nm. en el lector para ELISA.

METODO DE ELISA PARA LA CUANTIFICACION DE IgA SECRETORA EN MUESTRAS DE EXUDADO VAGINAL

1. Una vez realizada la estandarización de la técnica de ELISA se seleccionó la concentración más adecuada de antígeno y anticuerpo que dió mejor lectura.
2. Antes de hacer la determinación de ELISA de las muestras de exudado vaginal fueron descongeladas en un baño de agua a 37 grados centígrados y centrifugadas a 3500 rpm. durante cinco minutos.
3. Se utilizaron dos placas de microtitulación y se adicionaron 100

microlitros en cada uno de los pozos de una concentración de 10 microgramos por mililitro de antígeno de *Candida albicans*.

4. Las placas se dejaron en cámara húmeda durante 18 horas a 4 grados centígrados.
5. Se desechó el sobrenadante y se bloqueó cada uno de los pozos con 300 microlitros de PBS-Albumina sérica bovina al 1.0 % durante 30 minutos.
6. El sobrenadante se desechó y se lavó cinco veces con PBS-Tween, dejando actuar un minuto la solución de lavado antes de tirar el sobrenadante.
7. Se adicionaron 100 microlitros de cada una de las muestras por pozo de la hilera A a la H dejando el último pozo de ésta hilera sin muestra solamente con PBS.
8. Las placas de microtitulación se dejaron 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
9. El sobrenadante se desechó y se lavó cinco veces con PBS-Tween igual que en el paso número 6.
10. Se realizó una dilución 1:1000 del conjugado anti-IgA con PBS y se adicionaron 100 microlitros de éste a todos los pozos.

11. Las placas se dejaron reposar durante una hora y media a 37 grados centígrados en cámara húmeda.
12. Posteriormente se lavaron cinco veces con PBS-Tween al igual que en el paso número 6.
13. Se preparó el sustrato de peroxidasa y se adicionaron 100 microlitros a cada pozo de las dos placas.
14. Las placas se incubaron durante 15 minutos a 37 grados centígrados en cámara húmeda.
15. Por último las placas fueron leídas inmediatamente después a una densidad óptica de 492 nm. en el lector de ELISA.

DISEÑO ESTADÍSTICO

DISEÑO ESTADÍSTICO

El criterio de positividad para la IgA específica anti-*Candida albicans* determinado por el método de ELISA se estableció mediante un primer corte. Este se realizó tomando las lecturas de ELISA de los grupos I y II de acuerdo a los resultados en la tinción al Gram considerandolos como positivos y a los grupos III y IV como negativos. Empleando la siguiente fórmula:

$$0.5 (\bar{n} + P)$$

Donde:

\bar{n} = La media de los resultados negativos.

P = La media de los resultados positivos.

De tal manera que aquel valor mayor o igual que el valor del corte fueron los positivos fuertes de todos los grupos.

Con el valor del corte anterior se recalculó nuevamente la media de los positivos fuertes de los cuatro grupos y la media de los negativos considerandose unicamente los valores del grupo IV (grupo control), y se aplicó nuevamente la fórmula anterior.

En el grupo IV (grupo control) todos los valores mayores o iguales a el valor del corte anterior fueron los falsos positivos, por lo que se eliminaron.

En seguida se volvió a recalcular la media del grupo control descartando los falsos positivos y finalmente a esta media se le sumaron dos desviaciones estandar de la misma.

$$X_c + 2DS(X_c)$$

Donde:

X_c = Media del grupo control (grupo IV)

$DS(X_c)$ = Desviación estandar de la media del grupo control

Obteniéndose un valor de corte final de tal manera que las lecturas de ELISA mayores o iguales al valor de corte se consideraron positivas y las lecturas menores fueron negativas en la determinación de anticuerpos específico anti-*Candida albicans* .(29)

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que el método de los momentos es aplicable a los problemas de valores en la frontera de la ecuación de Laplace en el caso de un dominio simplemente conexo.

El método de los momentos es aplicable a los problemas de valores en la frontera de la ecuación de Laplace en el caso de un dominio simplemente conexo.

RESULTADOS

Se ha demostrado que el método de los momentos es aplicable a los problemas de valores en la frontera de la ecuación de Laplace en el caso de un dominio simplemente conexo.

Se ha demostrado que el método de los momentos es aplicable a los problemas de valores en la frontera de la ecuación de Laplace en el caso de un dominio simplemente conexo.

RESULTADOS

Se procesaron un total de 180 muestras de pacientes sintomáticas y asintomáticas de la consulta externa , del Departamento de Ginecología , del Hospital General de la Mujer, SS.

Se obtuvo el antígeno de *Candida albicans* mediante la técnica de sonicación apartir de un cultivo puro.

A cada una de las pacientes se les tomó un frotis para observación en fresco y la tinción al Gram además de un lavado vaginal para la técnica de ELISA.

Se formaron 4 grupos de acuerdo a la tinción al Gram para *Candida albicans*, tomando en cuenta presencia de flujo y daño vaginal aparente. (Cuadro II)

En la fig.8 del total de pacientes que acudieron al Servicio de Ginecología del Hospital General de la Mujer SS. Observamos que el grupo I representa un porcentaje del 8.139%, mientras que el grupo II el 10.46% , el grupo III tiene un porcentaje del 9.88% y el grupo IV que fué considerado testigo del estudio nos representa el 71.5%.

Como se puede observar en el cuadro III, el grupo I de 14 muestras positivas a la tinción al Gram 11 resultaron positivas a la técnica de ELISA lo que nos da un porcentaje de 78.5% de positividad. Para el grupo II con escasas

levaduras , en la tinción al Gram y ausencia de flujo y daño vaginal, de un total de 18 muestras resultaron 2 positivas lo cual nos da un porcentaje de 11.1 % de positividad. Para el grupo III donde no se observan levaduras en la tinción al Gram ; pero hay presencia de flujo y daño vaginal , tenemos que de 17 muestras 11 resultaron positivas a la técnica de ELISA específica, lo cual nos da un porcentaje del 64.7% de positividad. para el grupo testigo, grupo IV donde no tenemos levaduras en la tinción al Gram y no hay presencia de flujo ni daño vaginal , de 123 muestras 8 resultaron positivas lo que nos da un porcentaje del 6.5% de positividad.

El cuadro IV nos representa el valor de las medias de absorbancias para la prueba de ELISA.

De acuerdo al análisis estadístico realizado las muestras con valores de absorbancia mayor o igual a 0.647 fueron positivas y las muestras menores al mismo número fueron negativas.

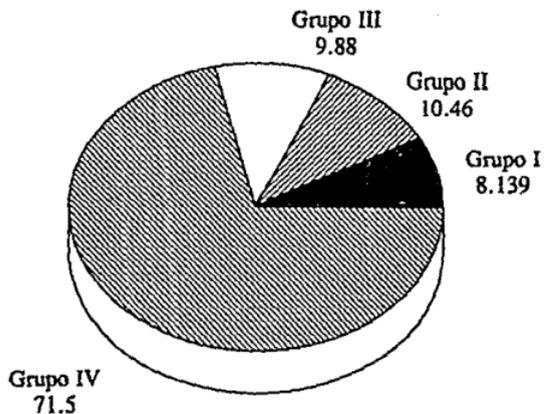
HOSPITAL GENERAL DE LA MUJER,SS.

SERVICIO DE GINECOLOGIA.

- GRUPOS DE PACIENTES EN ESTUDIO PARA EL DIANOSTICO DE Candida albicans.
- GRUPO I.-SE OBSERVAN EN LA TINCION DE GRAM ABUNDANTES LEVADURAS Y HAY PRESENCIA DE FLUJO Y DAÑO VAGINAL.
- GRUPO II.- SE OBSERVAN ESCASAS LEVADURAS EN LA TINCION DE GRAM Y NO HAY PRESENCIA DE FLUJO NI DAÑO VAGINAL.
- GRUPO III.- NO SE OBSERVAN LEVADURAS EN LA TINCION DE GRAM PERO LAS MUESTRAS SON SOSPECHOSASS PUES HAY PRESENCIA DE FLUJO Y DAÑO VAGINAL.
- GRUPO IV.- NO SE OBSERVAN LEVADURAS EN LA TINCION DE GRAM NO HAY LESION APARENTE NI PRESENCIA DE FLUJO.

- Cuadro II

GRUPOS DE PACIENTES. PORCENTAJES DE CADA GRUPO.



Hospital General de la Mujer.
Servicio de Ginecología.

Figura 8 Diagnóstico de *Candida albicans*
por la tinción al Gram.

GRUPOS	NUMERO DE MUESTRAS	TINCIÓN AL GRAM	METODO DE ELISA	
			proporción	porcentaje
I	14	14/14	11/14	78.5%
II	18	18/18	2/18	11.1%
III	17	0/17	11/17	64.7%
IV	123	0/123	8/123	6.5%

Cuadro III.- Resultados de los diferentes grupos a la tinción al Gram y a la técnica de ELISA específica anti-*Candida albicans*

Grupos	Tinción al Gram	Medias del valor de absorbancias por la prueba de ELISA.
Grupo I	Abundantes levaduras	X= 0.945 DS=0.389 n=14
Grupo II	Escasas levaduras	X=0.256 DS=0.289 n=18
Grupo III	No se observan levaduras; pero son sospechosas por la presencia de flujo.	X=0.845 DS= 0.480 n=17
Grupo IV	Negativas a la tinción de Gram sin lesión aparente ni flujo vaginal.	X=0.427 DS=0.466 n=123

Cuadro IV. En la técnica de ELISA se determinó IgA secretora específica anti- *Candida albicans*.

DIAGNOSTICO DE *Candida albicans*. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD.

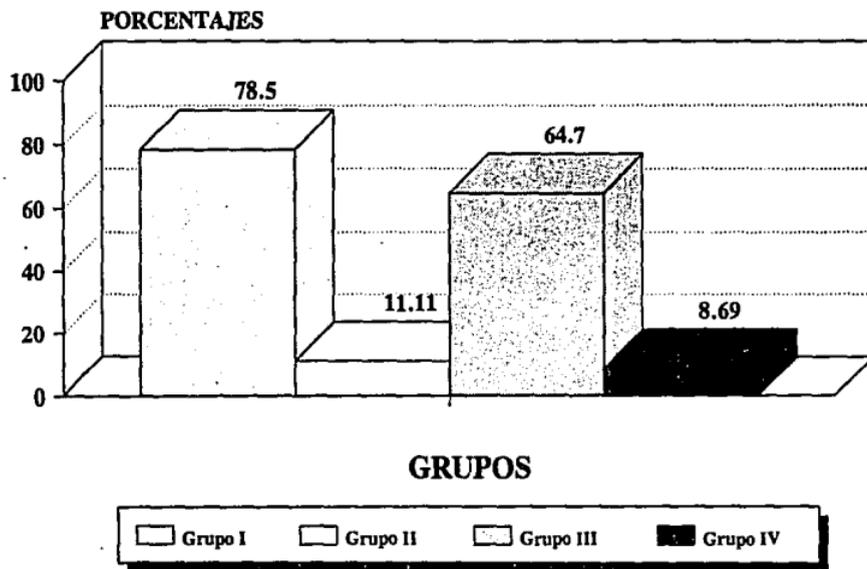


fig 9 .IgA específica medida por ELISA.

CUADRO V. Título de IgA secretora específica anti-*Candida albicans* cuantificados por ELISA.

GRUPO I

No. MUESTRA.	ABSORBANCIA
30	1.270
32	1.251
36	1.263
44	0.628
47	1.245
62	1.100
67	1.297
94	0.675
100	0.022
130	0.410
132	1.109
133	0.902
134	0.787
174	1.215

GRUPO II

No. MUESTRA	ABSORBANCIA
7	0.618
12	0.292
19	1.205
22	0
28	0.906
37	0.266
45	0.223
64	0.071
75	0.265
81	0.180
84	0.428
95	0.339
99	0
131	0.019
136	0.081
160	0.021
173	0.808
177	0.041

GRUPO III

No. MUESTRA	ABSORBANCIA
125	0
129	0.062
142	1.193
144	1.290
158	0.103
164	0.328
165	0.579
169	1.227
85	0.516
93	1.226
120	1.003
114	1.087
69	1.273
61	1.305
58	1.194
91	1.233
50	0.760

GRUPO IV

No. MUESTRA	ABSORBANCIA
65	0.264
17	0.480
21	0
23	0.027
26	0
33	0.185
34	0.031
43	0
56	0.030
59	0
63	0.216
68	0.070
70	0.261
73	0.073
77	0
86	0.201
88	0
104	0.070
105	0
109	0.029
111	0.027
121	0.072
122	0.034
123	1.261

GRUPO IV

No. MUESTRA	ABSORBANCIA
124	0.030
128	0.307
117	0.079
118	0.751
137	0.139
138	0
139	0
140	0.312
147	0.467
148	0.216
151	0.014
155	0.017
38	0
40	0.481
41	0.772
48	0.211
25	0.480
46	0.526
39	0.289
2	0
55	0.662
102	0.024
8	0.038
162	0.059

GRUPO IV

No. MUESTRA	ABSORBANCIA
159	0.126
14	0.659
15	0.215
20	0.079
57	0.408
55	0.243
49	0.153
52	0.470
76	0.045
78	0
96	0.017
83	0.562
87	0
82	0.312
89	0.259
72	0.140
112	0
106	0.087
110	0.440
108	0.252
116	0.647
107	0
98	0.044
152	0.734

GRUPO IV

No. MUESTRA	ABSORBANCIA
170	0.015
143	0.004
149	0.195
166	0.502
127	0
182	0.028
167	0.269
153	0
126	0.414
181	0.345
161	0.294
141	0.660
150	0
145	0.302
176	0.013
175	0.811
179	0.379
180	0
163	0.006
157	0.113

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION.

Los resultados observados en el grupo I, donde se presentan abundantes levaduras , presencia de flujo y daño vaginal, en relación a la técnica de ELISA y la tinción al Gram. Observamos un 78.5% de concordancia entre éstas dos técnicas. El 21.5% de no concordancia lo podemos explicar en función de que la IgA es una respuesta de tipo terciario , por lo tanto en una primo infección, podemos tener presencia de *Candida albicans* en vagina y una respuesta de IgA ausente. Por otra parte, pudiera tratarse de levaduras diferentes a *Candida albicans*, las que se observan en la tinción al Gram y no detectarse por el ensayo de ELISA específico para *Candida albicans*.

En el grupo II en donde tenemos la presencia de levaduras escasas, sin flujo ni daño vaginal tenemos una positividad de 11.1%, mientras que si observamos al grupo III en donde no detectamos levaduras por la tinción al Gram ; pero tenemos presencia de flujo y daño vaginal el porcentaje de positividad es del 64.7%. En base a lo observado, podemos decir que el porcentaje de positividad en la técnica de ELISA se aumenta cuando aumenta el flujo y el daño vaginal, ésto probablemente se deba a que las células plasmáticas productoras de IgA , presentes en la submucosa ,reciban más facilmente la señal de los antígenos locales (de *Candida albicans*) y la secreción hacia la vagina, de las inmunoglobulinas específicas sea también mas facil, en presencia del daño vaginal.

En el grupo IV que, es considerado como testigo, observamos un porcentaje de positividad del 6.5% lo cual podríamos considerar como falsos positivos, como personas que tuvieron una infección por *Candida albicans* reciente ya superada, o bién como una respuesta de memoria.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvo una concentración óptima del antígeno de *Candida albicans* por el método de sonicación, siendo muy parecido a el reportado en la bibliografía revisada.
- 2.- En la estandarización de la técnica de ELISA se emplearon diferentes concentraciones del antígeno y diferentes concentraciones de la muestra, dando mejores lecturas con 10 microgramos por mililitro del antígeno y la muestra sin diluir.
- 3.- Los tiempos de incubación en el método de ELISA de dos horas a media hora empleando la incubadora a 37 grados centígrados e introduciendo recipientes pequeños con agua junto con las placas de microtitulación para ELISA.
- 4.- La tinción de Gram se utilizó para la identificar levaduras, que en el caso de este estudio la que más comunmente se encuentra es *Candida albicans*, ya que otras especies de *Candida* son poco frecuentes de infectar vagina. El método utilizado para identificar *Candida albicans* es el de tubo germinal, que nos revela la presencia de ésta sin importar la cantidad de la misma y es muy probable que se encuentre *Candida albicans* en vagina como parte de la flora normal; sin embargo, para que se observen levaduras en una tinción al Gram debe de existir una

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

colonización abundante lo que nos puede advertir de un posible daño en el area infectada,permitiendo que las células inmunocompetentes locales se pongan en contacto con los antígenos homologos y se manifieste una elevación en los títulos de anticuerpos específicos anti-*Candida albicans* .

- 5.- De acuerdo a los resultados obtenidos, observamos que existe una gran concordancia entre el método de ELISA y la tinción de Gram por lo que podemos considerar a ELISA como alternativa en el diagnóstico de *Candida albicans* presentando una mayor sensibilidad y especificad diagnóstica.
- 6.- El porcentaje de positividad de la técnica de ELISA aumenta cuando tenemos flujo y daño vaginal.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 .- Jawetz, Melnick, Aldelberg AE, et al. Micología Médica 13a ed. El Manual Moderno; México, D.F. 1990; 307-309
- 2 .- Bellanti JA. Inmunología 3a. Interamericana s.a. de c. v. México, D.F. 1986; 101-15.
- 3 .- Wood G M, Trejdosiewicz LK, Losowsky M S . ELISA for measurement of secretory IgA distinct from monomeric IgA. J Immunol Methods 1987; 97: 269-274.
- 4 .- Zoller L, Kramer I. Enzyme Immunoassays For Invasive Candida Infections: Reactivity of Somatic Antigens of Candida albicans. J Clin Microbiology 1991; 27(9):1860-1867.
- 5 .- Rose NR, Conway de Macario E, Fahey L J, Friedman H, Penn G M. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth edition. American Society for Microbiology; Washington. D.C. 1991. 414-426.
- 6 .- Rippon JW. Tratado de Micología. 3a ed. Interamericana Mc Graw Hill; México, D.F. 1991; 604-612.
- 7 .- Garrocho SC, Adame LN, et al. Candidiasis y tricomaniasis vaginal. Ginecología y obstetricia de México, 1983; 51(316): Agosto, 199-203.

- 8.- Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol August 1, 1985; 924-934.
- 9.- Monif GRG, Classification and pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. Am J Obstet Gynecol Augst 1. 1985. 935-939.
- 10.- McCourtie J, Douglas J. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources . Infect Immun 1981; 32: 1234-1241.
- 11.- Roertson WH. Mycology of vulvovaginitis. Am J Obstet Gynecol April 1988; 989-990.
- 12.- Friedrich EG Jr. Current perspectives in candidal vulvova ginitis. Am J Obstet Gynecol April 1981; 985-986.
- 13.- Kaufman RH. Establishing a correct diagnosis of vulvovaginal infection. Am J Obstet Gynecol April 1988; 986-988.
- 14.- Yumas GP, Paterson PV. Manual de Infectología. 2a ed. Interamericana Mc Graw Hill; México, D.F. 1982; 180-181.
- 15.- Mourad S, Friedman L. Pathogenicity of *Candida*. Dep. Tropical Med. Public Health, and Microbiology. 1960; August 15, 550-556.

- 16.- Davis D, Dulbecco R, Tratado de Microbiología. 3a ed. Salvat Editores España, 1984; 684.
- 17.- Lennette EH, Balows A, William JH, et al. Microbiología Clínica. 4a ed. Panamericana. Buenos Aires. 1991; 666-673, 1091-1096, 1156-1160.
- 18.- Burrows N. Tratado de Microbiología. 10a ed. Interamericana. México, D.F. 1974; 20.
- 19.- Joklink WK, Nillelt HP. Zinsser Microbiología Médica Panamericana. Argentina. 1986; 1256-65.
- 20.- Finegold SM, Martin NJ. Bailey-Scott Diagnóstico Microbiológico. 7a ed. Médica Panamericana, Argentina. 1991; 664-667, 795-796.
- 21.- Bach JF. Inmunología. Limusa S.A., México, D.F. 1984; 42-43.
- 22.- O' Beirne AJ, Cooper HR. Heterogeneous Enzyme Immunossay. J Histochemistry Citochemistry 1979; 27(8): 1148-1162.
- 23.- Boudet F, Theze J, Zovalí M. UV- Treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. J Immunological methods 1991; 142: 73-82.
- 24.- Daiesfeld HJ, Enders B, Haworth, et al. The Enzyme linked immunosorbent bull world realth organ. 1976; 54:129-139.

- 25.- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 263-275.
- 26.- McHugh TM, Wang YJ. Development of a microsphere-based fluorescent immunoassay and its comparison to an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to three antigen preparations from *Candida albicans*. *J Immunol Methods* 1989; 116: 213-219.
- 27.- Weller BI, Simmons PD, Ivanyi L. Identificación of immuno dominant antigens of *Candida albicans* in patients with superficial candidosis. *Clin Immunology* 1990; 54: 347-353.
- 28.- McKay M. Cutaneous manifestations of candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* August 1, 1985; 924-34.
- 29.- Data on file . Organon teknika B.V. Buxtell Holland. 1988.
- 30.- Tomasi BT . The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunology Today* 1992; 13(10): 416-418.
- 31.- Klein. J. Immunology. Blackwell scientific Publications, Inc, Cambridge USA. 1990; 141-145.
- 32.- Stites DP, Sobó JD, Well JY. Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno, S.A. de C.V. Mexico. 1988; 279-280.

- 33.- Weir DM. Handbook of experimental Immunology. 4a ed. Black Well Scientific Publications. Oxford. 1989; Cap 10.
- 34.- Carlson HE. Lindberg AA. Application of enzyme immunoassay for the diagnosis of bacterial and mycotic infections. Scand. J Immunol 1978; 8(Suppl.7):97-110.
- 35.- Reiss EL, Stockman, et al. Dissociation of mannan-serum complexes and detection of *Candida albicans* mannan by enzyme immunoassay variations. Clin chem 1982; 28:306-310.
- 36.- Margni AR. Inmunología e Inmunoquímica. 4a ed. Panamericana. Argentina. 1989; 67-107, 571-586.
- 37.- Konje JC. Olorin EO, et.al. The prevalence of *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* in the cytology clinic at Ibadan, Nigeria. Afr J Med Med Sci Marzo 1, 1991; 29-34.
- 38.- Richardson MD, Warnock DW. Enzyme-Linked Immunosorbent assay and its application to the serological diagnosis of fungal infection. Sabouraudia 1983; Mar,21(1):1-14.
- 39.- Cañedo DL. Investigación Clínica. Interamericana, México, D.F. 1987; 113-126.

40.- Weir DM. Immunology. 4a ed. Charchill Livingtone London 1977; 187-190.

A N E X O S

Cloruro de potasio 0.2 g.

Tween 20 0.5 ml.

Llevar a un litro de agua bidestilada, almacenar a 4 grados centígrados.

SUSTRATO DE PEROXIDASA

Amortiguador de sustrato pH 5

Acido cítrico 0.1 M 24.3 ml.

Fosfato de sodio monobásico

anhidro 0.2 M. 25.7 ml.

A 50 ml. se le adiciona 20 microlitros de Peróxido de hidrógeno.

Para cada placa se toman 10 ml. de ésta mezcla y se adiciona 4 mg. de Ortofenilendiamina, el sustrato se prepara inmediatamente antes de usarse, pues se daña con la luz.

SOLUCION FORMALIZADA AL 0.6% EN PBS.

1.5 ml de Formaldehido (39.7 % de pureza) en 100 ml. de PBS.

SOLUCION SALINA ISOTONICA

8.5 g. de Cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

REACTIVO DE LOWRY.

Reactivo A*

Carbonato de sodio 2.0 %

Tartrato de sodio y potasio 0.02 %

Hidróxido de sodio 0.1 N.

Reactivo B*

Sulfato de cobre 0.5 %

Mezclar 50 ml. del reactivo A* con 1 ml. del reactivo B*.

Se conserva en refrigeración.

PBS-ALBUMINA SERICA BOVINA EN 100 ml. DE PBS.

1 g. de Albúmina sérica bovina en 100 ml. de PBS.

**PREPARACION DE COLORANTES PARA LA TINCION DE GRAM
(MODIFICADO POR HUCKER)**

A) Solución patrón de Cristal Violeta

Colorante de Cristal Violeta 85% 20.0 g.

Etanol al 95% 100 ml.

B) Solución patrón de Oxalato

Oxalato de Amonio 1.0 g.

Agua destilada 100 ml.

*Solución de trabajo:

Diluir la solución patrón de Cristal Violeta 1:10 con agua destilada y mezclar 4 de solución patrón de oxalato.

C) Solución de Iodo.

Cristal de Iodo 1.0 g

Ioduro de Potasio 2.0 g

- c) Hervir durante un minuto.
- d) Distribuir en cantidades de 8 ml. en tubos de tapón de rosca.
- e) Esterilizar en autoclave a 121 grados centígrados (15 libras de presión de vapor) durante 15 minutos.

AGAR SABOURAUD

- a) Suspender 40 g. del polvo en 1 lt. de agua bidestilada.
- b) Mezclar bien hasta que se obtenga una solución uniforme.
- c) Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto.
- d) Distribuir en cajas de petri, cantidades de aprox. 20 ml. por caja.
- e) Esterilizar en autoclave a 121 grados centígrados (No más de 15 libras de presión).