

68

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Primoaislamiento y diferenciación de especies de *Candida*,
utilizando medios de cultivo con sales inorgánicas
cromógenas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

28/8/97

PRESENTA:

LUCJA CAROLINA MARÍN VIGNANDO

México, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

~~1999~~

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

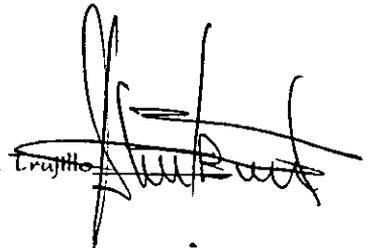
JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Gutiérrez Ramos Abel
Vocal Prof. Bonifaz Trujillo José Alexandro
Secretario Prof. González Jbarra Misael
1er. Suplente Bonilla Espinosa Eduardo
2º. Suplente Hernández Gómez Luciano

Sitio donde se efectuó este trabajo:

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, S.S.A.
LABORATORIO DE MICROLOGÍA
UNIDAD DE DERMATOLOGÍA

Asesor del tema M. en C. José Alexandro Bonifaz Trujillo



Supervisor técnico QFB Javier Araiza Santibañez



Sustentante Lucía Carolina Marín Vignando



DEDICATORJA

A ti Sr. Dios poderoso...

...que has dado significado y dirección a mi vida y que te has quedado a mi lado siempre.

A ustedes papá y mamá...

... por su amor, interés, tenacidad y paciencia. Si tuviera una oportunidad de volver a nacer y escoger padres, los escogería a ustedes.

A ti Gustavo...

... amor de mi vida, tú que has traído color a mi existencia, no hay palabras.

A ustedes, Vera y Luis...

... mis hermanos, mi tesoro profundo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por sostenerme, guiarme y fortalecerme.

Gracias papás por los grandes y pequeños detalles que apoyaron no sólo mi formación profesional, sino también la moral y física.

A Gustavo por impulsarme y estar a mi lado en todo.

Al prof. Alejandro Bonifaz por abrir su vida y enseñarme lo valioso del ámbito profesional.

A todos mis compañeros del laboratorio de micología.

A toda mi familia y amigos.

Al Hospital General S. S. A., Servicio de Dermatología, donde se me permitió realizar este trabajo.

A la UNAM, Facultad de Química, mi máxima casa de estudios.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	4
MARCO TEÓRICO	
Candidosis, generalidades.....	5
Micología.....	11
Diagnóstico de laboratorio.....	12
Otras técnicas de identificación de levaduras del <i>Género Candida</i>	
- Métodos convencionales.....	14
- Métodos de vanguardia.....	17
METODOLOGÍA.....	21
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	45
APÉNDICE.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	49

J N T R O D U C C I Ó N

La candidosis es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes a todos los niveles, de alta morbilidad y aumenta debido a que los factores predisponentes se han incrementado, como son: fisiológicos (cambios de pH en vagina y boca, embarazo, prematuridad), enfermedades o procesos debilitantes (diabetes, desnutrición, etc.), inmunodeficiencias primarias o adquiridas, factores iatrogénicos u otros. Esto da origen a diferentes tipos de candidosis, organizándose éstas en tres grandes grupos: mucocutánea, cutánea y sistémica [1,2].

Es importante remarcar que la etiología de la candidosis ha estado cambiando, ya que antes la especie predominante era *C. albicans* de 85-90% en casi todas las formas clínicas; ahora sigue siendo predominante, pero las no-albicans comienzan a emerger, incluso cada vez más se reportan casos de dos o más especies.

El diagnóstico de la candidosis es sencillo, basado en pruebas micológicas más que en inmunológicas. La identificación de las levaduras es simple, utilizándose pruebas fisiológicas y bioquímicas; sin embargo, siempre se necesita un primoaislamiento, es decir, la purificación de la cepa y la identificación completa. Recientemente han surgido nuevos medios de cultivo, que pueden desde la primera vez orientar en la

especie causal, con un muy alto grado de sensibilidad; esto tiene varias ventajas como son la rapidez con la que se puede saber la especie de que se trata, el abatimiento del costo (por no requerir pruebas bioquímicas y fisiológicas), y sobre todo, permite reconocer 2 ó más agentes etiológicos, cuando están causando mezclas parasitarias.

En base a lo anterior nosotros pretendemos con este estudio, hacer un medio de cultivo, que desde un primer aislamiento, podamos diferenciar entre los géneros de levaduras oportunistas, y sobre todo, las especies de *Candida* más frecuentes: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilopsis*, con el objetivo de incorporarlo posteriormente a una forma rutinaria de los aislamientos directamente de pacientes.

OBJETIVOS

1. Desarrollar un medio de cultivo selectivo y diferencial, así como para identificación de cepas oportunistas del género *Candida*.
2. Comprobar el uso diferencial del medio de cultivo desarrollado para el primoaislamiento, en una población de 100 pacientes con diversos tipos de candidosis.
3. Evaluar la sensibilidad y confiabilidad del medio de cultivo mediante la identificación tradicional de levaduras, con pruebas fisiológicas, bioquímicas e inmunológicas.

MARCO TEÓRICO

CANDIDOSIS

GENERALIDADES

La candidosis es una micosis que parasita piel, mucosas, y en ocasiones, diversas vísceras, por distintas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *C. albicans*. Esta enfermedad es cosmopolita y, sin temor a equivocarnos, es la micosis más frecuente en el mundo. No tiene preferencia por alguna edad en particular, ni por sexo, únicamente los casos genitales son más frecuentes en la mujer por las condiciones anatómicas propias de la vagina [1,22].

SINONIMIA: Candidiasis, moniliasis, muguet, algodoncillo, blastomicosis [1].

Los factores predisponentes más comunes son:

1. Factores fisiológicos: Cambios de pH, sobre todo en vagina y boca, embarazo, prematurez.
2. Enfermedades o procesos debilitantes: diabetes, tuberculosis, absceso hepático amibiano, desnutrición.

3. Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, SIDA y para el caso específico de la candidosis mucocutánea generalizada, agamaglobulinemias y síndrome de Di George.
4. Iatrogénicos: tratamientos prolongados con antibióticos, corticosteroides y citotóxicos; tratamientos anticonceptivos orales y dispositivos intrauterinos. Cateterismo y procesos quirúrgicos.
5. Miscelánea: dermatosis inflamatorias previas (dermatitis de contacto y del área del pañal), traumatismos ungueales, mal estado de la dentadura, prótesis mal adaptadas y humedad [1].

La mayoría de los casos de candidosis se dan de manera endógena, por lo tanto es necesario mencionar que los casos exógenos siempre se inician con el ingreso al organismo por grandes cantidades de levaduras, por ejemplo por cateterismo o drogadicción, ya que se inoculan directamente los microorganismos al torrente circulatorio [1].

La clasificación clínica de la candidosis es:

MUCOCUTÁNEA

- Oral
- Genital
- Gastrointestinal

- Broncopulmonar
- Mucocutánea-crónica

CUTÁNEA

- Intertrigos
- Onicomycosis
- Del área del pañal
- Pustulosis
- Granuloma

SISTÉMICA

- Septicemia
- Tracto urinario
- Meningitis
- Endocarditis
- Otras

Los microorganismos del género *Candida* son hongos levaduriformes oportunistas que se encuentran en la naturaleza, se han aislado del hombre, animales y de fómites contaminados. Cabe mencionar que su estado saprofítico solamente se aísla de mucosas, tales como oral, nasal, vaginal, tracto gastrointestinal. Se ha aislado de esputo, heces y orina de personas sanas, en cambio, no es habitual encontrarla en la piel y uñas en condiciones de salud. El niño al nacer puede recibir esta levadura al pasar por el tracto vaginal de la madre. En circunstancias especiales *Candida* se

transforma de comensal en oportunista y puede producir desde una simple infección bucal, hasta grave endocarditis o septicemia, de ahí su importancia [3,4,22].

Se ha atribuido la patogenicidad de *Candida albicans* a algunas toxinas de tipo proteolítico, esto comprueba por qué dos cepas de la misma especie pueden tener diferente virulencia [1].

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Candidosis mucocutánea:

- Oral: Estomatitis aftosa, lengua saburral, herpes, lengua geográfica, geotricosis.
- Vulvovaginitis: Infecciones por *Trichomona vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *C. glabrata*.
- Balanitis: Balanitis inespecíficas, herpéticas, luéticas, por *Trichomonas* y por *Neisseria gonorrhoeae*.
- Gastrointestinal: Amibiasis, geotricosis, salmonelosis, shigelosis.
- Broncopulmonar: Bronquitis bacteriana, tuberculosis, aspergilosis, criptococosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis, sarcoidosis.

Candidosis cutánea:

- Intertrigos infecciosos interdigitales, submamarios, inguinales y axilares:
Dermatitis de contacto, dermatofitosis, eritrasma.
- Candidosis del área del pañal: Dermatitis del área del pañal, dermatofitosis.
- Candidosis ungueal: Tiña de las uñas, onicomicosis por hongos levaduriformes y mohos, melanoma subungueal, infecciones bacterianas (*Pseudomonas sp.* y *Staphylococcus sp.*), dermatitis de contacto, deficiencias vitamínicas, liquen plano y psoriasis ungueal.
- Pustulosis cutánea: Foliculitis, acné, criptococosis.
- Granuloma candidósico: Granulomas dermatofíticos, tuberculosis verrucosa.

Otras:

- Endocarditis, septicemias e infecciones del tracto urinario: Con infecciones bacterianas.
- Meningitis: Criptococosis e infecciones bacterianas [1].

ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

1. La inmunidad que el hospedero presenta en defensa a estos agentes etiológicos es debida a la presencia de transferrina, anticuerpos e inmunidad celular, dicho en

orden creciente de importancia. La evaluación de esta se lleva a cabo básicamente con una intradermoreacción, utilizando un antígeno (candidina), que es un polisacárido de *N*-acetil glucosamina, que se ha subdividido en dos tipos: A y B: los que generan cruce antigénico con otras especies de *Candida* y especies de *Salmonella C-1*. El fin diagnóstico es correlacionando los resultados con títulos serológicos o para evaluar hipersensibilidad de pacientes alérgicos.

2. La serología es útil para casos de candidosis profundas y sistémicas: Las técnicas más utilizadas son intradermoreacción, aglutinación en látex, radioinmunoanálisis, inmunoelectroforesis, fijación de complemento, hemaglutinación y ELISA.

TRATAMIENTO

Tanto el medicamento, como el tipo de tratamiento dependerá del tipo de candidosis y del factor predisponente de la enfermedad en cada paciente, por lo que puede darse tópicamente (soluciones ácidas, básicas, violeta de genciana al 1%, nistatina, imidazoles y derivados carbamilados) y/o en tratamientos sistémicos (imidazoles, triazoles o hasta anfotericina B) [1].

MICOLOGÍA

Estas levaduras incluyen un variado número de especies, alrededor de 150, sobresaliendo *C. albicans*, la que dependiendo de la topografía de donde se aísle, se puede encontrar entre un 60 ó hasta un 85%. Su clasificación taxonómica es de la siguiente manera [1,2]:

CLASE: Deuteromycetes

SUBCLASE: Blastomycetidae

ORDEN: Criptococal

FAMILIA: Criptocaceae

GÉNERO: *Candida*

ESPECIES: *albicans*, *tropicalis*, *stellatoidea*, *krusei*, *parapsilopsis*, *pseudotropicalis*, *guilliermondii*, *famata*, *zylanoidea*, *lucitaneae* y *glabrata*, recientemente incluida en esta clasificación; entre las más importantes.

Su forma de reproducción es asexual, es decir, por gemación, y a estas estructuras se les denomina blastoconidias; pueden formar pseudomicelio (fase infectante) y/o verdadero micelio; generalmente son ureasa negativas, no forman cápsulas, pigmentos carotenoides ni almidón; no asimilan el inositol. *C. albicans* es la única que presenta estructuras reproductivas de resistencia llamadas clamidoconidias. Cuando

en el organismo ocurren ciertos cambios fisiológicos debido a diversos factores, como variaciones de pH, procesos debilitantes, inmunodeficiencias o ingesta de ciertos medicamentos, se favorece el desarrollo de estos microorganismos, provocándose así la enfermedad denominada candidosis [1,2,3].

DJAGNÓSTJCO DE LABORATORJO

En el laboratorio se analizan muestras de todo tipo, dependiendo de la candidosis, como secreciones, exudados, escamas, sangre, LCR, esputo, orina, etc.; y el análisis consta de los siguientes pasos para el diagnóstico:

1. Examen directo. Con este método sólo es posible demostrar la presencia de elementos micóticos o de levaduras en un tejido o en un producto de secreción. La muestra se coloca entre porta y cubreobjetos con KOH al 10% ó 20%, o con dimetilsulfóxido al 10% (basta con una gota), esto con el fin de aclararla, es decir, disolver la capa córnea de la piel; y puede acelerarse este proceso con un poco de calor. Una vez clarificada se observa al microscopio con los objetivos de 10X y 40X. La presencia de pseudofilamentos y blastoconidias son indicadores de la enfermedad, sólo en zonas donde no es flora habitual, como en las uñas, basta con

hallar blastoconidias para el diagnóstico patológico, ya que en esta zona no existe de manera comensal *Candida* [1,5].

2. Cultivo. Todas las especies del género en cuestión crecen en medios de cultivo ricos, sin embargo, con el fin de hacer selectivo su desarrollo, utilizamos medios pobres, pH ácido o la adición de algún antibiótico, para impedir el crecimiento de bacterias, con el propósito de evitar confusiones; las características coloniales en la mayoría de los medios son semejantes, es decir, dan colonias blanquecinas, cóncavas, cremosas, bordes regulares y opacas, y aparecen por incubación de 25-37° C de 2 a 3 días; de esta forma usamos medios como el Sabouraud Agar ó Micosel; el primero es pobre en nutrientes y el segundo contiene la misma base + cicloheximida (actidiona) y cloramfenicol en su formulación; sin embargo, el desarrollo de nuestras levaduras en estos medios sirve tan sólo para la determinación de su presencia y su aislamiento, pero si nuestro objetivo es la determinación de especies, requiero de más pruebas [1].

Existen otras pruebas útiles para la detección de estos microorganismos que nos ayudan en el diagnóstico, como son: biopsia (para casos cutáneos profundos), rayos X (en casos pulmonares), tomografía (casos meníngeos), pruebas inmunológicas (para valorar hipersensibilidad tardía) y serología (útil sólo en casos profundos y sistémicos) [1].

OTRAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*

MÉTODOS CONVENCIONALES

Teniendo la finalidad de un medio selectivo para el género de *Candida*, se desarrolló el medio de Biggy (Nickerson), que contiene una gran cantidad de citratos para impedir el crecimiento bacteriano, y sulfitos, que al ser reducidos a sulfuros, las colonias se presentan con una coloración café claro a oscuro; ésto se logra gracias a que estas levaduras llevan a cabo la reducción extracelular de un complejo de bismuto y sulfito, formándose así el sulfuro de bismuto, que da la coloración; sin embargo se ha visto que otras levaduras también desarrollan de manera semejante, por lo que no es útil para la detección del género, y mucho menos de la especie, pero sí es orientador. El fundamento de esta técnica radica en que dicha reacción de reducción del complejo (sulfito hidróxido de bismuto) se da como la reacción entre la coenzima II, teniendo al hidrógeno como donador (proveniente del metabolismo energético de la célula), y el glutatión oxidado, que se reduce, a través de la glutatión reductasa, y la coenzima I transfiere un hidrógeno a la cistina por la presencia de la misma enzima; este papel describe la reducción de sulfito por levaduras, destacando la habilidad que tienen algunas especies de *Candida* para reducir sulfitos

inorgánicos, cuando les es proporcionado un complejo de bismuto en un medio apropiado [6,9,10,11].

Persiguiendo la meta para la identificación de especies de *Candida*, se mencionarán algunas técnicas útiles para este fin:

Filamentación de suero:

Esta técnica es presuntiva para *C. albicans*. Se basa en la inoculación de la cepa problema en suero humano normal, se incuba a 37° C durante 3 a 3.5 hrs; posteriormente se hace un examen en fresco y, si la prueba es positiva, se observan tubos germinativos o fase de filamentación de 5 a 15 μm . Cabe mencionar que todas las especies de *Candida* desarrollarán dicha germinación rebasándose el tiempo que se indica [1,2,5,7].

Producción de clamidoconidias:

Se basa en la siembra de la cepa problema en un medio pobre y tenso, como lo es el Agar de harina de maíz o "Corn Meal" (medio de cultivo pobre), adicionado con un tensoactivo como el Tween-80 (al 1%). Al incubarlo a 25° C durante 72 hrs. se tienen resultados. Para su estudio, se coloca la caja de Petri en la platina del microscopio, y se puede hacer la observación con los objetivos de 10X y 40X. La presencia de clamidoconidias (estructuras reproductivas redondas, de doble

membrana y de 10-12 μm de diámetro), es un indicador definitivo de que la cepa se trata de *C. albicans* (prueba determinante). Todas las demás especies de este género en el medio, desarrollan pseudomicelio y blastoconidias, con excepción de *C. glabrata*, que solamente presenta blastoconidias, por lo que el incremento de estas estructuras puede indicar la parasitación de ésta. Cabe mencionar que en muy raras ocasiones *C. stellatoidea* (especie muy poco común) ha presentado clamidoconidias pequeñas [1,5,12].

Pruebas de auxonograma de carbono.

Se basa en la utilización de diversos carbohidratos por las diferentes cepas, y los resultados se comparan con tablas reportadas en la literatura, según el metabolismo de cada especie. Esta técnica se realiza sembrando cada cepa en un medio sólido, de base peptonada y con ausencia de hidratos de carbono. Estas sustancias se absorberán en sensidiscos (del 1 al 2 %) individualmente, y se colocarán en las placas. El desarrollo alrededor de cada disco, indica prueba positiva para dicho sacárido [1,2,5,8].

Prueba de zimograma

Esta técnica se fundamenta en la presencia de diferentes enzimas en las levaduras, capaces de fermentar los hidratos de carbono a una concentración del 1 al 5% en un

medio de cultivo líquido. Esta detección se lleva a cabo con el viraje de color de los indicadores de pH (como rojo de fenol o púrpura de bromocresol) y la producción de gas, revelada por una campana de fermentación en el fondo del tubo. Se incuba a 25° C durante 5 a 15 días [1,2,5,8].

MÉTODOS DE VANGUARDIA

Sistemas comerciales

Actualmente se están manejando 3 sistemas automatizados que son el APJ 20C, APJ-Yeast-Ident (Analytab Products, Inc. Plainview, NY) y Uni-Yeast-Tek System (Flow Laboratories, Rosly, NY). Además se están probando en algunos laboratorios 2 sistemas más, el AMS (Vitek Systems, Hazelwood, MO) y el Quantum (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Dallas, TX.). Todos estos se rigen por el principio de auxonograma y zimograma, utilizando sustratos deshidratados en micropocillos; la utilización de estos por las cepas problemáticas, será detectada por un sistema computarizado [8].

Otro método que no puede dejar de mencionarse, por la precisión, rapidez y escasa muestra que requiere, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, ya que

utiliza un pequeño fragmento de DNA de la célula micótica obtenida de una muestra clínica, y es amplificada de forma específica, reconocida e identificada con una sonda de oligonucleótidos; con esto logramos, en muy poco tiempo, saber la especie del agente etiológico en cuestión [8].

A continuación se mencionarán algunos medios de cultivo que se han desarrollado y comercializado con el fin de simplificar y facilitar el trabajo de diferenciación de especies en cultivos mezclados e identificación rápida y directa de los agentes etiológicos de la candidosis, especialmente los que presentan resistencia a agentes antifúngicos [13]:

Agar Candida JD

Sus componentes son: biotina, 2 g; extracto de levadura, 6 g; fosfato ácido de sodio, 0.5 g; substrato cromogénico (hexosamina), 0.05 g; buffer de sal monosódica de ácido N-2-acetamidoimino-diacético, 0.5 g; sulfato de gentamicina, 0.05 g; y agar, 14 g; completar con 1 L de agua destilada (pH 6.6). La identificación de *C. albicans* se lleva a cabo con la aparición de colonias color azul y apariencia lisa. La presencia del antibiótico impide la contaminación bacteriana [13,14,15,23].

CHROMagar_Candida

Se compone de: peptona, 10 g; glucosa, 20 g; agar, 15 g; cloramfenicol, 0.5 g; y mezcla cromogénica, 2g; completar a 1 L de agua destilada. Se puede usar para aislamiento e identificación presuntiva de *C. albicans*, que da colonias color verde, *C. tropicalis*, colonias azules rodeadas de un halo rosa, *C. krusei*; color rosa y apariencia afelpada y la diferenciación de estas especies de otras levaduras, con base en un fuerte contraste del color de las colonias producido por reacciones enzimáticas especie-específicas y un substrato cromógeno apropiado [16,19].

Pagano-Levine Candida agar

Medio que ayuda a la diferenciación de *C. albicans* de otras especies del género, basado en el desarrollo del color por el crecimiento de levaduras en un medio que contiene cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Con la óptima concentración de este compuesto, que es 100 µg/mL (0.01%), *C. albicans* produce con textura cremosa, coloración de blanca a rosa. Otras especies de *Candida* producen rojos oscuros de aspecto cremoso o colonias blancas pulverulentas. El medio incluye neomicina para suprimir el desarrollo bacteriano. El fundamento de esta técnica es la capacidad de las levaduras de este género en reducir la sal inorgánica cromógena [16,17,18,19].

Fosfomolibdato agar

Este medio fue desarrollado por Costa y Branco²⁰, y es en él donde *C. albicans* presenta colonias de color verde y, otras especies del género, color azul, por la habilidad de estas levaduras de reducir la sal proveniente del ácido fosfomolibdico, y producir así, un complejo colorido; de esta forma, de acuerdo a la pigmentación de la colonia, transparencia u opacidad, y la presencia o ausencia de alguna reacción alrededor de ella, se permite la diferenciación. La pigmentación fue explicada por MacLaren y Armen²¹ como una evidencia de la acumulación y reducción del molibdato dentro de las células de la levadura; y apoyando esta explicación, ellos reportan que la reducción del molibdato ocurre por varios pasos, dándose primero, el azul, después el verde y finalmente productos café [16,20,21].

METODOLOGÍA

Se obtuvieron las cepas de nuestro interés del cepario de la Facultad de Química de la UNAM, de calidad ATTC, entre las cuales estaban *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Sacharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *Cryptococcus neoformans*, y *Hansenula sp.*

Como primer paso se sembraron todas las levaduras en el medio de Sabouraud y con el fin de comprobar pureza, se realizó tinción de Gram a cada especie y sembramos en medio Biggy, comprobando así, ausencia de desarrollo bacteriano.

Posteriormente procedimos a probar el crecimiento de nuestros microorganismos en medios de cultivo con sales inorgánicas cromógenas, con el fin de registrar las características exactas del desarrollo de cada especie, y para esto utilizamos los medios de Agar Pagano Levine y Agar de ácido fosfomolibdico, a continuación detallándose su composición.

Agar Pagano Levine. Medio con cloruro trifeníl tetrazolio (TTC)

Peptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
Dextrosa	40 g

Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
TTC	0.1 g
Cloramfenicol o	
Neomicina	0.5 g

1. Disolver en el agua todos los ingredientes a excepción del TTC, calentando de ser necesario.
2. Esterilizar a 121° C y 15 lb/plg² durante 15 min.
3. Enfriar el medio a 50-55° C, con el fin de que no se oxide la sal al agregarla.
4. Ajustar el pH a 6.0 con HCl.
5. Añadir el TTC en solución 0.01 g/ml, en condiciones de esterilidad (2 ml= 0.02g).
6. Envasar.

Agar de ácido fosfomolibdico (AFM).

Peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
Ac. Fosfomolibdico	1.5 ml al 12.5% por cada 100 ml
Neomicina o	

Cloramfenicol 0.5 g

La preparación se lleva a cabo igual que el medio anterior, el ajuste de pH se hace entre 6-7. Agitar hasta disolver el gel que se forma de la sal [20].

Una vez tenidos los resultados de estos medios, se procedió a diseñar una formulación que tuviera las dos sales cromógenas en las proporciones adecuadas, con el propósito de identificar cada especie por variación del color de las colonias, por lo que en lo consecuente se mencionarán los ensayos realizados. Cabe mencionar que la incubación de los medios se hizo a 28° C, durante el tiempo que fuera necesario para observar resultados apreciables.

Medio de cultivo base

Peptona	10 g
Sacarosa	40 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml
Cloramfenicol	0.5 g

1. Disolver todo perfectamente en el agua, utilizando calor de ser necesario.
2. Ajustar el pH a 6-7.

3. Esterilizar 15 min a 120° C.
4. Dejar enfriar a 50-55° C.
5. Se agregaron las diferentes combinaciones de sales en solución, Sal 1: [T.T.C]=0.1 g/ml y Sal 2: [AFM]=12.5%, como se muestra en la siguiente tabla:

Ensayos	Sal 1	Sal 2	Observaciones	Resultados
	V (ml)	V (ml)		
Ensayo 1	10	15	El medio no gelificó	/
Ensayo 1-A	10	15	El pH fue ajustado después de la esterilización	Coloración colonial azul, No diferenciación
Ensayo 2	20	15	"	"
Ensayo 3	50	15	"	No diferenciación adecuada
Ensayo 4	50	10	"	"
Ensayo 5	50	8	"	Diferenciación adecuada

En base a los resultados obtenidos por el último dato referido en el cuadro, concluimos que esta composición es la idónea para la diferenciación de nuestras cepas, sembrando por estriado y teniendo una incubación a 28° C durante 48 hrs.

Posteriormente, se continuó con la preparación de dicho medio para ser probado, sembrando muestras de pacientes del Hospital General S.S.A. con datos clínicos de candidosis, o bien, del desarrollo del cultivo que se obtuvo de estos; y el crecimiento obtenido se comparó con el de las cepas modelo, con el fin de que, por la coloración colonial, se emitiera el resultado, es decir, la distinción de la especie.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con datos clínicos de candidosis.
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento antimicótico tópico durante 2 semanas previas y, un mes en los sistémicos.
- Cultivos positivos de *Candida sp.*, provenientes de pacientes internos y externos del Hospital General S.S.A.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes que no cumplan con los tiempos estipulados de uso de antimicóticos.
- Cultivos provenientes de pacientes que, pareciendo tener desarrollo de *Candida sp.*, sea otro el microorganismo existente.
- Pacientes que teniendo aparentes datos clínicos de candidosis, su examen directo y su cultivo resulten negativos.

TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra se realizó en áreas donde se observaran lesiones evidentes de esta enfermedad, en boca, según las formas clínicas de la candidosis oral, placas blanquecinas, eritematosas o lesiones más prominentes, por lo que en ésta y otras

mucosas se realizó un raspado con el asa micológica; en piel, un raspado de escamas con portaobjetos, en donde observábamos eritema, maceración en grandes pliegues, placas satélites o eritematoescamosas, y en uñas, utilizando el bisturí, un raspado en la zona afectada; siguiendo estos pasos, se obtuvo la muestra tanto para el examen directo, como para el cultivo.

Al cabo de una incubación de 48 hrs. del cultivo sembrado en el medio de prueba, se registraron las características del desarrollo y principalmente el color, para emitir el reconocimiento de la especie.

Una vez que se reconocieron los agentes infecciosos (*Candida sp.*), se sembraron en agar de "Corn meal" + tween 80, con el propósito de hacer una comprobación de las cepas identificadas, sobre todo en el caso de *C. albicans*. En los casos confusos, en los que de manera difícil se presentaron las clamidoconidias, utilizamos el sistema de Fongiscreen de Sanofi. Finalmente, y para valoración de las cepas no *albicans*, se utilizaron pruebas bioquímicas (fermentativas), y para el caso de *Cryptococcus neoformans* se hizo una prueba inmunológica de aglutinación con partículas de látex y la prueba de la ureasa.

FORMACIÓN DE CLAMIDOCONIDIAS. Fundamento.

Las clamidoconidias son células de pared gruesa, son terminales o están intercaladas en una pseudohifa. Se les denomina estructuras de resistencia ya que permanecen como parte del pseudomicelio y sobreviven cuando este ha muerto y se ha desintegrado; son resistentes a condiciones desfavorables y germinan cuando las condiciones se tornan favorables para el desarrollo vegetativo. Su formación se induce, entre otros, con el medio de Harina de maíz + Tween 80, cuyo fundamento se describe anteriormente [1,24].

PRUEBAS BIOQUÍMICAS. Fundamento.

Son reacciones metabólicas específicas de cada especie que se documentan para su diferenciación. En este caso se utilizaron pruebas fermentativas, es decir, la capacidad que tienen las levaduras para fermentar el carbohidrato presente en el medio de cultivo, según las enzimas con las que constan. Los resultados se determinaron con el viraje de un indicador de pH, rojo de fenol, de tal manera que la prueba es positiva si fermenta el azúcar o se acidifica el medio, adquiriéndose la coloración amarilla.

AGLUTINACIÓN EN LÁTEX.

Prueba inmunológica para *C. neoformans*.

Teniendo anticuerpos anti-*C. neoformans* adheridos a partículas de látex, al entrar estas en contacto con dicho microorganismo, se observa una reacción de aglutinación sobre una superficie oscura.

REACCIÓN DE LA UREASA. Fundamento

C. neoformans posee una enzima en su metabolismo intrínseco llamada ureasa, con la capacidad de degradar la urea (de pH alcalino). En el medio de cultivo se colocan los nutrientes necesarios y un indicador de pH (rojo de fenol), con el objeto de identificar la hidrólisis de esta sustancia con un virre de color.

Se realizaron pruebas no paramétricas de X^2 (ji cuadrada) y pruebas hipergeométricas de Fisher, con el fin de evaluar la confiabilidad del medio de cultivo por nosotros desarrollado.

RESULTADOS

El desarrollo de las levaduras de la especie *Candida* y aún de las demás especies que manejamos en Agar Pagano Levine fue muy semejante, todas fluctuaron entre un color rosado, que va de claro a intenso, variando su brillantez.

En el medio de Agar ácido fosfomolibdico todas las levaduras desarrollaron un color azul intenso, variando también, su brillantez.

En la tabla 1 se muestran las características coloniales de las cepas modelo, utilizando el medio desarrollado.

En la tabla 2 mencionamos los datos de los pacientes incluidos en este trabajo y la especie productora de su enfermedad, según el color de la colonia.

En la tabla 3 se reporta la forma en que se valoró el estudio. Por la formación de clamidoconidias para las especies de *C. albicans* y con el "kit" de Fongiscreen de Sanofi, para aquellas que nos ocasionaron problemas en su tipificación. Con pruebas bioquímicas para las especies de *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, y *Cryptococcus neoformans*, que fueron las especies obtenidas de pacientes, estudiando su capacidad fermentativa de

dextrosa, maltosa, sacarosa y lactosa, de donde se conoce por la bibliografía que *C. glabrata* sólo fermenta la dextrosa, *C. stellatoidea* es dextrosa +, maltosa +, lactosa -, sacarosa - y *C. neoformans* no fermenta ninguna de éstas. Para este último también se realizó la prueba de la ureasa y una técnica inmunológica de aglutinación en látex [8].

En la tabla 4 se detallan las especies no-albicans presuntamente encontradas, las pruebas bioquímicas realizadas y las especies comprobadas.

Por el hallazgo de haber encontrado *Cryptococcus neoformans* en la orina de un paciente, se hizo la prueba de ureasa, la cual salió positiva, y además, la de aglutinación en látex "DACAD" (determinación antigénica de criptococo por aglutinación directa), que también nos confirmó el resultado anterior.

Las pruebas estadísticas realizadas mostraron resultados muy satisfactorios, puesto que utilizando la técnica de X^2 , la $P < 0.0001$, donde para *C. albicans* $X^2 = 100$, y para *C. glabrata* $X^2 = 87.9$, lo que nos indica ser una prueba estadísticamente significativa, es decir, que nuestros resultados no se dieron al azar. De la misma forma, utilizando la prueba exacta de Fisher para las 2 cepas, la $P < 0.0001$.

TABLA 1

Especie	Color	Brillantez	Tamaño	Consistencia	Bordes	Forma	Aspecto
<i>C. tropicalis</i>	Café mamey	Mate	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Rugoso
<i>C. krusei</i>	Verde olivo claro y translúcido	Brillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Liso
<i>C. parapsilopsis</i>	Café mamey osc.	Brillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Liso
<i>C. albicans</i>	Café rojizo	Brillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Liso
<i>C. glabrata</i>	Rosa claro	Brillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Plana	Liso
<i>S. bayanus</i>	Mamey rojizo	Semibrillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Liso
<i>S. cerevisiae</i>	Mamey rojizo	Brillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Liso
<i>C. neoformans</i>	Rosa anaranjado	Brillante	Pequeño	Cremosa	Regulares	Cóncava	Liso
<i>Hansenula sp.</i>	Rosa medio	Mate	Pequeño	Seca	Regulares	Cóncava	Rugoso

TABLA 2

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
1	3 a	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
2	1 a	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
3	36 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
4	34 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café medio
5	19 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
6	47 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
7	60 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café claro
8	71 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
9	23 a	F	Orina	<i>C. glabrata</i>	Rosa claro
10	38 a	F	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café medio

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
11	35 a	M	Liq. bronquial	<i>C. albicans</i>	Café medio
12	25 d	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
13	34 a	F	Nariz	<i>C. albicans</i>	Café medio
14	36 a	M	Boca*	<i>C. glabrata</i>	Rosa claro
15	17 a	F	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café medio
16	50 a	F	Ojo	<i>C. albicans</i>	Café medio
17	84 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café medio
18	64 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
19	61 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
20	41 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
21	75 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
22	52 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
23	45 a	F	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
24	27 a	M	Pene*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
25	25 a	M	Boca*	<i>C. glabrata</i>	Rosa Claro
26	21 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
27	35 a	F	Orina	<i>C. glabrata</i>	Rosa Claro
28	1 m	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
29	23 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
30	55 a	F	Vagina	<i>C. albicans</i>	Café medio

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
31	8 a	M	Orina	<i>C. glabrata</i>	Rosa medio
32	54 a	F	Vagina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
33	36 a	M	Lengua	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
34	61 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
35	18 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
36	64 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
37	43 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
38	24 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
39	20 a	F	Vulva	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
40	27 a	F	Vulva	<i>C. albicans</i>	Café rojizo

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
41	40 a	M	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café medio
42	18 d	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
43	12 a	M	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
44	15 a	F	Vulva*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
45	39 a	M	LCR	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
46	41 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
47	36 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
48	60 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café medio
49	67 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café medio
50	63 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
51	63 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
52	39 a	F	Vagina*	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Café rojizo Blanco rosado
53	65 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
54	41 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café medio
55	19 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
56	47 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
57	60 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café claro
58	71 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
59	23 a	F	Orina	<i>C. glabrata</i>	Rosa claro
60	38 a	F	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café medio

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
61	35 a	M	Liq. bronquial	<i>C. albicans</i>	Café medio
62	25 d	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
63	34 a	F	Nariz	<i>C. albicans</i>	Café medio
64	36 a	M	Boca*	<i>C. glabrata</i>	Rosa claro
65	17 a	F	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café medio
66	50 a	F	Ojo	<i>C. albicans</i>	Café medio
67	84 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café medio
68	64 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
69	61 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café medio
70	41 a	M	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
71	75 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
72	52 a	F	Espujo	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
73	45 a	F	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
74	27 a	M	Pene*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
75	25 a	M	Boca*	<i>C. glabrata</i>	Rosa Claro
76	21 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
77	35 a	F	Orina	<i>C. glabrata</i>	Rosa Claro
78	1 m	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
79	23 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
80	55 a	F	Vagina	<i>C. albicans</i>	Café medio

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
81	8 a	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
82	54 a	F	Vagina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
83	36 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
84	61 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
85	18 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
86	64 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
87	43 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
88	24 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
89	20 a	F	Vagina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
90	27 a	F	Vagina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo

TABLA 2, continuación

No. Del paciente	Edad	Sexo	Muestra	Especie causante	Color colonial
91	40 a	M	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café medio
92	18 d	M	Orina	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
93	12 a	M	Boca*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
94	15 a	F	Vagina*	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
95	39 a	M	LCR	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
96	41 a	M	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
97	36 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo
98	60 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café medio
99	67 a	F	Espuito	<i>C. albicans</i>	Café medio
100	63 a	F	Boca	<i>C. albicans</i>	Café rojizo

Las muestras marcadas con un * fueron sembradas directamente, no así las demás, ya que se sembraron a partir del cultivo en Sabouraud.

TABLA 3

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
1	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
2	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
3	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
4	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
5	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
6	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
7	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
8	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
9	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
10	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
11	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
12	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
13	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
14	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
15	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
16	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
17	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
18	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
19	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
20	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
21	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
22	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
23	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
24	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
25	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
26	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
27	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
28	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
29	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
30	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
31	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias alargadas	/	<i>C. neoformans</i> **
32	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
33	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
34	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
35	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
36	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
37	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
38	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
39	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
40	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
41	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
42	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
43	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
44	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
45	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
46	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
47	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
48	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
49	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
50	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
51	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
52	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. stellatoidea</i>
53	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
54	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
55	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
56	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
57	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
58	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
59	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
60	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
61	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
62	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
63	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
64	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
65	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
66	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
67	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
68	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
69	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
70	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
71	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
72	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
73	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
74	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
75	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
76	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
77	<i>C. glabrata</i>	blastoconidias	/	<i>C. glabrata</i>
78	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
79	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
80	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
81	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
82	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
83	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
84	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
85	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
86	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
87	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
88	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
89	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
90	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/

TABLA 3, continuación

No.	Especie	Desarrollo en "Corn meal"	Fongiscreen	Pbas. Bioquímicas
91	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
92	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
93	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/
94	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
95	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
96	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
97	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
98	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
99	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	/	/
100	<i>C. albicans</i>	clamidoconidias	<i>C. albicans</i>	/

TABLA 4

No.	Especie probable	Dextrosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Especie comprobada
9	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
14	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
25	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
27	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
31	<i>C. glabrata</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. neoformans</i>
52	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>C. stellatoidea</i>
59	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
64	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
75	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>
77	<i>C. glabrata</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>C. glabrata</i>

DISCUSIÓN

El proyecto de trabajo se comenzó diseñando un nuevo medio de cultivo selectivo y diferencial para las especies del género *Candida*, para que, a partir del primoaislamiento, se lograra diferenciar, en alrededor de 48 hrs. , la especie responsable de la candidosis en un paciente, e incluso poder detectar la presencia de dos o más especies.

La idea de este trabajo se obtuvo a partir de que existe en el mercado un medio de cultivo que lleva a cabo esta función, llamado "Chromagar *Candida*", que tiene la característica de identificación de primoaislamiento, sin embargo no existe en nuestro país.

Nosotros iniciamos nuestro trabajo, tomando en cuenta la información reportada de otros medios de cultivo, en los cuales se ha diferenciado al género *Candida* sobre las demás levaduras, utilizando el cloruro trifeniltetrazolio y ácido fosfomolibdico, (que producen coloración colonial

rosada y azulada, respectivamente), sin que ninguno de los dos compuestos logre distinción de especies. Nuestra idea fue comenzar a combinar las concentraciones de estas dos sales inorgánicas cromógenas, utilizando un medio de cultivo base, hasta llegar al punto de máxima diferenciación entre las especies probadas, evitando contaminación bacteriana, y fue así que se logró nuestro objetivo [17,18,20,21,30].

Después se procedió a probar este medio con cepas estandarizadas de calidad ATTC, de donde logramos una diferenciación adecuada, como se muestra en la Tabla 1 de los resultados. De aquí, es necesario mencionar que, de las levaduras del género *Candida*, logramos la diferenciación de todas, tomando en cuenta que, solamente se dio una coloración semejante entre *C. tropicalis* y *C. albicans*, sin embargo, fue posible la distinción por su brillantez y aspecto, ya que el desarrollo de la primera de ellas fue mate y de aspecto rugoso, y la segunda fue brillante y lisa. Cabe señalar, que en el proceso de prueba del medio de cultivo con pacientes de candidosis, no se logró dicha comparación, puesto que de 100 pacientes captados, ninguno estuvo infectado con *C. tropicalis*. Las otras cuatro levaduras incluidas en nuestro estudio, con el fin de su diferenciación, no presentaron una distinción

evidente, ya que las dos especies del género *Sacharomyces* desarrollaron una coloración idéntica, diferenciable de *Candida*, y las cepas de *Hansenula sp.* y *Cryptococcus neoformans* no se distinguieron de manera muy marcada de las cepas de *Candida*.

El objetivo de la creación de este recurso para los laboratorios de análisis micológicos, es la fácil, rápida y no costosa forma de diferenciación de las especies productoras de candidosis, ya que el medio mencionado anteriormente "Chromagar Candida", no lo hay en México, además de su alto costo; también se conocen otros medios selectivos y diferenciales para *C. albicans* que se comercializan en el mundo, como "Albicans JD" de bioMérieux, "Candiselect" de Sanofi Diagnostics Pasteur, entre otros, pero la desventaja de estos es que son utilizados básicamente para *C. albicans*, y no son confiables para otras especies frecuentes en la enfermedad [13,14,15,26].

Otras técnicas de análisis que podemos sustituir con el medio de cultivo propuesto son las automatizadas, de manejo complicado y sobre todo, de alto

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Se ha visto que los pacientes inmunosuprimidos con candidosis presentan mezclas de agentes etiológicos, es decir, de más de una especie de *Candida sp.* Lo que provoca que en ocasiones el tratamiento no sea efectivo, probablemente es debido a que una de las especies puede ser insensible o resistente al antimicótico seleccionado. Por esta razón consideramos de importancia el desarrollo de este medio de cultivo selectivo y diferencial.

Con el medio de cultivo estandarizado se procedió a probarlo con pacientes de candidosis; las levaduras *C. albicans* detectadas por éste, se comprobaron mediante la prueba de clamidoconidias, la cual fue positiva en un 90% del total de cepas aisladas. La segunda especie encontrada fue *C. glabrata*, la cual se identificó 9/100 veces, sin embargo, y a través de pruebas bioquímicas se comprobó que sólo 8/9 correspondían a *C. glabrata*, la otra fue identificada como *C. stellatoidea*, especie rara, con la cual no contamos con cepa de referencia en la primer parte del trabajo, por lo que desconocíamos su morfología colonial.

Una cepa que nuestro medio no logró diferenciar fue *C. neoformans*, detectada en una muestra de orina, y tipificada a través de pruebas bioquímicas e inmunológicas. Este líquido biológico provenía de un paciente

pediátrico que presuntamente tenía candidosis. Lo que probablemente ocurrió fue que este paciente cursó con criptococosis y el microorganismo fue eliminado por vía renal.

Por otro lado, se logró ver la frecuencia topográfica de la candidosis de esta población de pacientes del Hospital General, de donde encontramos una mayor incidencia en muestras de boca (38%), esputo (27%), orina (14%) y vagina (11%), las demás se encontraron en menores cantidades en mucosas como ojo, nariz y pene, y en LCR. La relación de sexo varió, presentando mayor frecuencia en la mujer (56%), dato reportado en la literatura por disposición anatómica de la vagina [3].

CONCLUSIONES

En base al trabajo realizado se concluye que el medio de cultivo desarrollado logró la selectividad, diferenciabilidad y ser para identificación de primoaislamiento de las especies patógenas del género *Candida* causantes de candidosis.

En el estudio realizado con 100 pacientes, la sensibilidad de nuestro medio de cultivo fue de 100% para *C. albicans* y de 87.9% para *C. glabrata*, y para las 2 especies se obtuvo una $P < 0.0001$, lo que nos indica que la prueba es estadísticamente significativa.

Las cepas *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* y *C. krusei* se pudieron diferenciar mediante el medio de cultivo propuesto, sin embargo, su poca frecuencia en aislamientos in vivo, no nos permitió demostrar la sensibilidad.

A P É N D I C E

MATERIALES

- Algodón
- Anillo metálico
- Abatelenguas
- Asa bacteriológica
- Asa micológica
- Bisturí
- Cajas de Petri plásticas desechables
- Cinta adhesiva
- Cubreobjetos
- Embudo de vidrio de tallo largo
- Etiquetas
- Gradilla metálica
- Hisopos estériles
- Jeringas de insulina
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- Mechero Bunsen
- Papel medidor de pH
- Pinzas de Mohr
- Pinzas de punta plana
- Portaobjetos
- Probetas de 100 y 500 ml
- Soporte universal
- Tela de asbesto
- Termómetro
- Tubos de ensaye de 13x100 sencillos y de rosca
- Vasos de precipitado de 10,50,100 y 250 ml

EQUIPO

- Autoclave
- Balanza granataria
- Estufa
- Incubadora de 28° C
- Microscopio óptico
- Refrigerador

REACTIVOS

- Aceite de inmersión
- Ácido clorhídrico
- Ácido fosfomolibdico
- Agar
- Agua destilada
- Alcohol etílico
- Alcohol acetona
- Cloramfenicol
- Cloro
- Cloruro de trifenil tetrazolio
- Cristal violeta
- Dextrosa
- Extracto de levadura
- Hidróxido de potasio al 10%
- Hidróxido de sodio concentrado
- "Kit" inmunológico para determinación de *Cryptococcus neoformans*
- Lactosa
- Lugol
- Maltosa
- Peptona
- Rojo de fenol
- Sacarosa

- Safranina
- Tensoactivo tipo tween 80

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar dextrosa de Sabouraud
- Agar harina de maíz "corn meal"
- Medio líquido para pruebas bioquímicas
- Agar Biggy-Nickerson

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Mendez Cervantes Edits. México, 1991.
2. Rippon JW. Candidiasis y levaduras patógenas, Cap. 20. *Tratado de Micología Médica*, 3ª. ed. Ed. Interamericana McGraw Hill. México, 1990, pp. 574-621.
3. Pereiro FM. Taxonomía y epidemiología del género *Candida*. *Mon Dermat* 1994; 7: 94-101.
4. Mariat F, Drouhet E. Las levaduras de importancia médica y veterinaria. *Dermat Rev Mex* 1996; 40(1): 31-42.
5. Stary A. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por hongos esporulados. *Mon Dermat*; 7: 120-29.
6. Nickerson WJ. Reduction of inorganic substances by yeasts. I.Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *J Infect Dis* 1953; 93:43-56.
7. Taschdjian CL, Burchall MA, Kozinn PJ. Rapid Identification of *Candida albicans* by Filamentation on Serum and Serum Substitutes. *A M A J Dis Child* 1960; 99:212-15.

8. Koneman R. Identificación de laboratorio de levaduras y microorganismos levaduriformes, Cap. 7. *Micología. Práctica de laboratorio*. 3ª ed. Panamericana. Argentina, 1987; pp. 175-95.
9. Conn EE, Vennesland B. Glutathion reductase of wheat germ. *J Biol Chem* 1951; 192:17-28.
10. Mapson LW, Goddard DR. The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochem J* 1951; 49: 592-601.
11. Nickerson WJ, Romano AH. Enzymatic reduction of cystine by coenzyme I (DPNH). *Science* 1952; 115: 676-78.
12. Mendel EB, Haverman S, Hall DK. Isolation of *Candida* from clinical specimens. Comparative study of Pagano-Levin and Nickerson's culture media. *Obstet Gynecol* 1960; 16: 180-84.
13. Baumgartner C, Frydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans JD and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34:454-56.
14. De Champs C, Lebeau B, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Evaluation of Albicans JD plates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2227-28.
15. Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, Montclos H de, Gille Y. Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans JD and Fluoroplate agar plates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3034-36.

16. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1923-29.
17. Sinski JT, Kelley LM, Reed GL. Pagano-Levine *Candida* test medium: Evaluation using vaginal samples. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 206-11.
18. Pagano J, Levin JD, Trejo W. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. *Antibiotics Annu* 1958; 1957-1958: 137-43.
19. Bonifaz A, Araiza-Santibañez J, de Pablo P. CHROMagar-Candida. Experiencia en la identificación presuntiva de levaduras oportunistas aisladas de candidosis oral en pacientes inmunosuprimidos. *Bioquímica* 1998; 23: 794-800.
20. Costa SOP, Branco C. Evaluation of a molybdenum culture medium as selective and differential for yeasts. *J Path Bact* 1964; 87: 428-31.
21. MacLaren JA. *Mycologia*. 1960. 52:148. Referido en 18.
22. Saul A. Micosis Superficiales, cap. 6. *Lecciones de Dermatología*, 10ª. ed. Francisco Méndez Cervantes, Edit. México 1983.
23. De Champs C, Lebeau B, Ambroise-Thomas P, Crillot R. Evaluation of Albicans JD plates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2227-28.
24. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E, Brooks G, Butel J, Ornston L. *Micología Médica*, cap. 30. *Microbiología Médica*, 13ª ed. El Manual Moderno. México 1990.

25. Campbell C, Holmes A, Kavey K, Szekely A, Warnock D. Comparison of a New Chromogenic Agar with the Germ Tube Method for Presumptive Identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:367-68.
26. Freydière A, Buchaille L, Gille Y. Comparison of Three Commercial Media for Direct Identification and Discrimination of *Candida* Species in Clinical Specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:464-67.
27. Odds F. *Candida* Species and Virulence. The study of virulence attributes in *Candida albicans* has come of age, and the host-fungus interplay may be more complex than previously realized. *Features* 1994; 60:313-18.
28. Wingard J, Merz W, Saral R. *Candida tropicalis*: A Major Pathogen in Immunocompromised Patients. *Ann Int Med* 1979; 91:539-43.
29. Fraser V, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan C. Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Risk Factors, and Predictors of Mortality. *Clin Inf Dis* 1992; 15:414-21.
30. Gillespie L, Jnmon W, Slater V. Incidence of *Candida* in the Vagina During Pregnancy. Study utilizing the Pagano-Levine culture medium. *Obstet Gynecol* 1960; 16:185-88.