



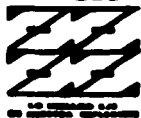
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"VALOR DIAGNOSTICO DE LA PRUEBA DE
PRODUCCION DE CLAMDIOSPORAS CON
RESPECTO A LA PRUEBA DE TUBO GERMINAL
PARA LA IDENTIFICACION DE *Candida albicans*".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
MARTHA NOEMI BURELO REYES

U N A M
P R E S
Z A R A G O Z A



MEXICO, D. F.

OCTUBRE 1967

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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

MARTHA NOEMI BURELO REYES

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Valor diagnóstico de la prueba de producción de clamidiosporas con respecto a la prueba de tubo germinal para la identificación de Candida albicans.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	MA. LUISA DELGADO BRISEÑO	
VOCAL	Q.F.B. ROBERTO C. GONZALEZ MELENDEZ	
SECRETARIO	Q.F.B. MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURAN	
SUPLENTE	Q.F.B. MA. DEL PILAR CEDILLO MARTINEZ	
SUPLENTE	Q.F.B. MA. GALIA MARTINEZ FLORES	

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a 10 de JUNIO de 1997.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor

Roberto Cruz González Meléndez

Por su apoyo y paciencia

A mis amodales

**Ma. Luisa Delgado Briseño
Ma. de las Mercedes Zamudio Durán
Ma. Galia Martínez Flores
Ma. del Pilar Cedillo Martínez**

Por su valiosa aportación en la elaboración del presente trabajo

A los profesores

**Martha A. Sánchez Rodríguez
Juan Francisco Sánchez Ruiz**

Por aclarar siempre mis dudas

A mis amigos

DEDICATORIAS

A Dios

Por darme la vida y la capacidad para superar las dificultades presentadas y lograr la realizacion de una mas de mis metas

A mis padres

Ma Geronima Reyes Diaz
Angel Burelo Mendez

Por la motivacion y ejemplo que han sido para mi asi como por su amor y apoyo incondicional

A mis hermanas

Ana Laura y Angelica Gabriela

Por estar siempre conmigo

A mi esposo

David

Por dar un giro total en mis proyectos de una manera tan especial
Por apoyarme y estar siempre conmigo

A todos ustedes

Jona, Diana, Salma
Sra Esther, Toño, Silvia, Oscar, Tete, Rudy

INDICE

Capítulo	Página
Resumen	2
Introducción	4
1. Marco teórico	6
1.1 Generalidades	6
1.2. Taxonomía	9
1.3. Etiología y patogenia	12
1.4. Epidemiología	14
1.5. Signos y síntomas.	15
1.6. Tratamiento	17
1.7. Diagnóstico.	21
2. Planteamiento del problema	37
3. Objetivo.	39
4. Hipótesis.	39
5. Diseño de investigación.	39
5.1 Tipo de estudio.	39
5.2 Población	40
5.3. Criterios de inclusión y exclusión.	40
5.4. Variables.	40
5.5 Material	41
5.6. Equipo	42
5.7. Sustancias.	42
5.8. Técnicas	43
6. Diseño estadístico	46
6.1. Fórmulas estadísticas	47
7. Resultados.	48
8. Análisis de resultados.	57
9. Conclusiones	62
10. Apéndice.	63
11. Bibliografía.	68

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de consulta médica y siendo tan amplia su variedad es necesaria la participación del laboratorio de análisis clínicos en la identificación del agente etiológico en el menor tiempo posible y a costos razonables.

Dentro del grupo de microorganismos que pueden ocasionar una infección se encuentran los hongos y en particular las levaduras, para su identificación existen actualmente técnicas automatizadas que por su alto costo son poco accesibles a poblaciones de bajos recursos económicos.

Hoy en día, la identificación definitiva de especies de levaduras, en particular del género *Candida* se efectúa utilizando la prueba de producción de tubo germinal a la cual se han realizado estudios de evaluación de confiabilidad diagnóstica sin embargo, es necesario tener en consideración otra prueba a fin de que sea una alternativa de identificación.

El presente estudio determinó la sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica de la prueba de producción de clamidosporas en cepas serotipificadas de *Candida* comparándose con las de la prueba de producción de tubo germinal, empleada como prueba de referencia por ser la más empleada por sencilla y práctica, con lo cual se tiene un método diagnóstico con una confiabilidad documentada, práctico y económico que puede ser aplicado como una alternativa de identificación de *C. albicans* en los laboratorios microbiológicos.

El método de referencia prueba de tubo germinal se realizó con pools de sueros con una concentración de glucosa de entre 150 - 270 mg/dl como indica la literatura, y la producción de clamidosporas se realizó por el método Dalmau ambas pruebas se efectuaron a 7 cepas de *C. albicans*, 2 cepas de *C. stellatoidea*, 1 cepa de *C. tropicalis* y 1 cepa de *C. guilliermondii* repitiendo cada prueba 15 veces.

Obteniéndose los resultados de sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica (89%, 86% y 88%, respectivamente) se concluyó que la prueba de producción de clamidosporas es una técnica confiable y reproducible, la cual puede ser utilizada como prueba de identificación definitiva de *C. albicans* siendo adaptable a todos los laboratorios de diagnóstico.

INTRODUCCION.

Hoy en día, los grandes laboratorios echan mano de herramientas muy sofisticadas en el diagnóstico microbiológico de los padecimientos y las candidiasis son un ejemplo, pudiéndose utilizar técnicas automatizadas e inmunológicas además de las ya tradicionales como son la microscopia, cultivos bacteriológicos y pruebas bioquímicas buscando con esto una mayor confiabilidad diagnóstica, sin embargo, en países en vías de desarrollo, los microbiólogos se limitan a la utilización de técnicas que van de acuerdo con sus recursos económicos (1,2).

Indudablemente es muy importante un diagnóstico oportuno y certero con el cual sea factible proporcionar un tratamiento específico que realmente elimine al microorganismo causal evitando así infecciones recurrentes.

Dentro del diagnóstico microbiológico, la microscopia, el aislamiento a través de cultivo bacteriológico y las pruebas bioquímicas son generalmente, las técnicas más empleadas además de pruebas para la confirmación de especie, en el caso específico de las candidiasis, en las cuales, la identificación se realiza empleando métodos bioquímicos como el auxonograma y el zimograma y pruebas para confirmación de especie como la producción de tubo germinal y de clamidosporas. Por tanto, la identificación del agente etiológico de la candidiasis, en la cual se realicen todas estas pruebas es tardada y laboriosa, por lo que, la presente investigación estableció el grado de confiabilidad de la prueba de producción de clamidosporas utilizando como referencia la técnica más empleada, producción de tubo germinal y con esto se propone el uso de una prueba cuya potencia diagnóstica sea satisfactoria para la identificación de *Candida albicans* en caso de no contar con los reactivos para la de tubo germinal (1,3).

Dado que no se tienen datos acerca de la sensibilidad y especificidad de la prueba de producción de clamidosporas, pues dentro de la literatura no se han reportado trabajos a este respecto, los que se obtuvieron experimentalmente fueron comparados con la prueba de referencia y al establecer la potencia diagnóstica se puede recomendar su uso en la identificación de levaduras del género *Candida*.

Se han realizado trabajos que evalúan las variables que intervienen dentro de la técnica tanto de producción de clamidosporas como de tubo germinal, encontrándose que para tubo germinal las más importantes son la aireación del suero al incubarlo, la temperatura de incubación y la concentración de glucosa del suero empleado; mientras que para la producción de clamidosporas son, la aireación del medio de cultivo, la temperatura de incubación, a la vez que para ambas pruebas es determinante el efecto del tiempo de incubación ya que de éste puede depender la positividad o negatividad de la prueba, debido a esto se realizó un estricto control de estas variables y se incluyó dentro del estudio la variación de la concentración de glucosa para observar el efecto directo de ésta sobre la prueba de producción de tubo germinal ya que si como lo reporta la literatura, a concentraciones de glucosa de entre 150-250 mg/dl se disminuye el tiempo de incubación, se disminuirán los falsos positivos pues las levaduras diferentes a *C. albicans* que pueden dar tubo germinal positivo lo hacen al término de tres horas y con este método la prueba emplea sólo hora y media. (27, 28, 31, 34)

1. MARCO TEORICO.

Actualmente, la candidiasis es un problema común de salud pública que necesita la atención social que implica la participación conjunta de químico clínico, médico y paciente (1).

El éxito del tratamiento de la candidiasis radica en una identificación etiológica certera, es aquí donde el equipo de salud debe tener conocimiento y manejo de criterios y técnicas, los cuales en algunos casos pueden ser inadecuados, lo que trae como consecuencia fracasos terapéuticos.

1.1. GENERALIDADES.

Candida sp son células redondeadas u ovaladas que aparecen individualmente o asociadas formando pseudomicelios. Son grampositivas y su metabolismo es principalmente aerobio, no degradan urea ni asimilan inositol, no poseen cápsula, no producen pigmentos carotenoides. El metabolismo de las células de *Candida sp* es el mismo que el de otras células eucarióticas aerobias. Son capaces de glucólisis aerobia por vía de hexosa monofosfato y de glucólisis anaerobia por la vía de Embden-Meyerhof. También tienen enzimas del ciclo de Krebs y enzimas mitocondriales para la fosforilación oxidativa. Esta última en *Candida* incluye principalmente citocromos a, a₃, b, c y c₁. La síntesis de proteínas también es parecida a la de los eucariontes. *C. albicans* tiene ribosomas 80S que se disocian en subunidades 60S y 38S. Poco se sabe acerca de los cambios fisiológicos asociados al desarrollo de hifas o clamidosporas. La temperatura es un factor importante, las temperaturas relativamente altas (más de 37°C) favorecen hifas y blastosporas y temperaturas menores (menos de 25°C) parecen favorecer la presencia de clamidosporas (2,3).

Candida albicans es un hongo dimórfico, que a 37°C crece como levadura o como pseudomicelio cuando produce invasión a tejidos a 25°C.



Figura 1.1.1. Celulas levaduriformes de *Candida albicans*.
La barra representa 2 μ m.

Fuente: ColeG, 1991.



Figura 1.1.2. Hifa de *Candida albicans* con pseudohifa lateral. La barra representa 2 μ m.

Fuente: ColeG, 1991.

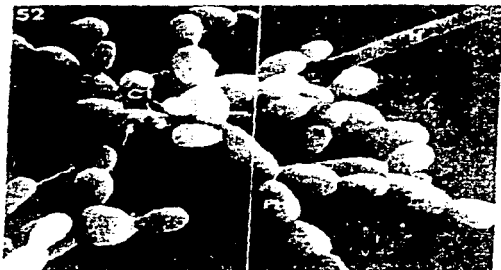


Figura 1 1 3. *Candida albicans*: Levaduras. pseudohifas (PH), e hifas (H) crecimiento en una placa de agar Dextrosa Sabouraud 3000X

Fuente: Howard D. 1983.

1.2. TAXONOMIA.

El género *Candida* está constituido por hongos levaduriformes incluidos taxonómicamente en la división *Deuteromycota*, hongos imperfectos caracterizados por multiplicarse exclusivamente de forma asexual a la clase *Deuteromycetes* y subclase *Blastomycetidae* por propagarse por blastosporas y a la familia *Cryptococcaceae* (14).

En la forma de reproducción asexual, se da la formación de una nueva célula sin que haya gametos y sin fusión nuclear, es decir, se da el crecimiento a partir del micelio o pseudomicelio primitivo sin conjugación nuclear ni reducción cromática, de los cuales se conocen los siguientes mecanismos

1) Esporulación Las esporas se forman por condensación del citoplasma con su contenido nuclear y están envueltas por una membrana interna o endospora y otra externa o exospora, pueden albergar una o varias células divididas por septos y poseen un poro germinativo de donde surgirá un nuevo elemento en el momento del desarrollo. En esta fase pueden formarse blastosporas o clamidosporas en el caso específico de *C. albicans* dependiendo del medio en que se encuentren y si éste es adecuado, dichas esporas aumentan de tamaño y en algunos casos dan lugar a uno o más tubos germinales que se prolongan hasta formar hifas. Fig 1 2 1. En ocasiones, el medio favorece que la formación de tubo germinal sea inmediata, por lo que no se observa esporulación (15).

Las blastosporas son yemas que se originan de las levaduras y de células semejantes a levaduras. Las clamidosporas son estructuras redondas u ovales que presentan una doble pared muy gruesa siendo de mayor tamaño que las blastosporas. Retienen el colorante azul de Tripán, son muy resistentes al calor y la desecación, probablemente están formadas como las endosporas bacterianas. Se presentan tanto en la punta del filamento (terminales) o intercaladas dentro de la hifa (clamidosporas intercalares). Fig 1 2 2 (16).



Fig. 1.2.1 Tubo germinal en *Candida albicans*, microfotografía por barrido electrónico. La barra representa 1 μ m.

Fuente: Prasad R, 1991.



Figura. 1.2.2. Clamidosporas de *Candida albicans*.

Fuente: Sherris J, 1993.

2) Gemación. En esta la célula hija es menor que la madre. Como la yema crece hacia afuera a partir de la célula madre, el núcleo de esta última se divide y uno de los núcleos resultantes de tal división pasa a la yema. La pared celular se va estructurando entre la yema y la célula madre y por último se separan 1.2.3 y 1.2.4. (11)



Figura.1 2.3 Levaduras gemando (blastosporas)
microfotografía de barrido electrónico

Fuente: Prasad R. 1991.



Figura 1 2 4 Microfotografía de barrido electrónico de
levaduras y formas gemantes de
Candida albicans (X6975)

Fuente: Cole G. 1991.

1.3. ETIOLOGIA Y PATOGENIA.

La candidiasis es una micosis producida por las especies del género *Candida*, de las cuales las más comúnmente aisladas son *C. albicans* y *C. tropicalis* deben esta capacidad de penetración a los tejidos al dimorfismo que pueden desarrollar, es decir, pasan a la fase de micelio en los tejidos, forma que es más resistente a los mecanismos de defensa del huésped que la fase de levadura. Las especies menos frecuentes son *C. stellatoidea*, la cual según muchos micólogos es una variante de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata* y *C. lusitanae* se encuentran en los tejidos tan sólo en fase de levadura (1,4,7,12,14).

La estructura antigénica de *Candida sp* es compleja estando compuesta en su mayoría por glucoproteínas que forman parte de la pared celular, en ésta, el peptidoglucomanano (PGM) es cualitativamente lo más importante, los antígenos procedentes de citoplasma y membrana citoplasmática son proteínas así como algunos metabolitos inmunógenos (1,15).

El daño tisular se produce por la acción directa del microorganismo pero también como consecuencia del mecanismo de defensa que el huésped establece ante la invasión. Las levaduras son fagocitadas y destruidas al ser opsonizadas por un anticuerpo y el complemento, sin embargo, al darse el cambio a la fase micelial, *Candida* conserva su virulencia y además escapa a la actividad fagocitaria de los macrófagos, los cuales a su vez, son relevados por los neutrófilos que se adhieren a las hifas, liberando enzimas lisosómicas y metabolitos oxidativos que se producen en la respiración. Recientemente se ha comprobado que *C. albicans* posee receptores para el componente del C3b del complemento, cuando el C3b se une a la superficie del hongo, se orienta de modo que impide la opsonización. En ciertas condiciones microambientales y nutricionales, se aumentan dichos receptores y se da lugar a la infección lo que puede explicar algunas de las circunstancias disponibles (1,15).

Las especies que no son *C. albicans* producen infecciones de igual manera pero con una frecuencia menor.

Un caso que merece aclaración es *Torulopsis glabrata* una levadura muy pequeña y con características similares a las del género *Candida*, con la diferencia de que no produce hifas o pseudohifas en agar harina de maíz tween 80 (Fig. 1 3 1) Es parte de la flora gastrointestinal y genital. Las infecciones más comúnmente relacionadas a esta especie son las urinarias, no obstante, puede ocasionar fungemias al invadir tejidos rotundos (13).

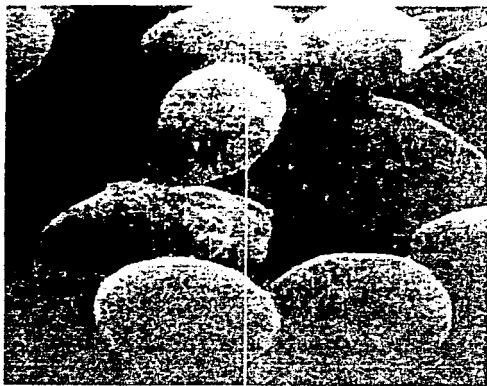


Figura 1 3 1 *Torulopsis glabrata*, 11,000X

Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.

1.4.EPIDEMIOLOGIA.

Candida sp forma parte de la flora mucocutanea del hombre encontrandose en cavidades bucal gastrointestinal genital femenina anal y conducto auditivo externo, esto se modifica cuando los factores microambientales son predisponentes (1,4,17,40).

La candidiasis se debe generalmente a *C. albicans* que bajo condiciones de oportunismo invade produciendo la infección.

Los factores de oportunismo son de varios tipos

- 1)Físicos traumatismos externos traumatismos quirurgicos radiaciones humedad
- 2)Químicos pH cutaneomucoso medicamentos (inmunosupresores glucocorticoides antibioticos), drogadicción contaminación ambiental.
- 3)Biológicos embarazo diabetes, linfomas, leucemias obesidad insuficiencia renal, infecciones crónicas, síndromes de inmunodeficiencia alimentación parenteral, etc (4,7).

El espectro de la candidiasis incluye infecciones cutaneas, crecimiento no invasivo de los hongos en la mucosa de la orofaringe, del conducto gastrointestinal y de la vagina infecciones superficiales de estas mucosas e infecciones sistémicas que afectan a los órganos internos (1).

Estudios epidemiológicos realizados revelan que de las micosis superficiales, el 85% es producido por *C. albicans* y que la frecuencia de onicomycosis o parasitación de la uña y del pliegue perungueal, es del 5-8% (15).

Un estudio multicéntrico reportó las frecuencias de aislamiento de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* de: 52%, 17% y 6.2% respectivamente. Se ha observado además, que la prevalencia de *C. albicans* a nivel genital es del 12.9% (19,20).

Investigando el papel de la promiscuidad en la colonización de la vagina por levaduras fueron examinados exudados vaginales de prostitutas el 21% mostro infección en el cultivo y *C. albicans* fue aislada en el 93 % de esos casos. Al compararlo con los resultados de mujeres no promiscuas se concluyo que la promiscuidad no es un factor predisponente para la contaminación vaginal por levaduras (21).

Ademas se ha observado que el numero de infecciones producidas por especies diferentes de *C. albicans* ha aumentado. *C. tropicalis* y *C. glabrata* son las mas comunes (22).

En las unidades de cuidados intensivos se han hecho investigaciones acerca de cuales son los microorganismos que comunmente provocan problemas a pacientes intubados con sondas, cateteres y que simultaneamente se encuentran inmunodeprimidos por algun tipo de tratamiento antibacteriano. es decir presentan una infección nosocomial. Como resultado se tiene que, en el 92% de los cultivos realizados a cateteres, se han aislado levaduras. a estos pacientes se les practicaron hemocultivos dentro de las 48 horas posteriores al reporte positivo del cultivo de catéter identificandose *C. albicans* en un 64.8% (23).

Como puede observarse, la epidemiologia de la candidiasis refleja el tenue equilibrio existente entre la colonización y la infección y la gran capacidad patógena de *C. albicans* (4, 7, 12).

Independientemente de la causa o causas subyacentes, la mayoría de las candidiasis son superficiales y localizadas en el punto de origen, es excepcional que se produzca la invasión del torrente sanguíneo y la afcción de organos internos (4, 7, 12, 24).

1.5.SIGNOS Y SINTOMAS.

Las manifestaciones clinicas son variadas, la invasión superficial de las mucosas por *C. albicans* produce unas placas blancas y de aspecto caseoso que se adhieren ligeramente a la superficie mucosa. La lesión no suele ser dolorosa. Las lesiones orales denominadas muguet, aparecen en la lengua, el paladar y otras superficies mucosas, formando manchas blancas y rugosas que pueden ser dolorosas.

La parasitación de la uña y del pliegue periungueal, denominada onicomicosis se desarrolla en los individuos que por sus actividades deben tener sus manos inmersas en el agua durante periodos prolongados. La uña adquiere color amarillo-verdoso, se arruga y presenta surcos transversales, el pliegue periungueal está inflamado y rojo, recubierto por epidermis brillante.

La forma más común de la candidiasis genital en la mujer es la cervicovaginitis. Los síntomas que se presentan son el prurito, la leucorrea y ocasionalmente el dolor. Característicamente existe el eritema vulvovaginal y en ocasiones perianal, así como exudación vaginal de apariencia blanca, espesa y cremosa. En el varón esta infección es menos común, cursando clínicamente con la aparición de pústulas sobre una base eritematosa que afecta al glande y surco balanoprepucial e incluso se extiende al escroto y perineo.

El granuloma candidiásico es una infección grave y poco común caracterizada por la aparición de lesiones papulosas irregulares muy vascularizadas y cubiertas de una costra delgada y oscura. El área afectada con más frecuencia es la cara pero las lesiones pueden aparecer en cuero cabelludo, miembros inferiores o tronco.

En ocasiones la levadura invade el esófago pudiendo aparecer placas inflamatorias similares a las observadas en el muguet, con candidiasis oral asociada o sin ella. Pueden aparecer ulceraciones, deformidades y en algunos casos, perforaciones del esófago.

La presencia de *C. albicans* en la flora genital y en la uretra distal permite que estos microorganismos penetren en la vejiga urinaria en las mismas circunstancias en que las bacterias ocasionan infecciones urinarias. La cistitis por *Candida* se asocia sobre todo a la diabetes mellitus. La infección del riñón por vía hematógena o ascendente puede provocar pielonefritis agudas, abscesos y lesiones fúngicas redondeadas que crecen expandiéndose en el interior de la pelvis renal.

Las infecciones por *Candida* de los órganos viscerales, con posterior diseminación hacia otros órganos o sin ella, se asocia muy particularmente a déficit inmunológico y otras formas de infección de los mecanismos de defensa normales. Los órganos que se afectan con mayor frecuencia son los riñones.

cerebro, el corazón y los ojos. También es posible el compromiso de otros órganos como el pulmón aunque es menos habitual. (1,5,7,11,24)

1.6. TRATAMIENTO.

Los fármacos antimicóticos son en comparación con los antibacterianos menos diversos además de que presentan inestabilidad, demostrándose propiedades farmacológicas poco interesantes como una baja difusión a los tejidos. La toxicidad mostrada por los agentes antifúngicos, no se aproxima al grado y selectividad que pudieran presentar los antibacterianos.

Las candidiasis superficiales son muy frecuentes y su tratamiento se basa en el empleo de antimicóticos de acción tópica, con lo que se disminuye la toxicidad para el huésped. No es así con las infecciones profundas, las cuales, requieren del empleo prolongado de antifúngicos tóxicos.

La síntesis de ácidos nucleicos y la membrana citoplásmica son los principales objetivos a los que se hayan dirigidos los agentes antimicóticos. Dado que el principal componente de la membrana citoplásmica es el ergosterol, se han desarrollado fármacos que actúan directamente sobre la síntesis de este. (4,7,11,25)

TABLA 1.6.1.

Características de los agentes antifúngicos.

Antifúngico	Acción	Vía de administración			Espectro
		Tópica	Oral	Parenteral	
Anfotericina B	Alteración de la membrana	-	-	+	Todos los hongos
Nistatina	Alteración de la membrana	+	-	-	Todos los hongos
Griseofulvina	Función de los microtúbulos	-	+	-	Dermatofitos
Flucitosina	Síntesis de los ácidos nucleicos	-	+	-	<i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Cryptococcus</i> , otras levaduras
Cloruro potásico	?	-	+	-	<i>Sporothrix schenckii</i>
Clotrimazol	Síntesis de ergosterol	+	-	-	La mayoría de los hongos
Miconazol	Síntesis de ergosterol	+	-	-	La mayoría de los hongos
Ketoconazol	Síntesis de ergosterol	-	+	-	La mayoría de los hongos

Fuente: Ryan, K. 1989.

TABLA 1.8.2.**Agentes antimicóticos de elección.**

Sitio de infección	Elección primaria	Elección alternativa	Vía, dosis y duración
Sanguínea no metastásica	Anfotericina B		0.4 mg / Kg / día Dosis total 7 mg / Kg
Sanguínea metastásica	Anfotericina B	Fluconazol	Anfo B 0.6 mg/kg/día IV por 7 días y luego 0.8 mg/kg en días alternos hasta evidencia de resolución
Crónica mucocutánea	Ketoconazol	Anfotericina B	Keto 400 mg/día via oral en una dosis con alimentos x 3-9 meses
Cutánea	Anfotericina B clotrimazol ketoconazol		Tópico: aplicar 3- 4 veces x día x 7- 14 días Keto una vez al día x 14 días
Endocarditis	Anfotericina B		Anfo B IV 0.6 mg/kg/días x 7 días y luego 0.8 mg en días alternos
Oral	Nistatina Clotrimazol	Fluconazol	Nistatina 500.000 U (enjuagar la boca y tragar) c/ 6 h Clot: 1 trocisco (10 mg) 5 veces al día x 14 días

**Agentes antimicóticos de elección.
(continuación)**

Sitio de infección	Elección primaria	Elección alternativa	Vía, dosis y duración
SIDA	Fluconazol* Nistatina Clotrimazol	Anfotericina B IV	Fluc. 200 mg vía oral el día 1. luego 100 mg al día hasta mejoría (3- 4 días) Luego continuar tratamiento supresivo 100 mg vía oral cada semana.
Peritoneal	Anfotericina B + Flucitocina	A menudo se necesita retirar el catéter	Anfo B intraperitoneal (4 mg/bolsa 2 L las primeras 24 horas, luego 3 0 mg/ 2 L + Flucitocina (200 mg/ 2 L los 3 primeros días luego 100 mg/ 2 L)
Urinaria (vesical, no renal)	Fluconazol	Anfotericina B (irrigación vesical)	Flu 200 mg el día 1. luego 100 mg/ día x 3- 5 días
Vaginal	Tópico: Fluconazol Clotrimazol Terconazol	Nistatina o Itraconazol	Miconazol 200 mg tabs vaginales (1 al día x 3 días al acostarse) Clot tabs vaginales 100 mg (2 al día x 3 días al acostarse) Terconazol tabs vaginales de 80 mg (1 al día x 3 días al acostarse)

* *C. krusei* resistente a Fluconazol. Se ha reportado resistencia secundaria con *Torulopsis glabrata* y rara con *C. albicans*. La *C. albicans* resistente a Fluconazol puede ser sensible a Itraconazol

Fuente: Modificado de Sanford, J. 1995.

1.7. DIAGNOSTICO.

La identificación de *C. albicans* se realiza a través del examen clínico y del laboratorio, el primero abarca un detallado interrogatorio orientado a los signos y síntomas además de la exploración y el establecimiento de los factores predisponentes

El examen de laboratorio implica la toma de muestras para cultivo e identificación de *Candida* pueden ser muy variadas e incluyen entre otras, raspados de lesiones mucocutáneas y rectales, expectoraciones y aspirados broncoscópicos o transtraqueales orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, exudados faríngeos, vaginales, uretrales y biopsias tisulares

El diagnóstico presuntivo se obtiene al observar en fresco una suspensión de la secreción, raspado, exudado o cualquier otro tipo de muestra obtenida, se podrán entonces observar dos fases morfológicas de la candidiasis, yemas levaduriformes y pseudomicelio cuando el ambiente de crecimiento es apropiado y se tiene sintomatología. En un frotis al cual se le realiza la tinción de Gram se encontrarán células ovales gemantes y pseudohifas grampositivas (1,3,4,14)

En caso de muestras como expectoraciones, es importante utilizar un agente mucolítico como la N-acetil-L-cistina para evitar interferencias que produzcan falsos negativos (16)

El aislamiento de *C. albicans* se realiza por medio de la siembra del material biológico en agar Sabouraud simple o adicionado con antibióticos (cloranfenicol y cicloheximida), papa de trosa o el más comúnmente empleado, agar Biggy, en el cual se observará la morfología descrita en la tabla 1 7 1 (25)

TABLA 1.7.1.

Morfología colonial en agar Biggy.

<i>C. albicans</i>	Colonias lisas, hemisféricas o circulares, café o negras con un ligero borde micelial. El ennegrecimiento no se difunde al medio.
<i>C. tropicalis</i>	Colonias discretas de color café oscuro con prominencia negra central y ligero borde micelial. Ennegrecimiento difuso del medio, únicamente con esta especie, después de incubar 72 horas.
<i>C. krusei</i>	Colonias rugosas, planas, grandes con la periferia que varía de color café negruzco plateado a café, rodeadas por un halo amarillo.
<i>C. parakrusei</i>	Colonias de tamaño mediano, frecuentemente rugosas, planas, de color que varía del café rojizo oscuro brillante a café rojizo claro y con un borde micelial extenso amarillento.
<i>C. stellatoidea</i>	Colonias de tamaño mediano, planas de color café muy oscuro casi sin desarrollo micelial.

Fuente: Mammal Boston, 1989.

La morfología de *C. albicans* en agar Sabouraud se observa como colonias medianas, lisas, cremosas, mate, de coloración blanca o ligeramente tostada

Además de la morfología microscópica y colonial es necesario realizar otro tipo de pruebas para la identificación de especie como son

Producción de tubo germinal. Es la prueba más empleada por económica y sencilla. Un tubo germinal se define como una extensión filamentososa de una célula de levadura que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula. *C. albicans* desarrolla tubos germinales durante las tres primeras horas de incubación a 37°C, sin embargo, la especie *C. tropicalis* puede formar seudotubos luego de tres horas de incubación, lo cual es un inconveniente para la identificación diferencial con *C. albicans*. Fig 1.7.1 (293)



Figura 1.7.1. Microfotografía de barrido electrónico de un tubo germinal de *Candida albicans*. La barra representa 1µm

Fuente: Howard D. 1983.

A causa de la variabilidad que se presenta en los resultados obtenidos al realizar el tubo germinal como la literatura lo indica, en suero humano, se ha investigado acerca de medios semisintéticos en los cuales llevar a cabo la prueba, tal es el caso de Bruaito y cols (1991) quienes proponen la utilización de un medio con glucosa sin aminoácidos, vitaminas y pH neutro, para promover la formación de tubo germinal. Este medio puede ser almacenado, es de fácil preparación y muy reproducible.

Al desarrollarse la prueba de tubo germinal, para la identificación de especies de *Candida*, fue necesaria la optimización de la prueba para obtener resultados más confiables, de esta manera, se han realizado múltiples estudios en los cuales se manipulan uno o varios factores que tienen influencia directa sobre la técnica. Algunos de estos trabajos encontraron que *C. albicans* y *C. stellatoidea* forman tubos germinales en 90 minutos a 37°- 40°C y que su diferenciación sólo se puede realizar por métodos bioquímicos, por otro lado, se ha demostrado la producción de tubo germinal por parte de *C. stellatoidea* es más lenta y en menor cantidad que la de *C. albicans* a la vez de que esto se ve alterado por la cantidad de la fuente de nitrógeno y otros nutrientes. (10,11,12,13)

En otra investigación, se establecieron los parámetros que permiten la formación de tubo germinal en un tiempo de 1.5 horas siendo éstos concentración de glucosa de 150 - 250 mg/ dl y pH 7.5 - 8.5, teniendo en cuenta esto, es posible evitar falsos positivos que producen otras especies al cabo de tres horas pues la lectura se realiza antes. (14)

El estudio realizado por Barlow y cols (1971), mostró que la concentración en el suero de urea, proteínas, colesterol, calcio, hierro, fósforo, aminoácidos y otros componentes de éste no afectan la producción de tubo germinal, mientras que ésta se ve aumentada a concentraciones de glucosa mayores o iguales a 150 mg/ dl.

Morfología microscópica en agar para clamidosporas. Una vez aislada la levadura en medios micológicos habituales se realiza la siembra en el medio de agar que promueve la formación de clamidosporas (ver fórmulas en el anexo), puede emplearse agar harina de maíz tween 80, agar para clamidosporas, etc se incuba a 25-30°C por 48 horas para su posterior observación en la cual se notará la presencia o ausencia y morfología de clamidosporas características de *C. albicans*, *C. stellatoidea* y ocasionalmente *C. tropicalis* de blastosporas de micelio verdadero, característico de cada una de las especies, y de pseudohifas, típicas de *C. parapsilosis*. Ver tabla 1.7.2, Fig 1.2.1, 1.7.2 a 1.7.11. (15,16,17)

TABLA 1.7.2.

**Morfología microscópica en agar
harina de maíz tween 80.**

<i>C. albicans</i>	<p>a) Clamidosporas de pared gruesa sostenidas aisladamente o en racimos habitualmente en los ápices de las pseudohifas</p> <p>b) Blastoconidios producidos escasamente o en densos racimos regularmente espaciados a lo largo de las pseudohifas</p>
<i>C. tropicalis</i>	<p>Blastoconidios producidos escasamente en forma aislada o en pequeños racimos laxos irregularmente a lo largo de las pseudohifas</p>
<i>C. parapsilosis</i>	<p>Formación de colonias aracniformes lejos de las estrias en el agar que dan un aspecto de arbusto. Los blastoconidios son escasos y nacen individualmente o en cadenas cortas. La formación de hifas gigantes es característica de esta especie</p>
<i>C. pseudotropicalis</i>	<p>Forman blastoconidios elongados que se disocian con rapidez de las pseudohifas, tendiendo a disponerse en paralelo a modo de "troncos en una corriente"</p>

Fuente: Modificado de Knaeman, 1987.

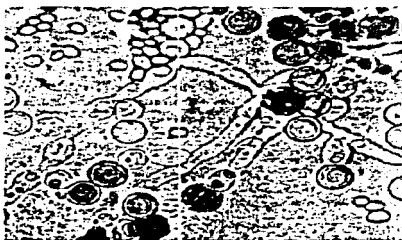


Figura 1.7.2 Clamidosporas de *Candida albicans*, observadas en cultivo en agar harina de maíz tween 80

Fuente: Murray P. 1992



Figura 1.7.3 Microfotografía de barrido electrónico de una hifa (flecha), seudohifa (doble flecha) y blastosporas (triple flecha). La barra representa 2 μ m

Fuente: Howard D. 1983.



Figura 1.7.4. Formación de hifas de *Candida albicans* con septo intermedio. La barra representa 1 μ m.

Fuente: Howard D. 1983.

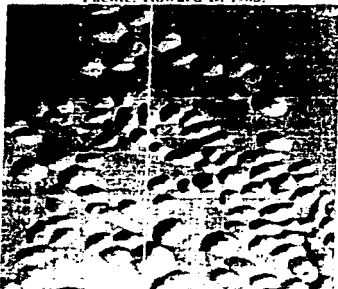


Figura 1.7.5. Células ovales y levaduriformes de *Candida tropicalis* (X1000)

Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.

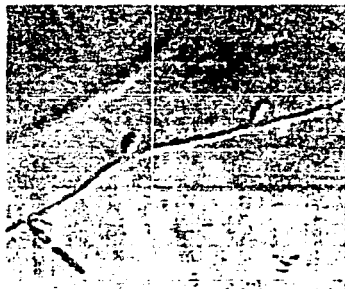


Figura 1 7 6 Hifas verdaderas y blastosporas producidas por *Candida tropicalis* en un cultivo en agar harina de maiz (X1000).
Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.

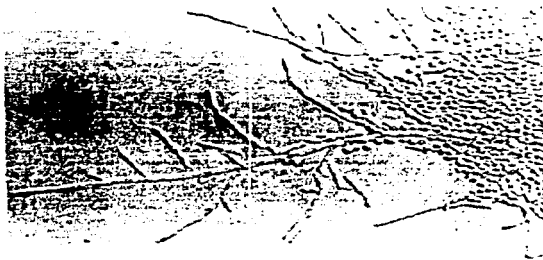


Figura 1 7 7 Seudohifas producidas en agar harina de maiz por *Candida parapsilosis* (X400).
Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.

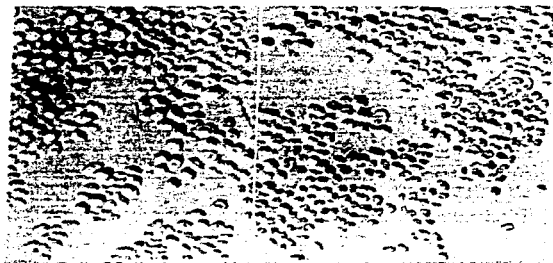


Figura 1 7 8 Levaduras de *Candida parapsilosis*
en agar harina de maíz (X500)

Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.



Figura 1 7 9 Células ovales a elípticas
de *Candida krusei*, crecimiento en
agar harina de maíz (X730)

Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.



Figura 1.7 10 Blastosporas y pseudohifas de *Candida krusei* producidas en cultivo en agar harina de maíz (X730)

Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.

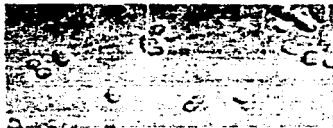


Figura 1.7 11 Células elongadas a ovales producidas por *Candida lusitanae* en agar harina de maíz (X292).

Fuente: Kwon-Chung, K. 1992.

Es importante mencionar los trabajos que se han realizado para valorar el efecto que tienen los factores que intervienen en el método de la producción de clamidosporas y se determinó que la aireación del cultivo y su incubación a temperaturas entre 26° y 28°C son condiciones que limitan la óptima formación de clamidosporas (27,55).

Se ha tratado, en cuanto a las dos pruebas anteriores, involucrarlas en una sola prueba que sirva como confirmación para la identificación de especies de Candida, para lo cual se desarrolló el agar extracto de arroz tween 80 en el cual se observa primero la formación de tubo germinal incubándolo a 37°C durante tres horas y posteriormente, la aparición de clamidosporas y micelio cuando se incuba a 25°C de 24 a 72 horas, sin embargo, estos medios todavía están en investigación (56).

Zimograma o fermentación de azúcares. Se realiza en un medio base que contiene peptona, extracto de levadura e indicador púrpura de bromocresol. Este medio se inocula y se le coloca una campana de Durham para la recolección de los gases producidos. La incubación de los tubos es a 25 o 30°C por 5 y hasta 10 días. Cuando se produce la fermentación de un azúcar, el pH se acidifica y como consecuencia vira el color del indicador del púrpura a amarillo. La producción de gas se verificará por medio de su acumulación dentro del tubo Durham empleado.

Auxonograma o asimilación de azúcares. El método clásico de Beijerinck utiliza pequeñas cantidades de carbohidratos secos impregnados en discos de papel filtro que se colocan en la superficie de un medio de agar base abundantemente sembrado. La asimilación de un determinado carbohidrato se manifiesta por el crecimiento de la levadura en torno al disco. La incubación del medio auxonográfico se realiza a temperatura ambiente, manteniéndose entre 24 a 72 horas. Los resultados para las pruebas antes mencionadas se detallan en las tablas 1.7.3. y 1.7.4 respectivamente. (1-6,14,16,36,43,44,45)

TABLA 1.7.3.

Fermentación (zimograma).

Especies	Glu	Sac	Mal	Lac	Tre	Gal
<i>C. albicans</i>	+	-	+	-	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>C. stellatoidea</i>	+	-	+	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	V	-	-	-	V	V
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	+	-	+	-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	-	+	V

Glu: glucosa, Sac: sacarosa, Mal: maltosa, Lac: lactosa, Tre: trehalosa, Gal: galactosa. + : fermenta, - : no fermenta, V: variable.

Fuente: Modificado de Perea, E; 1992.

TABLA 1.7.4.

Asimilación (auxonograma).

Especie	Glu	Sac	Mai	Lac	Tre	Gal	ME	C	X	R	A
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	+	-	V	+	-	+
<i>C. stellatoidea</i>	+	-	+	-	V	+	-	-	+	-	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	V	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	V

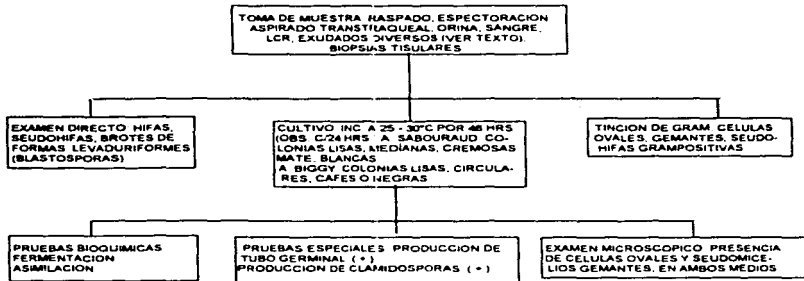
Glu: glucosa, Sac: sacarosa, Mai: maltosa, Lac: lactosa, Tre: trehalosa, Gal: galactosa, ME: melibiosa, C: celobiosa, X: xilosa, R: rafinosa, A: almidón. +: asimila, -: no asimila, V: variable

Fuente: Modificado de Peres, E: 1992

El cuadro A muestra un diagrama global del seguimiento para la identificación de *Candida albicans* a nivel de laboratorio microbiológico.

CUADRO 1.7.1.

Diagrama global para la identificación de *Candida albicans*.



NOTA: La adición de antibióticos al medio de cultivo para clamidosporas permite aislar directamente a *Candida albicans* a partir de la muestra clínica en estudio e identificar la formación de clamidosporas, simultáneamente incubar por duplicado, a 28°C y a 35°C de 24 a 76 horas, (opcional)

Fuente: Modificado de las referencias [1-3, 16, 43]

Existen otros métodos que han sido investigados para conseguir mayor confiabilidad y rapidez en el diagnóstico de las candidiasis invasivas, estos tienen como objetivo la detección de antígenos y metabolitos de *Candida* sp en sangre y otras muestras biológicas. La contrainmunolectroforesis (CIE) inhibición de la hemaglutinación pasiva aglutinación de partículas de latex, ELISA y radioinmunoensayo son técnicas que detectan antígenos y metabolitos procedentes de la pared, citoplasma o metabolismo, sin embargo aunque las ventajas que pueden aportar son indudables todavía son poco útiles debido a que los resultados son tardados y difíciles de interpretar por la falta de estandarización de antígenos y a que la especificidad puede variar enormemente.⁽³⁴⁾

Adicionalmente se ha desarrollado la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de especies de *Candida*, pero debido a lo engorroso del método y su elevado costo no es apropiada para adaptarla a la rutina de trabajo de laboratorio.⁽⁴⁰⁾

Se han probado métodos rápidos que rastrean levaduras que no son ni *C. albicans* ni *C. tropicalis* con los cuales es posible realizar una diferenciación presuntiva en 30 minutos, sin embargo, éstos métodos todavía están sujetos a investigación, tal es el caso de la prueba de la 4-metil-N-acetil-beta-D-galactosaminida (UAG).⁽⁴¹⁾

Por otro lado, se ha intentado la identificación de levaduras por medios de cultivo selectivos y diferenciales, de los cuales, las placas de agar fluorado y el medio ID *albicans* fueron evaluados y la sensibilidad de cada uno fue de 93.8% y la especificidad de 98.6%, no obstante, su alto precio los hace poco costeables.⁽⁴²⁾

Además de los métodos de identificación conocidos, se dispone de sistemas comercializados de fácil uso que permiten una identificación rápida de las especies más comunes del género *Candida*, como el Uni-Yeast-Tek, el API 20C o el AMS Yeast Biochemical Car. En este tipo de sistemas se emplea una serie de pocillos plásticos separados, cada uno de los cuales contiene un carbohidrato deshidratado u otro sustrato bioquímico. Luego de la inoculación de la levadura que se desea identificar, las cartillas inoculadas se colocan en el módulo combinado de incubación y lectura del instrumento respectivo y diodos luminosos dispersos leen con intervalos frecuentes en busca de turbidez.

Las señales electrónicas entran en una microprocesadora desde la cual se imprimen en una tarjeta, códigos de microorganismos generados por una computadora. Los sistemas son relativamente costosos y se limitan entonces a laboratorios con la cantidad de trabajo suficiente como para que su uso sea efectivo para el costo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Este tipo de sistemas de identificación, específicamente, el API 20C auxonograma ha sido comparado con la prueba de tubo germinal concluyéndose que el API 20C auxonograma tiene un porcentaje relativamente elevado de especies que dan tubo germinal positivo y que no son identificadas como *C. albicans*, aunado a esto, tenemos que hubo un número significativo de levaduras cuya identificación no mostró ser totalmente confiable (4).

Por lo anterior, retoman importancia las pruebas que nada tienen que ver con sistemas automatizados cuyos errores técnicos y alto precio los hacen poco favorables.

Aproximadamente 90% de todas las *C. albicans* aisladas clínicamente producen clamidosporas cuando son inoculadas por la técnica de Daimau (Ver procedimientos) y aproximadamente 95% de todas las *C. albicans* y *C. stellatoidea* aisladas clínicamente producen tubo germinal cuando son inoculadas en suero a 37°C por tres horas (4).

En un estudio que comparó el sistema Albitrip que es un método de identificación de colonias de *C. albicans* en 5 minutos, pero relativamente caro, contra la prueba del tubo germinal utilizando como referencia el sistema API 20C, se encontró que el tubo germinal es 98% sensible y 95% específico (4).

Aunque no se tiene información acerca de la sensibilidad y la especificidad de la prueba de producción de clamidosporas y tomando en cuenta la anterior comparación de la prueba de tubo germinal con un nuevo sistema utilizando como referencia el método automatizado API 20C, en la cual se puede observar que la producción de tubo germinal es muy confiable, la prueba de producción de clamidosporas debería de complementarse con otra para la identificación de especie (4).

Es importante hacer notar que la bibliografía revisada se refiere indistintamente al uso de las pruebas para la identificación de *C. albicans* y que posiblemente el uso más generalizado de la prueba de producción del tubo germinal sea por su sencillez, relativa rapidez y bajo costo, considerando que las características anteriormente mencionadas se pueden equiparar con las de la producción de clamidosporas, se pretendió entonces determinar la confiabilidad de esta última, lo cual nos permitió valcarla como prueba para la identificación definitiva de *C. albicans* y en caso de aceptarla se tendrían datos de sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica sobre los cuales sustentar su empleo

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para llegar a un tratamiento satisfactorio de la candidiasis es necesario un riguroso seguimiento a nivel clínico y diagnóstico que permita el régimen terapéutico adecuado. Por tanto, es indudable que el laboratorio clínico juega un papel muy importante en la prevención y el control de esta patología

Tradicionalmente, la identificación del agente etiológico de la candidiasis se realiza mediante su aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales, observación microscópica e identificación por medio de pruebas bioquímicas (auxonograma y zimograma) y especiales (producción de tubo germinal y de clamidosporas). La presencia de tubo germinal proporciona, con fines prácticos, la identificación de *C. albicans*, si la prueba se realiza como lo describe el método, sin embargo, en ocasiones esta técnica puede no ser satisfactoria puesto que varias especies de levaduras pueden dar falsos positivos o negativos variando algunas de las condiciones del método, por lo que una prueba negativa no es definitiva y son entonces necesarias pruebas adicionales para evitar diagnósticos erróneos, que conllevan a un tratamiento terapéutico inadecuado y por tanto a infecciones recurrentes (1, 2, 4, 5, 6).

Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo la determinación del grado de confiabilidad y por consiguiente el valor diagnóstico de la prueba de producción de clamidosporas, de la cual no se encontraron valores reportados de sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica, en la

bibliografía revisada y por tanto se desconocen. Se utilizó como referencia la producción de tubo germinal, con lo cual, se tiene una técnica alternativa (prueba de producción de clamidosporas) que puede ser utilizada como prueba confirmativa, teniendo datos obtenidos experimentalmente, de sensibilidad y especificidad sobre los cuales apoyar su empleo.

El método en estudio se sometió a pruebas para determinar su confiabilidad, las cuáles fueron, el cálculo de su sensibilidad, especificidad, valor predictivo y potencia diagnóstica, y que por tanto dan la pauta para recomendar su uso en los estudios clínicos y epidemiológicos (12,13,44,47,49).

Es necesario hacer notar que además de la valoración del método de producción de clamidosporas, se estudió por otro lado, el efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de tubo germinal, con esto se evaluó la confiabilidad de la prueba de tubo germinal, pues la reducción del tiempo de incubación disminuirá la probabilidad de falsos positivos (48).

3.OBJETIVO.

Se determinó la sensibilidad especificidad y potencia diagnóstica de la producción de clamidosporas en cepas de *C. albicans* comparándose con las de la prueba de referencia producción de tubo germinal.

4.HIPOTESIS.

Si la prueba de producción de clamidosporas permite la identificación de *C. albicans* con una sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica mayor a 80%, teniendo como referencia la producción de tubo germinal que es la más empleada por sencilla, rápida y de bajo costo, se contará entonces con un método diagnóstico clínico con una confiabilidad adecuada, práctico y económico que puede ser aplicado como una alternativa de identificación de *C. albicans* en los laboratorios microbiológicos

5.DISEÑO DE INVESTIGACION.

5.1. Tipo de estudio.

La investigación se realizó de acuerdo a un estudio de tipo observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

5.2. Población.

Se estudiaron cepas serotipificadas ATCC

- 7 cepas de *C. albicans*.
- 2 de *C. stellatoidea*
- 1 de *C. tropicalis*
- 1 de *C. guilliermondii* serotipificadas

5.3. Criterios de inclusión y exclusión.

- Fueron incluidas cepas viables ATCC (las antes mencionadas)
- Se incluyeron cepas resembradas de 48 horas de incubación
- Los sueros empleados fueron de concentraciones de glucosa entre 150-270 mg/dl y posteriormente de 100-120 mg/dl

5.4. Variables.

Variable dependiente Producción de clamidosporas y de tubo germinal

Variable independiente Medio de cultivo utilizado, temperatura de incubación, tiempo de incubación, método de inoculación, tamaño de inóculo.

Variable	Nivel de medición
Producción de clamidosporas	Véase tabla 1 7 2 y Fig 1 2 2
Medio de cultivo utilizado	Agar harina de maíz tween 80 u otro específico para el fin
Temperatura de incubación	30°C
Tiempo de incubación	24 a 48 horas
Método de inoculación	Método Dalmau (Ver procedimiento)
Tamaño de inóculo	Inóculo diluido aprox. un millón de células/ ml
Producción de tubo germinal	Véase Fig 1 2 1 y 1 7 1
Concentración de glucosa en suero	150-250 mg/dl y 100-120 mg/dl
Temperatura de incubación	37°- 40°C
Tiempo de incubación	1.5- 2 horas
Tamaño de inóculo	Asada de una suspensión de células equivalente al tubo No.2 de Mc Farland.

5.5. MATERIAL.

Tubos de ensayo	13 x 100 mm
Copillas de plástico	
Matraces Erlenmeyer	1000 ml
Matraces Erlenmeyer	500 ml
Pipetas graduadas	1.0 ml
Pipetas graduadas	5.0 ml
Portaobjetos	25 x 75 mm
Cubreobjetos	22 x 22 mm
Cajas Petri	
Pipetas Pasteur	
Asa bacteriológica	
Mechero Fisher	
Gradillas	
Gautes de asbesto	

Guantes de cirujano
Tripie metálico
Teja de alambre con asbesto
Termómetro
Masking tape
Marcador de tinta permanente
Lápiz graso
Espátula

5.6.EQUIPO.

Microscopio óptico binocular
Incubadora
Autoclave
Balanza analítica
Refrigerador

Carl Zeiss de México
20-60°C Riessa ECML
Equipar
Mettler H80
American

5.7.SUSTANCIAS.

Fco. Agar glucosa Sabouraud 4%
Fco. Agar para clamidosporas

Merck cat. 5438
Bioxon cat. 273-1

Suero humano patológico
Suero humano normal
Agua destilada

151-270 mg/ dl de glucosa
90 - 120 mg / dl de glucosa

5.8. TECNICAS.

Se realizaron las pruebas de tubo germinal y producción de clamidosporas a cada cepa (ver cuadro 5 8 1), repitiendo cada prueba 15 veces.

Procedimiento para la prueba de referencia (producción de tubo germinal).

Se suspendió una pequeña porción de la colonia de la levadura en una copilla de plástico con 0.5 ml de suero humano patológico (150-270 mg/dl de glucosa). Los tubos inocuados se incubaron a 37°C durante 1.5 horas. Luego de la incubación se colocó una gota de la suspensión de levadura en un portaobjetos y se examinó con objetivo 10X en busca de tubos germinales. Fig. 1 2.1. y 1 7.1.

Procedimiento para la producción de clamidosporas (Técnica de Dalmau).

Se inoculó una placa de agar para clamidosporas haciendo tres cortes paralelos a 10 mm de distancia entre sí, con un ángulo de 45°. Fig 5 8 1. Se tapó la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. Luego de la incubación se examinaron las áreas de crecimiento con objetivos 10X y 40X. Se observaron los patrones de crecimiento y se interpretaron los resultados usando los criterios descritos en la tabla 1.7.2 y Fig. 1.2.2.

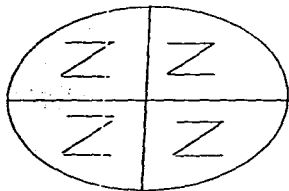
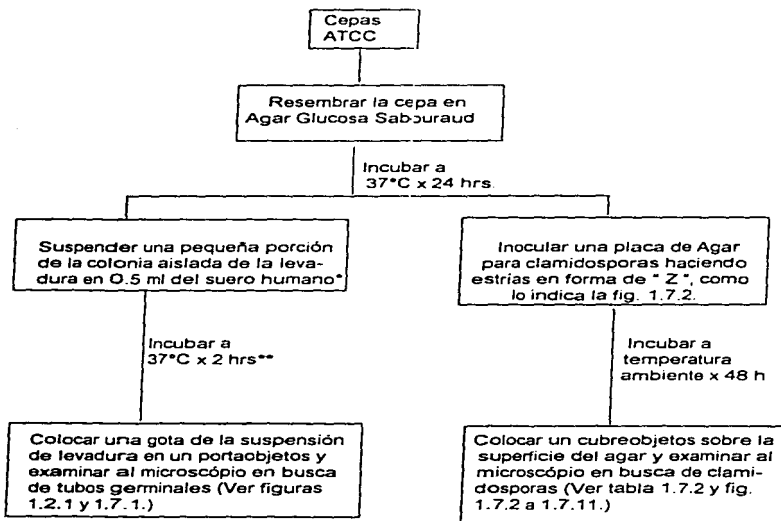


Fig. 5.8.1. Forma de siembra en Z para la producción de clamidosporas.

CUADRO 5.8.1.

DÍAGRAMA DE FLUJO DE LA TÉCNICA DE COMPARACION DE METODOS DE IDENTIFICACION.



* La concentración de glucosa utilizada fue de 150 a 200 mg / dl para el primer ensayo y posteriormente se empleo concentración menor a 120 mg / dl.

** El tiempo de incubación de 2 hrs., es el mencionado en el método de referencia pero se realizó una serie de ensayos prolongando el tiempo hasta 3 hrs.

Fuente: Modificado del cuadro A.

6.DISEÑO ESTADISTICO.

Según el nivel de medición de las variables que se estudiaron así como las características del tipo de estudio que se llevó a cabo, los resultados obtenidos se sometieron al análisis estadístico propuesto en el Teorema de Bayes. Cuadro 6.1.1.

CUADRO 6.1.1.

**Tabla de contingencia estadística
Teorema de Bayes**

Prueba de referencia.
(Producción de tubo germinal)

Prueba de diagnóstico. (Producción de clamidosporas)	+	-	Total
+	A	B	A+B
-	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

A = número de casos verdaderos positivo

B = número de casos falsos positivo

C = número de casos falsos negativo

D = número de casos verdaderos negativo

6.1.FORMULAS ESTADISTICAS.

Sensibilidad	$S = A / A + C$
Especificidad		$E = D / B + D$
Valor predictivo positivo	$VPP = A / A + B$
Valor predictivo negativo		$VPN = D / C + D$
Indice de falsos positivos	$IFP = B / A + B$
Indice de falsos negativos		$IFN = C / C + D$
Potencia diagnóstica	$PD = (A+D) / (A+B+C+D)$

VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo, IFP: Índice de falsos positivo
IFN: Índice de falsos negativos, A: Verdaderos positivos, B: Falsos positivos, C: Falsos negativos,
D: Verdaderos negativos, PD: Potencia diagnóstica.

7.RESULTADOS.

Tabla 7.1. Frecuencia de resultados por cepa para la prueba de tubo germinal (empleando suero con concentración de glucosa de 150 a 250mg /dl)

Cepa	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	CT	CS1	CS2	CG
P	13	14	14	14	15	15	13	0	0	1	4
N	2	1	1	1	0	0	2	15	15	14	11

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

A1 - A7 *Candida albicans* Cepas de 1 a 7

CT: *Candida tropicalis*

CS1 y CS2: *Candida stellatoidea* Cepas 1 y 2

CG: *Candida guilliermondii*

Tabla 7.2. Frecuencia de resultados por cepa para la prueba de producción de clamidosporas realizada simultáneamente con la prueba de tubo germinal de la tabla 7.1

Cepa	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	CT	CS1	CS2	CG
P	15	15	14	14	15	15	13	0	0	0	2
N	0	0	1	1	0	0	2	15	15	15	13

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

A1 - A7 *Candida albicans* Cepas de 1 a 7

CT: *Candida tropicalis*

CS1 y CS2: *Candida stellatoidea* Cepas 1 y 2

CG: *Candida guilliermondii*

Tabla 7.3. Frecuencia de resultados por cepa para la prueba de tubo germinal (empleando concentración de glucosa de 100- 200 mg / dl).

Cepa	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	CT	CS1	CS2	CG
P	4	5	5	4	3	5	4	0	0	0	1
N	1	0	0	1	2	0	1	5	5	5	4

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

A1 - A7: *Candida albicans* Cepas de 1 a 7

CT: *Candida tropicalis*

CS1 y CS2: *Candida stellatoidea* Cepas 1 y 2.

CG: *Candida guilliermondii*

Tabla 7.4. Frecuencia de resultados por cepa para la prueba de producción de clamidosporas realizada simultáneamente con la prueba de tubo germinal de la tabla 7.3.

Cepa	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	CT	CS1	CS2	CG
P	5	5	5	5	3	5	5	0	0	0	1
N	0	0	0	0	2	0	0	5	5	5	4

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

A1 - A7: *Candida albicans* Cepas de 1 a 7

CT: *Candida tropicalis*

CS1 y CS2: *Candida stellatoidea* Cepas 1 y 2.

CG: *Candida guilliermondii*

Tabla 7.5. Frecuencia de resultados por cepa para la prueba de tubo germinal (realizando la prueba en un tiempo de 3 horas).

Cepa	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	CT	CS1	CS2	CG
P	5	5	5	5	5	5	5	1	2	2	1
N	0	0	0	0	0	0	0	4	3	3	4

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

A1 - A7: *Candida albicans* Cepas de 1 a 7

CT: *Candida tropicalis*

CS1 y CS2: *Candida stellatoidea* Cepas 1 y 2

CG: *Candida guilliermondii*

Tabla 7.6. Frecuencia de resultados por cepa para la prueba de producción de clamidosporas realizada simultáneamente con la prueba de tubo germinal de la tabla 7.5.

Cepa	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	CT	CS1	CS2	CG
P	5	5	5	5	3	5	5	0	0	1	0
N	0	0	0	0	2	0	0	5	5	4	5

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

A1 - A7: *Candida albicans* Cepas de 1 a 7

CT: *Candida tropicalis*

CS1 y CS2: *Candida stellatoidea* Cepas 1 y 2

CG: *Candida guilliermondii*

Tabla 7.7. Confiabilidad diagnóstica del método de producción de clamidosporas con respecto a la prueba de tubo germinal para la identificación de especies de Candida.

Prueba estadística

	P	S	N	E	VPP	VPN	IFP	IFN	PD
TG*	103	100	62	100	100	100	0	0	100
CL	101	89	64	86	91	83	8.9	17	88

P: Frecuencia de positivos
 N: Frecuencia de negativos
 S: Sensibilidad
 E: Especificidad
 PD: Potencia diagnóstica
 TG: Tubo germinal
 CL: Clamidosporas

VPP: Valor predictivo positivo
 VPN: Valor predictivo negativo
 IFP: Índice de falsos positivos
 IFN: Índice de falsos negativos

*Para la prueba de tubo germinal se empleó suero humano con una concentración de glucosa entre 150- 250 mg/ dl.

Tabla 7.8. Confiabilidad diagnóstica del método de tubo germinal realizado a una concentración de 150 mg/dl en relación a la misma prueba efectuada a una concentración de 120 mg/dl para la identificación de *Candida albicans*.

Prueba estadística

	P	S	N	E	VPP	VPN	IFP	IFN	PD
TG	34	100	21	100	100	100	0	0	100
TG*	31	86	24	95	97	79	3.2	21	89

P: Frecuencia de positivos

N: Frecuencia de negativos

S: Sensibilidad

E: Especificidad

PD: Potencia diagnóstica

TG: Tubo germinal

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

IFP: Índice de falsos positivos

IFN: Índice de falsos negativos

*Para la prueba de tubo germinal se empleó suero humano con una concentración de glucosa entre 100-120 mg/dl en comparación con la técnica de referencia que utiliza suero humano con glucosa entre 150-270 mg/dl.

Tabla 7.9. Confiabilidad diagnóstica del método de producción de tubo germinal a 3 horas de incubación en relación con la técnica de referencia que emplea 2 horas de incubación, para la identificación de *Candida albicans*.

Prueba estadística

	P	S	N	E	VPP	VPN	IFP	IFN	PD
TG	36	100	19	100	100	100	0	0	100
TG**	41	97	14	65	83	93	17	7	85

P: Frecuencia de positivos
 N: Frecuencia de negativos
 S: Sensibilidad
 E: Especificidad
 PD: Potencia diagnóstica
 TG: Tubo germinal

VPP: Valor predictivo positivo
 VPN: Valor predictivo negativo
 IFP: Índice de falsos positivos
 IFN: Índice de falsos negativos

**La prueba de tubo germinal se realizó en un tiempo de 3 horas, mientras que la técnica de referencia se efectúa en un lapso de 2 horas.

En la tabla 7.7. se observa que la confiabilidad diagnóstica de la prueba de producción de clamidosporas empleando la técnica de Dalmau es 88 % lo que indica que la prueba es confiable, observándose además unos valores de sensibilidad y especificidad aceptables.

En la tabla 7.8. se tiene que la confiabilidad diagnóstica de la prueba de tubo germinal realizada con suero humano con valores de glucosa menores a 120 mg / dl es de 89 % lo que indica que es una prueba confiable además de específica y sensible dados sus valores de 86 % y 95 % respectivamente.

En la tabla 7.9. podemos observar que la confiabilidad diagnóstica de la prueba de tubo germinal realizándola en un tiempo de tres horas es de 85 %, valor relativamente más bajo a lo observado realizando el método estándar de dos horas, pero además, el índice de falsos positivos aumenta considerablemente lo que repercute en su especificidad que disminuye a 65 %.

8. ANALISIS DE RESULTADOS.

La identificación de levaduras es, dentro del diagnóstico microbiológico, una parte considerable del trabajo de laboratorio ya sea, por el tiempo necesario para su aislamiento o por las rutinas empleadas en su identificación

Dado el auge que han tomado las técnicas serológicas y los métodos automatizados de identificación de levaduras, se ha tenido la necesidad de buscar un método que sea accesible, reproducible y rápido debido a que hay laboratorios que no cuentan con la cantidad suficiente de trabajo como para que el uso de métodos serológicos o automatizados sea costearable

Si bien, anteriormente la prueba de producción de clamidosporas era recomendada como útil para la identificación de *C. albicans* y otras especies, al desarrollarse la prueba de tubo germinal, reemplazó a la primera por su sencillez y rápida ejecución

No obstante, la prueba de tubo germinal tiene el inconveniente de que al realizarse en un medio natural, no es fácil mantener constante su composición y por lo tanto varían los resultados, además de que hay algunos factores de procedimiento que aún cuando se pueden controlar hay variaciones de uno a otro ensayo, tal es el caso del tamaño del inóculo, la edad del cultivo así como el uso de sueros almacenados y mezclados

Por otro lado, la prueba de producción de clamidosporas maneja un medio sintético de composición constante y factores de procedimiento similares a la producción de tubo germinal.

Cuando una técnica de diagnóstico tiene muchos factores que influyen en el resultado (variables independientes), es indispensable un control estricto de cada uno de ellos, en el caso de la prueba de producción de tubo germinal, sería muy engorroso tratar de controlar variables como son, concentración de glucosa, pH y las sustancias presentes en el suero.

Como consecuencia de lo antes mencionado, se ha tratado de estandarizar este método empleando suero humano con diferentes concentraciones de las sustancias presentes en él (glucosa, calcio, cisteína, proteínas, urea, hemoglobina, etc). La presencia y concentración de estas sustancias pueden alterar los resultados. Además, se ha probado trabajar con pools de suero o con sueros individuales frescos o almacenados.

Todas estas consideraciones, se controlaron por medio de la utilización de un procedimiento reportado en la literatura, en donde se concluyó que las condiciones óptimas para la formación de tubo germinal son un pH entre 7.5 y 8.5 y una concentración de glucosa entre 151 y 270 mg/ dl, con las cuales se observará el tubo germinal en 1.5 horas. Sin embargo esto no se dió puesto que hubo que incubar exactamente 2.0 horas para que la proporción de tubo germinal formado pudiera reportarse como positivo o negativo (14).

Este mismo método se realizó empleando suero humano con valores de glucosa menores a 120 mg/ dl, con lo cual se valoró el efecto que produce la concentración de glucosa en la formación de tubo germinal. Se ha observado que la concentración de glucosa afecta de manera poco significativa a la formación de tubo germinal, ya que ésta se dió en menor proporción en suero humano con valores de glucosa bajos, aumentando ésta, en concentraciones de glucosa relativamente mayores (151 - 270 mg/dl).

A su vez el método se modificó en la incubación prolongándose hasta 3 horas con lo que pudo visualizarse la formación de tubo germinal en cepas diferentes de *C. albicans*. La importancia de este paso radica en que, con esto se comprueba que cepas no *C. albicans* pueden formar tubo germinal a períodos de incubación mayores a las dos horas establecidas por la técnica para el método de referencia.

En la realización de la prueba de tubo germinal, se observó que el uso de sueros almacenados puede disminuir la formación de éste o quizá se lleve a cabo más lentamente. Es claro que el almacenamiento de un suero produce una modificación en sus características fisicoquímicas debido a la degradación de alguno o varios de sus componentes aun en condiciones de congelamiento y que ésto sea la causa de la disminución de la formación de tubo germinal.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Indiscutiblemente el tamaño del inóculo afecta la capacidad de formar tubo germinal debido al consumo de nutrientes por un mayor número de células, por lo cual, para la observación de un tubo germinal positivo, la asada debe ser pequeña o prepararse una suspensión de células con el tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland para que finalmente la cantidad de células por inóculo sea aproximadamente de un millón de células por mililitro, con esto se espera que todas las levaduras inoculadas tendrán contacto con los sustratos.

Cuando se utilizaron levaduras de cultivos de más de 24 horas de incubación ("viejos"), pudo distinguirse una baja capacidad para formar tubo germinal, esto a causa de la disminución de las funciones bioquímicas producida por la reducción de nutrientes del medio, lo cual produjo que aún cuando las células de levadura mostraron una baja capacidad de formación de tubo germinal, se alcanza la proporción requerida para dar un resultado positivo después del tiempo de incubación establecido, siendo un inconveniente para la sensibilidad de este método ya que estos cultivos se reportarían entonces como no *C. albicans*, si sólo se tiene el resultado de la prueba de tubo germinal.

Otro inconveniente encontrado a la prueba de tubo germinal es que el suero debe estar a temperatura ambiente al inocularlo pues se observó que tarda más tiempo en formarse el tubo germinal debido quizá a que la temperatura reportada como óptima para su formación es entre 37° y 41°C.

Comparando estos parámetros con lo observado en la prueba de producción de clamidosporas encontramos que, inicialmente, la preparación del medio para la formación de clamidosporas como se indica en el apéndice, es muy sencilla y por tanto, la posibilidad de que se cometan errores en la composición es mínima.

Según el estudio realizado por Kaminishi y cols. (1994) la completa aireación del cultivo y su incubación a temperaturas entre 26° y 28°C es determinante en la formación de las clamidosporas, ya que no se forman en condiciones anaerobias y al rebasar temperaturas de 30°C, por tanto, fue importante la incubación de las placas de agar inoculadas, a temperatura ambiente, a la cual se observó la óptima formación de clamidosporas.

En otro estudio, que investigó las condiciones particulares de *C. albicans*, se colocó la levadura en condiciones aerobias y anaerobias variando concentración y carbohidrato utilizado como nutriente. En este estudio se

encontró que el suministro adecuado de oxígeno es el factor que más influencia en el crecimiento de *C. albicans* y que cuando esta característica se cumple, se desarrollan tanto las formas de esporulación (clamidosporas) así como las formas invasivas (tubo germinal y pseudomicelio). (14)

Lo anterior se confirmó al incubar las placas de agar en bolsas de plástico a temperatura ambiente, con lo que se pensó evitar la contaminación, sin embargo, la formación de clamidosporas se inhibe observándose una baja o nula producción. Para probar este efecto, posteriormente se incubó toda la serie de placas de agar pero ahora en condiciones totalmente aerobias, observándose entonces la formación de clamidosporas.

En cuanto a la cantidad de inóculo necesaria para la formación de clamidosporas, tenemos que, al colocar inóculos espesos, tardaban más en formarse las clamidosporas y al inocular con cantidades pequeñas de levaduras, la formación se daba más rápidamente. Al no encontrarse totalmente esclarecidos, los mecanismos de transición de células de levadura a espora, no es fácil la explicación de fenómenos como el antes mencionado, sin embargo, se ha encontrado que el comportamiento de las levaduras es muy constante cuando las condiciones que se emplean son similares.

Una vez determinada la sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica de la prueba de producción de clamidosporas con diferentes cepas de *Candida*, tomando como referencia la de tubo germinal, se ha podido observar que tales parámetros son similares y que por consiguiente, es posible su utilización de modo indistinto además de que ya que los resultados son mayores al 80% (sensibilidad 89%, especificidad 86%, potencia diagnóstica 88%), se tiene, que el método alternativo es confiable y práctico; adaptable a todos los laboratorios de diagnóstico.

Paralelamente a la comparación de la prueba de producción de clamidosporas con la de tubo germinal, se comparó además, la prueba de tubo germinal utilizando suero humano con concentración de glucosa entre 100-120 mg/dl utilizando la prueba de tubo germinal con una concentración entre 150-270 mg/dl como prueba de referencia, esto se realizó con la idea de comparar el efecto que tiene la concentración de glucosa sobre la producción de tubo germinal. De igual manera se comparó la prueba de tubo germinal con concentración de glucosa entre 150-270 mg / dl pero ahora variando el tiempo de

incubación a tres horas con lo que se pretendió evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la producción de tubo germinal y por consiguiente el resultado de la prueba

En cuanto a la comparación con diferentes concentraciones de glucosa se observa que los resultados en ambas pruebas son aceptables siendo satisfactorios los valores de sensibilidad (86%) y especificidad (95%) de la prueba de tubo germinal a concentración de glucosa entre 100-120 mg/ dl. La potencia diagnóstica (89%) que se obtuvo para la prueba de tubo germinal a la concentración de ensayo es aceptable por lo que se puede concluir que las variaciones que se encontraron en los resultados son producidas por errores inherentes al trabajo experimental y a las variaciones biológicas relacionadas con las cepas, las cuales pueden considerarse como no significativas.

Analizando la comparación realizada a diferentes tiempos de incubación de la prueba de tubo germinal, se tiene un aumento en la frecuencia de positivos lo que conlleva a una disminución en el valor predictivo positivo (83%) pues hay menor posibilidad de que la prueba resulte positiva al estar presente la enfermedad. La notable disminución de la especificidad (65%) de la prueba al incubar durante tres horas se debe también a la mayor frecuencia de positivos observada pues la prolongación del tiempo de incubación provoca falsos positivos ya que levaduras diferentes a *C. albicans* pueden producir tubos germinales. La potencia diagnóstica (85%) aunque es aceptable, ha disminuido por lo anteriormente mencionado lo que confirma que las variaciones experimentales o los errores técnicos que puedan cometerse así como las variantes biológicas, influyen en los resultados.

El único inconveniente que muestra este procedimiento es el empleo de un medio de cultivo extra, lo que implica la necesidad de cajas Petri, el medio adecuado (agar para clamidosporas) y tiempo para su preparación.

9. CONCLUSIONES.

La producción de clamidosporas por células de *Candida albicans* fue evaluada como método de identificación utilizando como referencia la prueba de tubo germinal obteniéndose una confiabilidad diagnóstica aceptable (88%).

Las condiciones aerobias y el control de la temperatura de incubación son factores clave en las pruebas de producción de tubo germinal y de clamidosporas, siendo necesarios un óptimo suministro de oxígeno en ambas técnicas así como una temperatura entre 37°- 41°C y 25°- 29°C, respectivamente.

Se concluye entonces que ambas pruebas pueden utilizarse de manera indistinta en la identificación de cepas de *Candida*, pero que además, la utilización de los dos métodos simultáneamente contribuye a una mejor identificación avalada por dos métodos confirmativos de alta sensibilidad, especificidad y potencia diagnóstica.

Se puede entonces hacer mención del trabajo de Joshi y cols. (1993) quienes proponen un medio, el agar extracto de arroz tween 80 con el cual identificar morfológicamente especies de *Candida*. En éste, es posible observar primero la formación de tubo germinal incubándolo a 37°C durante 3 horas y posteriormente, la aparición de clamidosporas y micelio cuando se incuba a 25°C de 24 a 72 horas.

10. APENDICE.

Fórmula y preparación de medios de cultivo

AGAR DE DEXTROSA Y PAPA.

Fórmula aproximada en gramos por litro

Infusión de papa	200
Dextrosa	20
Agar	15

pH final 5.6 ± 0.2

Preparación:

Suspender 39 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Rehidratar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Una vez esterilizado enfriar a unos 40°- 50°C y vaciar en cajas de Petri.

Usos:

Se emplea en el aislamiento e identificación de hongos y levaduras de acuerdo con su morfología colonial o en métodos de microcultivo en portaobjetos.

AGAR BIGGY

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Citrato de amonio y bismuto	5.0
Sulfito de sodio	3.0
Dextrosa	10.0
Glicina	10.0
Extracto de levadura	1.0
Agar	15.0

pH final 6.8 ± 0.2

Preparación.

Suspender 45 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Hidratar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante no más de un minuto. Dejar enfriar a 45° - 50°C. Agitar circularmente y vaciar en cajas de Petri estériles, utilizando aproximadamente 20 ml para cada placa. No esterilizar en autoclave.

Usos

El agar Biggy es útil para aislar *C. albicans* y *C. tropicalis* y para la identificación de especies por medio de la reacción de sulfuro según Nickerson (57). (Ver tabla 1.1)

AGAR GLUCOSA SABOURAUD.

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Mezcla de peptonas	10.0
Glucosa	40.0
Agar	15.0
pH final	5.6±0.2

Preparación.

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Hidratar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 118°- 121°C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

Usos.

Se emplea en el aislamiento y conservación de hongos patógenos y saprófitos.

Cuando los materiales en estudio estén altamente contaminados, el aislamiento mejora si se añaden al medio sustancias antimicrobianas selectivas.

Para disminuir el crecimiento de otros microorganismos se usan varios inhibidores como el telurito, sales biliares y colorantes.

AGAR PARA CLAMIDOSPORAS

Fórmula aproximada en gramos por litro

Agar	15.0
Sulfato de amonio	1.0
Fosfato monopotásico	1.0
Azul de Tripán	0.10
Polisacáridos purificados	20.0
Biotina	5.0 mcg

pH final 5.1 ± 0.2

Preparación.

Suspender 37g del polvo en un litro de agua destilada. Hidratar por 10 minutos. Calentar con agitación continua y hervir un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos. Vaciar en cajas Petri (12 ml por caja de 9 - 10 cm de diámetro).

Usos.

Medio especial que promueve y favorece la formación de clamidosporas por *Candida albicans* (10). Una tensión ligeramente baja de oxígeno resulta óptima para la obtención de clamidosporas por lo que la resiembra deberá hacerse por incisión profunda.

Si desea preparar este medio aún más selectivo: dejarlo enfriar entre 45° - 50°C y agregar 40 unidades de penicilina, 40 microgramos de estreptomycinina y de 0.1 - 0.5 mg de cicloheximida por ml de medio de agar para clamidosporas. Hay que tomar en cuenta que un cierto número de especies de *Candida* son inhibidas por 0.5 mg de cicloheximida. Sin embargo, la mayor parte de las cepas de *Candida albicans* son resistentes a 5 mg / ml de dicha droga. Pueden utilizarse otras mezclas antimicrobianas como Polimixina B (6000 unidades) + Bacitracina 100 mg + 100 mg de Cicloheximida en un litro de medio de cultivo; o bien, 50 mg de Cloranfenicol en 1000 ml de medio.

MEDIO BASE PARA LA FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS PARA LA IDENTIFICACION DE LEVADURAS.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona	10
Cloruro de sodio	5
Extracto de carne	3
Hidróxido de sodio 1N	1 ml
Agua destilada	1 L

Preparación del indicador púrpura de bromocresol.

Disolver 0.04 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de agua destilada. Agregar una pequeña cantidad de NaOH 1 N para alcalinizar la solución y dejar reposar durante la noche.

Después que el colorante está en la solución, agregar HCl 1 N hasta alcanzar el pH neutro.

Preparación de tubos con medio base.

Usar tubos de 18 mm x 15 mm conteniendo 9 ml de caldo con indicador y un tubo invertido de Durham. Agregar 100 ml de indicador a un litro de caldo de fermentación. Esterilizar medio de caldo con indicador en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Agregar 0.5 ml de la solución de almacenamiento de carbohidratos a los tubos de medios con indicador inmediatamente antes de usar.

Usos:

Las pruebas de fermentación de carbohidratos son útiles como complemento de los resultados de las pruebas de asimilación de carbohidratos en la identificación definitiva de especies de levaduras recuperadas de muestras clínicas.

AGAR BASE NITROGENADA LEVADURA.

Procedimiento de preparación

Preparar una solución de agar al 2% (20 g de agar por litro de agua destilada) Colocar en autoclave durante 15 minutos a 121°C/psi.

Disolver 6.7 g de base nitrogenada-levadura en 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6.2 - 6.4 agregando NaOH 1 N. Descartar 12 ml de la solución. Esterilizar por filtración a través de un filtro Millipore apropiado. Agregar 88 ml de base nitrogenada levadura y 100 ml de indicador púrpura de bromocresol, preparado como para la fermentación de carbohidratos, a un litro de la solución de agar al 2%. Verter en cajas de Petri estériles.

Usos:

Las pruebas de utilización de carbohidratos se usan ampliamente para la identificación definitiva de las levaduras de importancia clínica empleándose como medio el agar base nitrogenada levadura y discos de papel filtro impregnados en carbohidratos que pueden ser comerciales o preparados sumergiendo discos de papel filtro de 70 mm de diámetro en una solución de carbohidratos al 1% y secando antes de usar.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Finegold S M, Baron E J. Diagnóstico microbiológico. 7ª ed Argentina Editorial médica panamericana; 1989 659 - 667
2. Koneman E W, Roberts G D. Micología 3ª ed Argentina Editorial médica panamericana; 1987. 175 - 191
3. Perea E. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica España Doyma 1992: Vol II: 1089 - 1100
4. Tay Z J. Microbiología y parasitología médicas. México: Méndez editores. 1993: 4 98 - 4. 107
5. Mandell G, Douglas G, Bennett J. Enfermedades infecciosas 3ª ed Argentina Editorial médica panamericana, 1991 vol I 1003 - 1016
6. Lennette E H. Manual de microbiología clínica 4ª ed. Argentina. Editorial médica panamericana. 1987: 666 - 670
7. Hoeprich P. Tratado de enfermedades infecciosas. España. Salvat editores. 1982: 372 - 382, 442 - 445.
8. Joklik W K, Willet H P, Amos D B. Microbiología. 18ª ed Argentina Editorial médica panamericana, 1986. 1334 - 1342.
9. Pumarola A, Rodríguez T, García R, Piedrola A. Microbiología y parasitología médica España, Ediciones científicas y técnicas S.A. 2ª ed 1987. 747 -758 y 779 -785.
10. Nickerson W, Mankowski Z. Polysaccharide medium of known composition favoring chlamydospore formation in *Candida albicans* J Inf Dis 1953, 92 20-25.
11. Davis B, Dulbeco R, Eisen H, Ginsberg H. Tratado de microbiología México. Salvat editores. 3a. ed. 1984 666- 667, 684- 685.
12. Espinosa F R. Estudio de confiabilidad diagnóstica de un método simplificado para el diagnóstico de cervicovaginitis infecciosa Tesis de licenciatura ENEP Zaragoza UNAM México, 1991.
13. Vega N M. Probabilidad diagnóstica de cultivo cervicovaginal en serie de tres en mujeres mayores de 60 años. Tesis de licenciatura ENEP Zaragoza UNAM México, 1992
14. Sherris J C, Champoux J, Corey L y cols. Microbiología médica 2ª ed España Doyma, 1993: 713 - 720, 727 - 734
15. Ryan K. Microbiología médica. Argentina Editorial médica panamericana 1989. 243-247, 249-253
16. Koneman E W, Allen E D, Dowell D R y cols. Diagnóstico microbiológico Texto y atlas a color. 3ª ed. Argentina. Editorial médica panamericana. 1992 657 - 678, 701 - 707.
17. Deacon J. Introducción a la micología moderna México. Limusa, 1988: 308-309.
18. Venugopal P V, Venugopal T P. Superficial mycoses in Saudi Arabia. Australas J Dermatol. 1992; 33: 45-48

-
19. Koenig H, Barale T, Reboux G, Comerlynyck P, Bonnin A, Kures L, Percebois G, Toubas D, Pinon J M, Vernet V et al. Multicenter study of 435 yeast strains isolated from 116 000 hemocultures. *Ann Biol Clin* 1991; 41: 367-372.
 20. Avonts D, Sercu M, Heyerick P, Vandermeeren I, Piot P. Sexually transmitted diseases and *Chlamydia trachomatis* in women consulting for contraception. *J R Coll Gen Pract* 1989; 39: 418-420.
 21. Ginter G, Soyer H, Rieger E. Vaginal yeast colonization and promiscuity. A study of 197 prostitutes. *Mycoses* 1992; 35: 177-180.
 22. Horowitz B J, Guajunta D, Ito S. Evolving pathogens in vulvovaginal candidiasis: implications for patient care. *J Clin Pharmacol* 1992; 32: 248-255.
 23. Sherertz R J, Raad I I, Belani A, Koo L C, Rand K H, Pickett D L, Straub S A, Fauerbach L L. Three year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 76-82.
 24. Sweet R. Importance of differential diagnosis in acute vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152: 921-923.
 25. Sanford J, Gilbert D, Sande M. Guía de tratamiento antimicrobiano. México: Intersistemas, 1995: 66-68.
 26. Braude I. *Microbiología clínica*. Argentina: Editorial medica panamericana, 1984: 733-741.
 27. Kaminishi H, Iwata A, Tamaki T, Cho T, Hagihara Y. Spiral hyphae of *Candida albicans* formed in anaerobic culture. *Mycoses* 1994; 37: 349-352.
 28. Bioxon. *Manual de medios de cultivo*. México: 1989: 22, 23, 25, 26.
 29. Mackenzie D W. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol* 1962; 15: 563-565.
 30. Taschdjian C, Burchall J, Kozinn P. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *Am J Dis Child* 1960; 99: 212-215.
 31. Bruatto M, Gremmi M, Vidotto V. A new minimal synthetic medium for germ tube production in *Candida albicans*. *Mycopathology* 1991; 116: 159-163.
 32. Bakerspigel A. A preferred method for the routine identification of *Candida*. *J Infect Dis* 1954; 94: 141-143.
 33. Dutt-Choudhuri R, Dutt R. A simple medium for the demonstration of chlamydospores of *Candida albicans*. *Nature* 1961; 189: 418.
 34. Gutiérrez J, Maroto C, Piedrola G, Martín E, Pérez J. Circulating *Candida* antigens and antibodies: useful markers of candidemia. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2550-2552.
 35. Fujita S, Hashimoto T. Detection of serum *Candida* antigens by enzyme linked immunosorbent assay and a latex agglutination test with anti-*Candida albicans* and anti-*Candida krusei* antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3132-3137.
 36. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990; 48: 27-36.
 37. Fricker H, Monget D, Lebeau B, Babolat M, Ambrose-Thomas P, Grillot R. Rapid identification of *Candida albicans*: evaluation of "Rapidec albicans". *Ann Biol Clin* 1992; 50: 103-106.
-

-
38. Perry J, Miller G, Carr D. Rapid colorimetric identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 614-615.
 39. Monteagudo C, Marcilla A, Mormeno S, Lombart-Bosch A, Sentandreu R. Specific immunohistochemical identification of *Candida albicans* in paraffin embedded tissue with a new monoclonal antibody (1B12). *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 130-135.
 40. Kan V. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* 1993; 168: 778-783.
 41. Simpanya M. Identification of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* with an umbelliferyl-labelled galactosaminide. *J Med Microb* 1995; 43: 230-233.
 42. Roussele P, Freydiere A, Couillerot P, de Montclos H, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans I D and fluoro-plate agar plates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3034-3036.
 43. Mc Ginnis M. Laboratory handbook of medical mycology. U S A. Academic Press; 1980: 357 - 359, 364 - 366.
 44. Eschenbach D, Hillier S. Advances in diagnostic testing for vaginitis and cervicitis. *J Rep Med* 1989; 34: 555 - 564.
 45. Doolet D, Beckius M, Jeffrey B. Mis identification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2889-2892.
 46. Aly F, Blackwell C, Mackenzie D, Wair D. Identification of oral yeast species isolated from individuals with diabetes mellitus. *Mycoses* 1995; 38: 107-110.
 47. Dealler S. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. *J Clin Microb* 1991; 29: 1081 - 1082.
 48. Henry J. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. España. Ediciones científicas y técnicas. 9ª ed. 1593: 1172 - 1174.
 49. Samiy A H, Douglas G R, Barondess J A. Diagnóstico clínico en medicina. España. Doyma; 1992: 17 - 24.
 50. Sobel J D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Gynecol* 1985; 152: 924 - 934.
 51. Wilson J D, Braunwald E, Isselbacher K y cols. Principios de medicina interna 12ª ed. México: Interamericana; 1991. vol I: 874 - 875.
 52. Mc Ginnis M, Borgers M. Current topics in medical mycology. New York: Springer-Verlag; Vol 3: 1989: 151 - 167.
 53. Howard D. Fungi pathogenic for humans and animal. Parte A. Biology. New York: Marcel Dekker; Vol 3: 1963: 353 - 361.
 54. Larone D. Medically important fungi: a guide to identification. U S A. Elsevier Scienc Publishing Co Inc. 2ª ed; 1987: 243 - 248.
 55. Bernhardt H, Zimmermann K, Knoke M. Dimorphism of *Candida albicans* in the model of continuous flow culture. *Mycoses* 1994; 37: 50-56.
 56. Joshi K, Solanki A, Prakash P. Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween 80. *Indian J Pathol Microbiol* 1993; 36: 48-52.
 57. Nickerson W. Culture medium a for isolation and differentiation of genus *Candida* yeasts. *J Inf Dis* 1953; 93: 32.
-

-
58. Concepción R R. Evaluación de la técnica de formación de tubo germinativo de *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* en suero humano Tesis de licenciatura ENEP Zaragoza UNAM México, 1990.
59. Conde G. Cervicovaginitis: una visión panorámica *Infectología* 1985; 30: 31-32.
60. Barlow A, Aldersley T, Chattaway. Factors present in serum and seminal plasma wich promote germ tube formation and mycelial growth of *C. albicans*. *J Gen Microbiol.* 1974, 82: 261- 272.
61. Mardon D, Hurst S, Balish E. Germ tube production by *C. albicans* in minimal liquid culture media. *Can J Microbiol.* 1971; 17: 851- 856.
62. Prasad R, Abu-Elteen K, Anand S, Anderson J, Bergen M, Cassone A, et al. *Candida albicans* cellular y molecular biology Germany: Springer-Verlag, 1996. 6.
63. Kwon-Chung K, Bennett J. *Medical micology* U S A: Lea and Febiger; 1992: 314, 315, 319-321.
64. Cole G, Hoch H. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals.* New York: Plenum Press, 1991: 50-4
65. Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J *Microbiología médica* España: Mosby Doyma; 1992. 343.