870127
25
29

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE *Candida albicans* MEDIANTE EL PRIMOAISLAMIENTO EN AGAR BASE PARA *Candida* CON VERDE DE BROMOCRESOL (BCG) EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE VAGINITIS.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ELIZABETH RODRIGUEZ TRUJILLO

ASESOR: JAIME MENDIOLA GOMEZ

GUADALAJARA, JALISCO 1986

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. INTRODUCCION 1

1.1 Antecedentes históricos 2
1.2 Taxonomía y nomenclatura 3
1.3 Generalidades de C. albicans 5
1.3.1 Características biológicas y morfológicas 5
1.3.2 Habitat natural y fuentes de infección 6
1.3.3 Patogénesis 6
1.3.4 Mecanismos de inmunidad 8
1.4 Generalidades sobre vaginitis 9
1.4.1 Definición de vagina normal 9
1.4.2 Causas de vaginitis y manifestaciones clínicas 10
1.5 Candidiasis vaginal 12
1.5.1 Agentes etiológicos 12
1.5.2 Fuentes de infección 14
1.5.3 Factores predisponentes 14
1.5.4 Características clínicas y patogenicidad 17
1.6 Identificación de C. albicans por el laboratorio 18
1.6.1 Examen microscópico 18
1.6.2 Cultivos 18
1.6.3 Producción de pseudomicelio 20
1.6.4 Producción de clamidosporas 20
1.6.5 Pruebas bioquímicas 21

1.6.6 Pruebas inmunológicas 22
1.6.7 Inoculación a animules de experimentación 23
1.7 Justificación y objetivo del trabajo .. 24

2. MATERIAL Y METODO 27

3. RESULTADOS 36

4. CONCLUSIONES 46

5. BIBLIOGRAFIA 50

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes históricos.-

La descripción de candidiasis data desde casi los i-- nicios de la microbiología. En 1839 Längenbeck fué el primero en demostrar el hongo tipo levadura en lesiones de estomatitis, pero fueron Berg en 1841 y Bennett en 1844 quienes lo relacionaron como el agente etiológico. En 1844 Gruby lo describe ante la Academia de Ciencias de Paris como- la causa de "Le vrai Muguet des enfants". La primera des-- cripción de candidiasis vaginal fué hecha por Wilkinson en 1849. En 1875, Hausman demostró la patogenicidad del hongo en la vagina produciendo la enfermedad en vaginas sanas al transferirles material infectado. Hesseltine, Borts y - Plass en 1934 confirmaron la patogenicidad de Candida inoculando organismos cultivados en la vagina de pacientes -- normales, produciendo candidiasis.

En 1853 Robin llamó al hongo Oidium albicans. En 1890 Zopf lo describió como Monilia albicans. Aunque hay alrededor de 172 sinónimos para Candida albicans. Los términos - Oidium y Monilia sobrevivieron más que otros nombres genéricos, hasta que Berkhout, en 1923, propuso el género de - Candida el cual fué oficialmente aceptado por el Tercer -- Congreso Internacional de Microbiología en 1939 y por el - Octavo Congreso Botánico en Paris en 1954.

Aunque el término "moniliasis" es aún bastante utilizado, en este trabajo emplearemos el de candidiasis (4,6,-12,14).

1.2 Taxonomia y nomenclatura.-

De todos los hongos aislados de fuentes humanas, el - grupo de los de forma de levadura ha sido el más difícil - de estudiar debido a las grandes diferencias de opinión en cuanto a los criterios que deben utilizarse en la clasificación (20). Más recientemente se han ideado mejores métodos de clasificación, y ha sido posible reducir los hongos tipo levadura en tres clases: 1.- Las levaduras formadoras de basidiosporas o esporobolomicetáceas, en la clase Basidiomycetes. 2.- Las levaduras formadoras de ascosporas endomicetáceas en la clase Ascomycetes, y 3.- Las levaduras-asporógenas Cryptococcaceae en los hongos imperfectos. Este último grupo contiene los patógenos humanos (23).

Clasificación de las levaduras patógenas:

Clase: Deuteromicetos (hongos imperfectos)

Orden: Pseudosaccharomycetales

Familia: Cryptococcaceae

Género 1: Cryptococcus

Células unicelulares en gemación. Se reproducen- por blastosporas que salen de la célula madre. La mayoría son ureasa positivos. Células rodeadas de una cápsula y - que producen una substancia de tipo almidón. Sin pigmento- carotenoide. Utilizan inositol. Ej. C. neoformans.

Género 2: Torulopsis

Igual que el género 1, pero sin cápsula ni producción de polisacárido tipo almidón. Ej. T. glabrata.

Género 3: Pityrosporum

Casi todas las células aisladas en gemación. Reproducción por blastosporas que se separan de la célula madre por desarrollo de una pared transversal. Las células pueden adherirse formando breves tiras de hifas.- Ej. P. furfur.

Génuro 4: Rhodotorula

Formas unicelulares en gemación, que pueden estar encapsuladas o producir pseudomicelio. Presencia de pigmentos carotenoides. Ej. R. subra.

Género 5: Candida

Reproducción por blastosporas; puede formar pseudomicelio o micelio verdadero. Generalmente ureasa negativa. No poseen cápsula ni pigmentos carotenoides. No utilizan inositol. Ej. C. albicans.

Género 6: Trichosporum

Reproducción por blastosporas, y artrosporas. Formación de micelio y pseudomicelio. Ej. T. cutaneum.

Género 7: Geotrichum

Reproducción sólo por artrosporas. Forma un verdadero micelio. Ej. G. candidum.

1.3 Generalidades de C. albicans

1.3.1 Características biológicas y morfológicas.

Es un hongo dimórfico. Ya que en los medios sólidos - ricos crece como levadura gemantes de forma oval de 2.5 X- 4 X 6 micras, pero en otros cultivos y en los tejidos in-- fectados puede desarrollar un pseudomicelio por alargumien to de células que no llegan a desprenderse.

Son células eucarióticas, con diferentes cromosomas y membrana nucloar bien definida, poseen mitocondrius y retículo endoplásmico, además sus membranas contienen esteroles a diferencia de las bacterianas.

La pared de las levaduras contienen complejos de polisacáridos con proteinas ricas en cistina, además de abundantes lípidos conteniendo fósforo y nitrógeno. Otro polisacárido de importancia en la composición de la pared es - la manana formada de uniones α-1,6 de D-manosa con ramificaciones α-1,2 y α-1,3.

Algunos estudios sugieren que la integridad de las -- glicoproteinas susceptibles a α- manosidasa y proteasa es- importante para la adhesión a las superficies mucocutáneas.

También se ha observado que las variaciones fenotípicas en las especies de C. albicans incluyen cambios en su-

composición superficial, presencia o no de una capa fibrilar, lo que permite una variación antigénica así como diferencias en la patogénesis de una cepa a otra.

Candida albicans es un organismo heterotrófico, además siendo un aerobio estricto encuentra las superficies de la piel y mucosas más adecuadas para su desarrollo. (9, 10,21,29,32).

1.3.2 Habitat natural y fuentes de infección.

Como pueden aislarse cepas patógenas de C. albicans, en: 1) piel normal, 2) mucosa bucal y vaginal normales, y 3) en las materias fecales de individuos sanos, se considera que la mayoría de las infecciones tiene origen endógeno ya que Candida se disemina, por todo el organismo, a través de los vasos linfáticos y sanguíneos (20).

Sin embargo, las infecciones de C. albicans pueden ser transmitidas. Se han observado balanopostitis en los maridos de mujeres con vaginitis por candidiasis y casos de candidiasis cutáneas alrededor de los pezones de nodrizas, causados por niños con muguet bucal. Con frecuencia aparece muguet en niños que se infectan durante el nacimiento (29,32).

1.3.3 Patogénesis

Sería difícil demostrar que algún otro microorganismo

produce un espectro tan diverso de enfermedades humanas - como el de C. albicans. Todos los tejidos y órganos son -- susceptibles a la invasión por este parásito siempre que - existan las condiciones adecuadas.

Clasificación de las manifestaciones clínicas (27):

I.	Enfermedades infecciosas	Factores predisponentes más comunes.-
	Mucosa bucal (muguet)	Infancia, individuos de e-- dad avanzada, diabetes, te- rapéutica antibiótica y tra tamiento con esteroides.
	Vulvovaginal	Embarazo, diabetes.
	Gastrointestinal Perianal.	Terapéutica antibiótica.
	Boqueras, perleché, le-- siones de los pliegues - tisulares ej. ingle.	Obesidad, sudación.
	Paroniquia	Maceración.
	Granuloma por Candida - producción de lesiones - córneas, granulomatosas.	Deficiencia inmune.
	Candidiasis mucocutáneas crónicas - el hongo cre- ce en capas superficia-- les, no invade el epite- lio.	Deficiencia inmune, usual - mente celular o combinada.

Diseminado	Otras enfermedades graves o malignas.

II. Enfermedades alérgicas (31):

Candídides - Son lesiones papulares o vesiculares estériles que probablemente corresponden a reacciones dérmicas localizadas a los antígenos circulantes.

Eccema	Reacciones alérgicas
Asma	
Gastritis	

1.3.4 Mecanismo de inmunidad.

Existe acuerdo unánime en el sentido de que la inmunidad celular posee importancia primaria en la resistencia a Candida; ahora bien, quizá sea más elocuente el hecho de que la candidiasis es frecuente en sujetos con inmunodeficiencias celulares, pero no en los que padecen defectos inmunes humorales. Sin embargo todavía no se ha demostrado su funcionamiento ya que una mayoría importante de pacientes con candidiasis muestran signos de inmunodeficiencias celulares y muchos sujetos con inmunodeficiencias celulares graves no se infectan por la ubicua Candida. Se ha demostrado que una variedad de factores humorales no específicos la inhiben o la destruyen. El suero humano contiene un factor que aglutina las levaduras; transferrina y otras sustancias fijadoras de hierro inhiben a Candida por competencia por el hierro disponible. El sistema microbicida ha

loide H_2O_2 peroxidasa de los neutrófilos y ciertos líqui-- dos corporales pueden matar a C. albicans, siendo ésta la- base de la actividad candidacida de los neutrofilos huma-- nos (27).

1.4 Generalidades sobre vaginitis

1.4.1 Definición de vagina normal.

Es conveniente recordar que la vagina sana puede pre- sentar secreción hialina (leucorrea fisiológica) procedente de la mucosa del epitelio columnar endocervical, líquido de trasudación de las paredes vaginales y productos de- las glándulas sebáceas de Barholini. Asimismo, parámetros- funcionales importantes de la vagina son el pH (3.8 a 4.2) que es mantenido por la influencia estrogénica sobre el e- pitelio vaginal y la producción de ácido láctico por los - lactobacilos que forman parte de la flora microbiana nor-- mal. Es decir un pH ácido de la vagina es sinónimo de nor- malidad que conlleva maduración celular, predominancia de- lactobacilos y en general un sistema de automantenimiento- regido por descamación epitelial, eliminación constante de detritos, presencia de inmunoglobulinas secretoras locales elementos inmunes sistémicos y manifestación del mecanismo fagocítico mononuclear (30).

En las etapas premenárquica y menopáusica la neutrali dad o alcalinidad del pH vaginal y condiciones anatómicas-

y funcionales propios de esos estados, influyen en el propiciamiento de infecciones cervicovaginales; sin embargo,- toda mujer está sujeta a contraer infecciones genitales en cualquier fase de su vida y aún cuando se reconoce, diag - nóstica y trata una gran gama de agentes etiológicos, el - problema sigue vigente (6).

Entre los organismos prevalentes en la flora de mujeres sanas estan:

Facultativos	Anaeróbicos
S. epidermidus	Peptococos
Lactobacillus sp.	Peptoestreptococos
Estreptococos no hemolí-	Especies de Bacteroides
ticos.	" de Eubacterium
Difteroides	

1.4.2 Causas de vaginitis y manifestaciones clínicas.

La vaginitis, proceso inflamatorio que afecta la vagina, puede ser producto de diversas enfermedades no relacionadas entre si que se acompaña de múltiples síntomas y tienen orígenes muy distintos. Por lo general es un padecimiento local y benigno pero que puede ser difícil de erradicar si no se hace un diagnóstico preciso (24).

Hablando específicamente de agentes productores de - leucorrea se presentan varios grupos taxonómicos como pro-

tozoarios, hongos, bacterias y virus, sin descartar otras entidades como cuerpos extraños, sustancias químicas empleadas en la higiene femenina y factores psicosomáticos.

A continuación se presentan en un cuadro los factores etiológicos más frecuentes (17):

Diagnóstico	Historia	Exploración	Datos de laboratorio y métodos diagnósticos.
Vaginitis por *G. vaginalis*	flujo ligeramente oloroso	Flujo pastoso mucoso y grisáceo, pH 5ab.	Se buscan células clave en preparación en sol. salina. Cultivo.
Cervicitis	Flujo ligero; disuria interna.	Flujo mucoso y amarillento cuello uterino purulento y friable.	En sol. salina leucocitosis - cultivo endocervical. Clamidia, gonococo.
Candidiasis	Flujo prurigi noso recurrente.	Flujo cremoso y grumoso; pH de 4 a 5.	Se prepara la muestra en KOH micelias, levaduras en gemación. Cultivo.
Vaginitis por *Trichomonas*	Leucorrea olorosa, disuria	Flujo amarillo verdoso; pH 5 a 6.5; Hiperémico y frioble.	Muestra en sol salina; protozoarios flagelados móviles.

Flujo vaginal o cervical -	Flujo mínimo.	Flujo mucoso claro; pH menor de 4.5; - ectropión.	Preparación - en sol. salina; algunos - leucocitos y células epiteliales.
Vaginitis reactiva.	Uso de aerosoles o duchas- vaginales; -- flujo oloroso	Cuerpo extraño, eritema.	Ninguno
Vaginitis atrófica.	Dispareunia; - sensación de-	Flujo café - pegajoso; tejido vaginal delgado.	Ninguno
Vulvovaginitis asociada a infecciones del- ap. respirato- rio superior.	Sensación de- quemadura.	Mucosa vaginal eritematosa.	Cultivo
Vulvovaginitis por Herpes virus hominis.	Dolor perineal leucorrea.	Vesículas - vulvares; úlceras.	Papanicolaou; células gigantes multinucleadas, cultivo viral.

1.5 Candidiasis vaginal.-

1.5.1 Agentes etiológicos.-

De acuerdo a los conceptos comunes de micología, los- factores que controlan la susceptibilidad del huésped son- más significantes en el desarrollo de candidiasis que la o

portunidad de contaminación de la vagina por especies de - Candida.

Los agentes específicos causantes pertenecen al género Candida, los cuales son endógenos practicamente en todos los humanos, usualmente son organismos comensales, volviéndose patogénicos cuando el ambiente es favorable en el huésped. Aunque varios reportes difieran ampliamente, es - probable que menos del 50% de pacientes que albergan Candida en la vagina presentan enfermedad. Se da por hecho que- un limitado número de organismos encontrados regularmente- en la vagina de procedencia endógena o externa se hallan - como transitorios o produciendo patogenicidad de acuerdo a la susceptibilidad del huésped.

Candida albicans es el agente que usualmente causa la infección, pero algunos estudios reportan que la infección por Torulopsis glabrata, ahora conocida como Candida glabrata, es la infección micótica vaginal más común después de la producida por C. albicans, pero otras especies tales como: C. stellatoidea, C. tropicalis, C. pseudotropicalis, C. krusei, C. parakrusei y C. guillermondi también podrían desempeñar un papel causal en vaginitis; sin embargo, con- excepción de Candida glabrata, hay poca evidencia que desempeñen un papel significativo.

Probablemente es la ayuda del laboratorio lo que puede permitir al clínico distinguir entre colonización simple y significación etiológica, si le informa sobre la pro

encia o no de reacción inflamatoria. Esto se pone de manifiesto por la presencia de leucocitos polimorfonucleares - en el exudado (24).

1.5.2 Fuentes de infección.-

Especies de Candida son recobradas frecuentemente a- partir de heces, lo que permite pensar que la mayoría de - las infecciones por ella son autógenas y los microorganismos son transferidos del ano después de defecar. Incorrectos hábitos de higiene (aseo de atrás hacia adelante; sobre uso de laxantes, etc.) pueden contribuir a este problema, el que puede ser corregido una vez descubierta la causa (7). De lo contrario el tracto digestivo seguirá actuando como reservorio permitiendo reinfecciones crónicas del- tracto vaginal (1). Ocasionalmente, infecciones inguinales y mucocutáneas pueden ser la causa. Gilpin encontró el organismo en el semen de un gran porcentaje de maridos de mujeres con infecciones crónicas. No se ha probado que animales, vegetales u otros objetos sean fuentes de infección.

1.5.3 Factores predisponentes.-

Es probable que los factores predisponentes existen - en cada paciente con candidiasis, aunque su identificación no sea siempre posible. Los factores del huésped que afectan las secreciones vaginales y el medio vaginal, parecen- jugar el papel más importante en la aparición de esta en-- fermedad.

El embarazo es factor predisponente más común. Los altos niveles hormonales en el embarazo permiten un pronunciado incremento en el contenido glicogénico de la vagina- lo cual constituye un medio favorable para el crecimiento- de Candida. Es además probable que la glicosuria observada en algunas pacientes embarazadas es también contributoria. La reducida tolerancia a la glucosa en el embarazo y consecuente elevación de niveles de azúcar en la sangre de algunas pacientes podría también aumentar su susceptibilidad a la infección.

Ciclo menstrual.- La intensidad de las manifestaciones clínicas de la candidiasis tiende a coincidir con el patrón hormonal del ciclo menstrual. Debido al glicógeno vaginal disponible, las manifestaciones clínicas son usualmente más severas antes de la menstruación, con algún alivio durante y después.

Anticonceptivos.- Su efecto se entiende debido a que- la administración cíclica de estrógenos y progestágenos producen un medio vaginal similar al presente durante el embarazo (24).

La terapia con antibióticos puede crear condiciones que conducen a una proliferación de C. albicans por medio- de varios mecanismos. La administración oral de antibióticos de amplio espectro provocan un cambio en la composición de la flora microbial que compone el tracto digestivo y vaginal. Resultando en alteraciones del pH y composición

de nutrientes disponibles o productos microbianos que permiten la proliferación de Candida. Además, los antibióticos también pueden interferir con la habilidad del sistema inmune para limitar las infecciones micóticas. Aureomicina tetraciclina y sulfonamidas han mostrado que decrecen la capacidad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares. Sulfadiazina, tetraciclina y gentamicina tienen la capacidad de inhibir la utilización del componente C3 del complemento.

Pacientes con deficiencias férricas, hipocalcemia, diabetes u otras endocrinopatías tienen un incremento en la incidencia de infecciones mucocutáneas por Candida. Estas condiciones probablemente también promueven el crecimiento fúngico por alteración de la flora microbiana. Esto ocurre debido a cambios en la concentración de sustratos utilizables y la actividad de compuestos antimicrobianos como la transferrina.

La circulación de complejos inmunes, formados como consecuencia de infecciones o enfermedades autoinmunes, pueden alterar la actividad de los linfocitos T-ayudadores o T-supresor. Este disturbio en la actividad regular del sistema inmune puede aumentar la susceptibilidad a infecciones micóticas. Además es claro, que individuos con defectos genéticos que alteren la función de los linfocitos-T, fagocitosis ó utilización del complemento son también candidatos a infecciones mucocutáneas por Candida (18).

Dieta.- Se ha mostrado alguna evidencia de mayor colonización por Candida en individuos que ingieren grandes - cantidades de frutas y azúcares, ya que resulta en mayor - concentración de azúcares en sangre y orina, lo que permite un incremento en la infección.

1.5.4 Características clínicas y patogenicidad.-

El síntoma principal de la candidiasis vulvovaginal - es prurito vulvar. La dispareunia es un síntoma común y - con frecuencia se observa disuria a causa del paso de la orina sobre las áreas irritadas. La descarga vaginal puede- ser escasa o estar ausente, como también puede serlo el - mal olor aunque en los casos severos la leucorrea puede -- ser abundante, fétida, blanquesina o amarillenta acompaña- da de signos de edema y eritema de la vulva (5,24).

Aunque los casos de vaginitis debidos a C. albicans - continuan siendo un problema para millones de mujeres en - todo el mundo, existen pocos progresos en el entendimiento de la patogénesis en la candidiasis vaginal.

Sin embargo se han hecho estudios que relacionan su - patogenicidad a la significante adherencia a la superficie de la mucosa, lo que permite colonizarla; esta capacidad - de adherencia es mayor que en otras especies de Candida y- al parecer está relacionada con la integridad de las proteinas que componen la pared celular, la cepa infectante, la zona superficial de la célula vaginal que es atacada (15),

así como los factores del medio vaginal (niveles de CO_2 y-pH) (12).

La capacidad de C. albicans para producir pseudohifas parece ser un factor de virulencia importante más no esencial en la patogenicidad de candidiasis vaginal (16).

Su toxicidad ha sido demostrada con una glicoproteina aislada de la pared y se ha sugerido que las enzimas hidrolíticas producidas por C. albicans degradan la membrana de la mucosa y permiten la invasión del tejido (15).

1.6 Identificación de C. albicans por el laboratorio.

1.6.1 Examen microscópico.-

El hongo aparece en preparaciones con KOH, en preparaciones en fresco y en frotis teñidos por el método de Gram de material obtenido de las lesiones, en forma de pequeñas células (2.5 a 4 micras) de tipo levadura, en gemación, ovales y de pared delgada con elementos pseudomiceliales acompañantes o sin ellos (20).

1.6.2 Cultivos.-

Las raspaduras o muestras tomadas con hisopo de las lesiones pueden cultivarse en varios medios cuyas formulaciones han sido descritas para la detección, aislamiento e identificación de C. albicans. Tales medios fueron diseña-

dos para resaltar las características morfológicas o fisiológicas de este organismo lo que permite diferenciarlo de otros miembros del mismo género así como de otro género. - Entre los usados en nuestro medio están:

Agar Sangre - después de 48 horas en atmósfera de 10% de CO_2 y a 37^{o}. Se observan colonias de tamaño medio (1-2mm) color gris mate, - cremosas.

Agar de Sabouraud - de 2 a 4 días a 37^{o} C ó a temperatura ambiente se observan colonias cremosas, de tamaño medio y de aspecto mate o húmedo. Se desprende un olor típico a levadura (20).

Otros medios de aislamiento primario e identificación de especies de Candida.

Agar EMB de Levine: A 37^{o}C, en atmósfera de CO_2(10%)- al cabo de 18 a 24 h se examinan las -- colonias con objetivo de poco aumento - se advierte en las colonias de C. albicans una orla micelial radiante. (C. -- stellatoidea puede producirla pero es - más pequeña y delicada) (20).

Agar con Verde de bromocresol: A temperatura ambiente al cabo de 24 a 48 h aparecen colonias-

elevadas. El color del medio y la superficie colonial es amarillo pálido, con un diámetro de 1 a 3 mm, son cremosas - (19).

1.6.3 Producción de pseudomicelio

Una prueba adicional para diferenciar C. albicans de otras especies se basa en su capacidad para formar 'tubos germinales' en tioglicolato, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, albúmina de huevo o albúmina-ácido oleico(20)

1) Una pequeña porción de colonias aisladas de la levadura en estudio se suspende en un tubo de ensayo que contiene 0.5 ml de suero humeno o de conejo.

2) El tubo se incuba a 37°C durante no más de 3 h.

3) Una gota de la suspensión levadura suero se pone - sobre un portaobjeto, se coloca un cubreobjeto y - se examina al microscopio para comprobar la presencia de tubos germinales (26).

1.6.4 Producción de clamidosporas.-

La morfología microscópica de C. albicans es también típica cuando crece sobre agar con harina de maíz, agar harina de maíz más polisorbato 80, crema de arroz agar más - polisorbato 80 y agar clamidospora de Difco (20).

Sobre estos medios C. albicans produce clamidosporas-

que no se encuentran en otras especies. Se inocula una placa de Petri bien provista de cualquiera de los medios indicados mediante un corte en el agar con una asa recta que contenga una pequeña cantidad del cultivo que va a examinarse. Sin embargo se debe tener en cuenta, las diferencias que existen entre las cepas de esta especie en su capacidad de producir clamidosporas (14).

1.6.5 Pruebas bioquímicas.-

Si existe dificultad para efectuar una identificación presuntiva en base a estos patrones de desarrollo en agar-harina de maíz, se pueden requerir pruebas de fermentación o asimilación de hidratos de carbono para una identificación final (26).

La fermentación llevada a cabo por las levaduras se detecta en un medio de cultivo adecuado que contiene un único sustrato hidrocarbonado por la producción de gas, entanto que la producción de ácido (utilización de hidrato de carbono) no indica fermentación. A fin de obtener resultados exactos puede ser necesario 'hambrear' a las levaduras pasándolas una o dos veces por caldo libre de hidratos de carbono para eliminar cualquier hidrato de carbono asimilado durante el desarrollo en el medio de aislamiento primario.

Generalmente se realizan en cuatro tubos de caldo de-extracto de carne con un indicador (púrpura de bromocresol)

que contengan solución de glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa al 1% respectivamente. La presencia de gas se observa colocando un tubo de Durham invertido, el cambio a un color amarillo indica utilización del hidrato de carbono.

Las pruebas de utilización de hidratos de carbono son métodos ampliamente empleados para la identificación definitiva de levaduras de importancia médica.

Para evaluar la capacidad de las levaduras para utilizar los hidratos de carbono pueden utilizarse:

1) El método de los discos que se basa en el uso de un agar base nitrogenado libre de hidratos de carbono y la observación de la presencia o ausencia de desarrollo alrededor de discos de papel filtro impregnados con hidratos de carbono, tras un período de incubación adecuado.

2) Una forma más sencilla y práctica es el uso de sistemas comerciales. Estos constan de una tira plástica de fácil manejo que contiene alrededor de 19 pruebas de asimilación. Ejemplo de estos sistemas son: El sistema Quantum-II de Abbott y el sistema API 20C.

1.6.6 Pruebas inmunológicas.-

Hasenclever y Mitchell demostraron dos grupos antigénicos de C. albicans por aglutinación y absorción de aglutininas. Se demostró que estos grupos A y B eran antigéni-

camente similares a C. tropicalis y C. stellatoidea respectivamente. Un estudio de cepas aisladas de enfermos no descubrió que uno fuera más patógeno que otro (20).

Y aunque las pruebas serológicas han prestado una utilidad indudable para la identificación de especies de Candida los antígenos frente a C. albicans dan lugar a algunas reacciones cruzadas con otras especies de este género e incluso con algunas especies de Cryptococcus, Saccharomyces, Torulopsis y con algunos miembros del grupo Salmonella Cl. Akiba y cols. creen que la prueba de precipitina ejecutada con un polisacárido puro, extraído de cultivos de especies de Candida, proporciona resultados más exactos - que la aglutinación (21).

Otro inconveniente en el uso de pruebas serológicas - es el hecho de que C. albicans puede encontrarse en la boca intestino y vagina de muchas personas normales, lo queda poca significación diagnóstica al hallazgo de aglutininas o de una cutirreacción positiva. Sin embargo, un titulo elevado repetido, podría despertar sospechas de candidiasis diseminada en pacientes con enfermedades debilitantes y también de enfermedad mucocutánea crónica (23).

1.6.7 Inoculación a animales de experimentación.-

C. albicans es patógena para los animales de laboratorio. Los conejos inyectados por vía intravenosa con 1 ml - de una suspensión salina al 1% murieron en cuatro o cinco-

días, con tumefacción renal acompañada de gran número de - pequeños abscesos blancos diseminados por la corteza. Las- inyecciones intracutáneas en conejos producen abscesos en- 48 horas. También C. albicans es patógena para ratones -- cuando se inyecta por vía intravenosa, o intraperitoneal - en mucina gástrica de cerdo al 5% (20). Los ratones son - más susceptibles si se han tratado previamente con cortiso na o radioterapia, por lo que son extensamente utilizados- en estudios relacionados con la patogenicidad de las infec ciones por C. albicans más que para fines diagnósticos en- el laboratorio clínico (29).

1.7 Justificación y objetivo del trabajo.-

Aunque el estudio de la candidiasis data casi desde - los principios de la microbiología, la ubicuidad, adaptabi lidad y patogenicidad de Candida albicans y especies rela- cionadas durante la presente era de antibióticos, los man- tiene como importantes causantes 'primarios' de algunas -- formas de candidiasis y como un problema de diagnóstico -- como agente secundario en pacientes bajo esta terapia.

En general se podría considerar a C. albicans como un miembro normal de la flora del hombre. Así mismo se encuen tra en la vagina de gran cantidad de mujeres sanas no sien do patógeno primario. Sin embargo cuando cualquier factor- interfiere cambiando las condiciones normales del medio va ginal o provocando una alteración en la proliferación nor- mal de los demás miembros de la flora microbiana, este or-

ganismo se multiplica con rapidez tornandose patógeno.

De este modo la candidiasis vaginal es hoy día uno -- de los problemas patológicos producidos más frecuentemente por la especie albicans; así, la vagina viene a ser la - fuente más común para el aislamiento de este microorganismo, y no teniendo la colonización la mayoría de las veces- sintomatología propia la infección pudiera prestarse a confusiones diagnósticas con otras vaginopatías.

La confirmación del diagnóstico etiológico por el laboratorio clínico se considera de gran justificación y nosólo un estudio más del que se pudiera prescindir.

Basados en estos conceptos el propósito de este estudio es el de afinar el proceso en el diagnóstico microbiológico de C. albicans en nuestro medio.

Primeramente, poniendo de manifiesto las caracteristicas y cualidades que presenta el medio agar base con verde de bromocresol como indicador en el aislamiento primario e identificación de especies de Candida sobre los medios deprimoaislamiento ahora usados en este laboratorio, los cuales no son selectivos para Candida lo que permitiría además el crecimiento de los demás microorganismos presentes- en la vagina dificultando la identificación temprana de - las especies de Candida.

Además, el contar con un medio de aislamiento prima -

rio que identifique con un gran porcentaje de seguridad - las especies de Candida de importancia médica en nuestro - medio es de gran significación principalmente para los laboratorios, que por razones económicas o para los que es - esencial la rapidez y presición se basen en la demostra -- ción de las reacciones morfológicas y bioquímicas que ca - racterizan a estos organismos, en dicho cultivo.

Otro punto que se cubrirá con el desarrollo del pre - sente estudio será la identificación de otras especies de- Candida que pudieran desempeñar un papel causal en vaginitis además de la especie albicans: lo que permitiría un -- perfil más amplio en el diagnóstico y tratamiento.

Otro aspecto importante será la determinación del por centaje actual en nuestro medio de pacientes con vaginitis de las cuales se aisle especies de este organismo.

2. M A T E R I A L Y M E T O D O

2.1 Procedencia de las muestras.-

El trabajo del laboratorio se realizó a partir de -- 200 muestras de exudado vaginal de pacientes remitidas a - la Sección de Microbiología del Laboratorio de Patología - Clínica del Hospital Dr. Angel Leaño.

Para este estudio se tomó como parámetro único la leucorrea, no estableciéndose límite de edad para la inclusión en el estudio.

2.2 Metodología microbiológica.-

2.2.1 Toma de la muestra.-

La toma se hizó mediante el uso de espejo vaginal, - por medio de dos hisópos estériles. Con uno de ellos se - practicaron dos frotis para la coloración de gram y se montó un examen directo; el segundo hisópo se introdujó en el medio de transporte y mantenimiento de Stuart.

2.2.2 Microscopía.-

Se buscó en las preparaciones en fresco con solución- salina fisiológica la presencia de pequeñas células (2.5 - 4 micras) de tipo levadura en gemación, ovales y de pared- delgada con o sin elementos miceliales. Así como la presencia de Trichomonas vaginalis. En los frotis teñidos con la coloración de Gram además de células de levadura se buscó-

la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) como - indicativo de respuesta inflamatoria los cuales se reporta ron de la siguiente manera:

Esquema 1. Relación utilizada en el Hospital Dr. Angel Leaño entre el número de cruces y el número de PMN por campo (objetivo 100X).

0 - 1	.....	1+
1 - 5	.....	2+
5 - 30	.....	3+
Más de 30	.....	4+

Además de evaluarse la presencia, disminución o ausencia de flora normal vaginal (flora de Döderlein).

2.2.3 Primoaislamiento .-

Se realizó según la metodología convencional utilizada en el Laboratorio Clínico de este hospital para el estudio microbiológico de exudado vaginal y que consiste en:

Agar Sangre de carnero al 5%	:	Crecimiento de casi todo excepto N. *gonorrheae* y algunos *Haemophilus*.
Agar de Columbia CNA (Colemicina, Ac. nalidíxico) sangre humana al 5%.	:	Cocos y bacilos gram - positivos, *Gardnerella*

Agar chocolate : N. gonorrheae, Haemophilus y otros.

Incubando a 37°C y en atmósfera de CO_2 al 10%.

Por otro lado en este paso se sembró el medio evaluado, Agar base para Candida con verde de bromocresol (BCG)- a comparar con la metodología rutinaria del propio laboratorio. Incubándose a temperatura ambiente.

El medio a estudiar se preparó en el laboratorio se - gún la fórmula de Harold y Snyder (33) : Ingredientes por-litro:

Peptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Verde de bromocresol .....0.02 g .	

pH final 6.1 ± 0.1 a 25°C.

1. Se suspendió en agua destilada o desionizada.
2. Se esterilizó a 15 Lbs de presión (121°C) durante 15 - minutos.
3. Se dejó enfriar aproximadamente a 50°C para añadir 1.33 ml de Kanamicina de 75 mg/2ml (como inhibidor de orga-- nismos gram negativos) y 0.0038 g de Vancomicina (como- inhibidor de organismos grem positivos).
4. Se distribuyó en cajas de Petri estériles y se almacenó de 2-8°C.

2.2.4 Evaluación comparativa de los medios de primo - aislamiento.

Después de cada 24 horas se hicieron tres revisiones- de los medios haciendo una comparación de los medios de - primoaislamiento siguiendo los siguientes parámetros:

- Crecimiento (semicuantificación ver esquema No. 2)
- Tamaño de la colonia
- Características especiales: Forma, color, etc.
- Crecimiento de flora normal en el medio.

Después de la revisión de las colonias se hicieron - los respectivos frotis y se tiñeron con azul de metileno - en busca de los organismos levaduriformes.

2.2.5 Pruebas de identificación de especies de Candida.

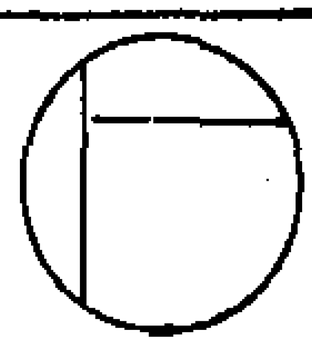
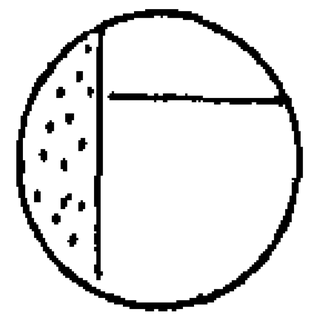
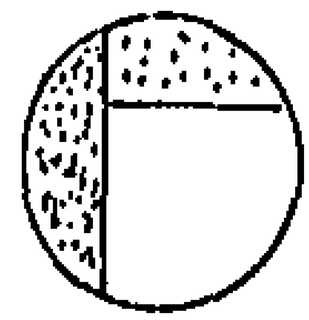
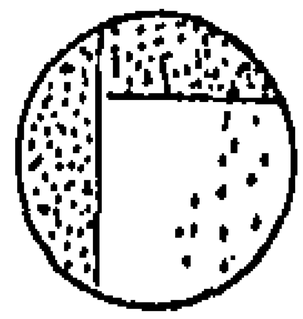
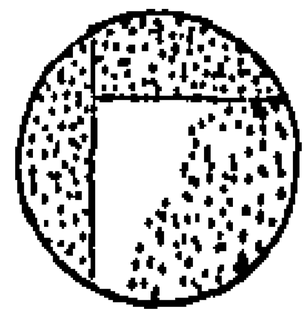
- Producción de Clamidosporas en agar con harina de - maíz.

A partir de las colonias aisladas en el medio agar - base para Candida con verde de bromocresol se tomó una pequeña porción la cual se inoculó raspando una línea recta- en el medio y estriando sobre ella (Fig. 1B).

Se incubó a temperatura ambiente por lo menos 48 horas y se observó al microscópio con objetivo 20X colocando - las cajas invertidas sobre la platina.

Pudiendo observar en los casos de C. albicans clami -

Esquema No. 2: Técnica de semicuantificación del crecimiento colonial por cruces utilizada en el Laboratorio del Hospital Dr. Angel Leaño (y seguida en el presente estudio).

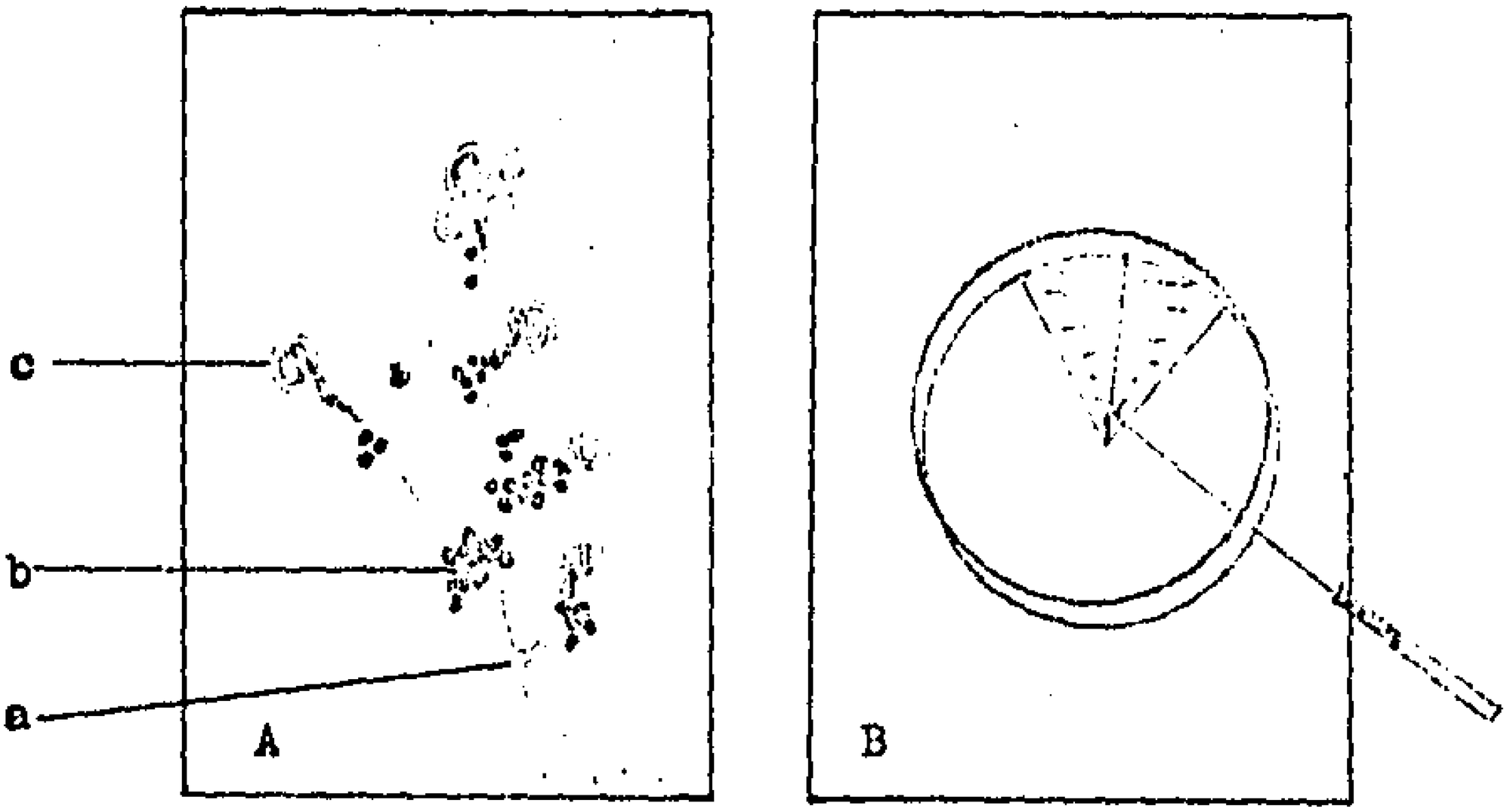
Crecimiento	Sector I	Sector II	Sector III	
Negativo	No crecimiento	No crecimiento	No crecimiento	
1+ escasa cantidad	colonias aisladas (3-30 col)	No crecimiento	No crecimiento	
2+ moderada cantidad	crecimiento confluente (abun.cols)	Colonias aisladas	No crecimiento	
3+ abundante cantidad	crecimiento confluente (abun.cols)	crecimiento confluente (abun.cols)	colonias aisladas	
4+ muy abundante cantidad.	crecimiento confluente	crecimiento confluente	crecimiento confluente ó muchas colonias aisladas.	

dosporas aislados ó en racimos. Al final o a lo largo del pseudomicelio en los cuales también se observan racimos de blastosporas (Fig. 1A).

- Formación de tubos germinales.-

Esta prueba se realizó en suero humano (0.5 ml) colocando en él una porción de una colonia aislada en medio agar base para Candida con verde de bromocresol y dejando incubar a 37°C por tres horas. La observación se practicaba después de este tiempo con objetivo seco fuerte, pudiéndo observarse en el caso de C. albicans la formación de tubos germinales.

Figura 1. A)Candida albicans: a- Seudohifas; b- acúmulos de blastosporas; c- clamidosporas. B) Técnica de sembrado para la producción de clamidosporas.



- Pruebas serológicas.-

La comprobación serológica de la especie albicans se- realizó mediante la reacción de aglutinación antígeno - anticuerpo, esta prueba se llevó a cabo utilizando el Anti-- suero Difco: Bacto Candida albicans Antiserum (Code 2281)- el cual produjo una aglutinación macroscópica muy marcada- frente a una gota de una suspensión abundante de C. albi-- cans; sin embargo con cepas que resultaron no ser C. albicans también se presentó aglutinación aunque muy débil - (28).

- Pruebas de fermentación y asimilación .-

Para confirmar las cepas que caracterizaban ser C. albicans así como para identificar las cepas no albicans se- utilizó el Sistema Quantum II de Abbott para la identificación de levaduras, así como la prueba de fermentación de - azúcares por el método de Wickerham (9).

Esquema 3. Guía de trabajo del presente estudio.

Hisópo con muestra problema de exudado vaginal transportado en medio de Stuart.

- Primoaislamiento en medios usados rutinariamente en este hospital (72 hs)
  - Identificación de C. albicans por producción de tubos germinales en suero humano.
- Primoaislamiento en medio BCG. (72 hs)
  - Verificación de la morfología celular con tinción de azul de metileno.
- Observación de frotis y preparación en fresco con sol. salina fisiológica.
- Inducción de la formación de clamidiosporas en Corn meal agar (2a6 días a T° ambiente).
- Resiembra en medio BCG sin azúcar- 24 hs a T° ambiente.
  - Identificación de especie por medio de pruebas de asimilación y fermentación de azúcares.
  - Comprobación de especie albicans con antisuero específico.

3. R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos al evaluar el medio Agar Base para Candida con verde de bromocresol (BCG) al mismo -- tiempo que se realizaba la comparación con los medios rutinarios de primoaislamiento utilizados en el Laboratorio de Análisis Clínicos de este hospital fueron los siguientes:

- Crecimiento semicuantitativo (pag. 32).-

En el medio agar Base para Candida con verde de bromocresol fué mayor que en los medios rutinarios usados en este laboratorio. Se encontró en 15 casos un aumento de 1+ - en el desarrollo en BCG; además 27 casos mostraron desarrollo positivo en BCG y resultados negativos en los cultivos de uso rutinario.

- El tamaño de las colonias y su comparación con los- medios rutinarios se pueden observar en las tablas No. 1 y 2.

Tabla No. I : Las colonias en BCG mostraron el siguiente desarrollo.-

día	C. albicans	T. glabrata
1er	menor de 1 mm	menor de 1 mm
2do	de 1 a 11/2mm	de 1 a 2 mm
3er	de 11/2 a 3mm	de 2 a 4 mm

Tabla II. Desarrollo colonial en Agar Sangre y Chocolate.

día	C. albicans	C. glabrata
1er	menor de 1mm	Similar a
2do	1 1/2 a 2 mm	C. albicans
3er	2 a 3 mm	

-Características especiales (color, textura y forma) de las colonias:

En medio BCG.-

C. albicans: Colonias redondas de borde y superficies lisas (sólo dos cepas mostraron filamentaciones 'forma de araña', ver figura 2A); elevadas; color amarillo pálido a ligeramente verde con intensidad disminuyendo desde un punto central gris verde a un color pálido en el borde aunque algunas cepas pueden tener un anillo exterior color verde; aspecto cremoso y el medio presentó un claro virajo de color azul amarillo (figura 2B). Olor a levadura.

T. glabrata: Colonias redondas de bordes y superficies lisas, se presentaban más aplanadas que las de C. albicans; el color es verde pálido a verde

medio y la base tiene el mismo color pero - en menor intensidad; aspecto cremoso. El olor es más intenso.

C. parapsilosis: Colonias redondas de bordes y superficies lisas; elevadas, el color es amarillo verdoso el cual diminuye en los bordes; aspecto cremoso. Olor a levadura y medio con viraje a amarillo.

En medio de Agar Sangre y Chocolate.-

Colonias tipo levadura: Redondas con bordes y superficies- lisas (en algunos casos C. albicans filamenta en forma de colonius tipo 'araña'). Son elevadas, de un tono ligeramente gris - a blanco de aspecto cremoso y olor a levadura.

- Crecimiento de otra flora vaginal.-

El medio BCG con Kanamicina y Vancomicina como inhibidores de la flora bacteriana mostró una alta selectividad- para organismos levaduriformes ya que en sólo 2 de las cajas con crecimiento de levaduras hubo presencia de colo -- nias de bacilos gram positivos. Sin embargo estas colonias resultaban facilmente diferenciables ya que éstas eran semejantes al color del medio el cual no era modificado. Ad-

Figura 2A : Colonias de C. albicans mostrando fila - mentaciones 'forma de araña'. Cultivo de 72 horas. En el- medio BCG.

Figura 2B : Colonias típicas de C. albicans en me- dio BCG. Cultivo de 48 horas.

Figura 2C : Ausencia de desarrollo despues de 72 horas de incubación a temperatura ambiente. El medio conserva su color inicial.

más su morfología fué diferente a la presentada por las levaduras ya que estas colonias eran de bordes y superficies rugosas y bastante planas.

Tabla III. Estos resultados muestran la confiabilidad de las pruebas para identificación de especies de Candida en función de la presencia o no de tubos germinales y clamidosporas.

Especie	Pseudomicelio en frotis		Pseudomicelio en suero.	Clamidosporas.	Ambas pruebas negativas.
	Positivo	negativo			
C. albicans	18	9	49	45	1
T. glabrata	0	15	0	0	15
C. parapsilosis.	0	2	0	0	2

Nota: En 23 casos con desarrollo en BCG no se reportó presencia de levaduras, en los frotis y preparación en fresco.

- Prueba serológica.

La aglutinación observada de las cepas de C. albicans

con el antisuero (Bacto Candida antiserum de Difco) fué - muy marcada; mientras que las cepas de T. glabrata aunque mostraron aglutinación ésta fué más fina. En los casos de C. parapsilosis no se observó aglutinación.

- Bioquímicas.

La identificación de especies por pruebas de asimilación y fermentación de azúcares dieron los resultados que aparecen en la tabla IV. A partir de un total de 67 cajas con desarrollo de levaduras en el medio BCG.

Tabla IV. Resultados de la identificación de especie por medio de pruebas de asimilación y fermentación.

No. de cepa	Especie
50	C. albicans
15	T. glabrata
2	C. parapsilosis

Estos resultados también fueron utilizados para confirmar el grado de confiabilidad en el diagnóstico a partir de las características de crecimiento colonial que - presentó C. albicans en el medio de primoaislamiento en - BCG.

Dando un resultado de acierto de un 92 por ciento.

Tabla V. Correlación de la presencia de leucocitos - PMN en el exudado vaginal (observado con objetivo de 100X) ver esquema 1. con la identificación de organismos encontrados en el presente estudio relacionados con vaginitis - así como su relación con la flora normalmente encontrada - en vagina. Ver pág. 10.

Organismo Presente.	Cuantificación de leucocitos en cruces				
	0+	1+	2+	3+	4+
Candida	4	10	28	22	3
T. vaginalis	0	0	1	1	1
G. vaginalis	0	8	14	24	2
FNV'	4	21	28	17	0
Ningún desarrollo	0	2	0	1	0

Tabla VI. Relación entre la presencia de las levaduras encontradas en el presente estudio con otros microorganismos.

Organismos levaduriformes	T. vaginalis	G. vaginalis	FNV'
C. albicans	0	15	50
T. glabrata	0	0	15
C. parapsilosis	0	0	1
Ninguna levadura.	3	33	118

' - ver página 10.

4. C O N C L U S I O N E S

Siendo las infecciones vaginales la causa más frecuente de consulta ginecológica y teniendo como característica general la leucorrea la cual si bien puede presentar características dependiendo de la etiología; en la mayoría de los casos estas pueden presentar variaciones haciendo inseguro el diagnóstico clínico por el simple examen ginecológico, por lo que la participación del laboratorio representa una valiosa ayuda y no un simple lujo en el diagnóstico clínico correcto.

- Siendo necesario un diagnóstico rápido y eficaz por parte del laboratorio y el médico para poder ofrecer un -- tratamiento satisfactorio deben buscarse métodos que a la- vez que resulten económicos y de fácil adquisición, proporcionen un alto grado de confiabilidad.

Buscando un medio selectivo que presentara características que permitieran un desarrollo fácil de las especies- de Candida (organismo muy relacionado con vaginitis) y a - la vez que presentaran ciertas características morfológi - cas que ayudaran a diferenciarlas entre sí a partir del -- primoaislamiento con un grado de precisión que permitiera- acelerar el diagnóstico presuntivo, se evaluó el medio de- agar Basu para Candida con verde de bromocresol obteniendo resultados satisfactorios.

- Podemos concluir que el uso de un medio de primoaislamiento selectivo con un indicador de pH (verde de bromo-

cresol) es de gran ayuda en el diagnóstico microbiológico,- y que las especies de levaduras presentaron en él, diferencias en las características morfológicas de sus colonias - (color, tamaño, forma, etc.) que pueden ser relacionadas - con las especies comunes en el transcurso de la práctica - rutinaria.

- Esto es importante, ya que en la mayoría de los laboratorios resulta incosteable tener como práctica rutinaria la identificación bioquímica y/o serológica de espe -- cies tanto por la inversión económica como de tiempo.

- Aunque Candida albicans es en la mayoría de los casos considerada como la única especie patógena y su identificación y su identrificación por la prueba de producción - de tubo germinal en suero es altamente confiable, corta y- disponible a la mayoría de los laboratorios, no debe ignorarse el valor que tiene el hallazgo de otras especies como causantes también de patología.

- En este punto cabe hacer notar que los resultados - obtenidos en este estudio mostraron un porcentaje del 22%- de casos de T. glabrata de las cepas de levaduras aisladas de pacientes con vaginitis. Esto tiene gran significación- ya que concuerda con otros autores (6,7,33) que encontra-- ron dicha patología. T. glabrata (ahora conocida como Candida glabrata) como la infección micótica vaginal más co-- mún después de la producida por C. albicans.

Ya que otras especies de este género pueden desempe - ñar un papel causal de vaginitis es justificable realizar- estudios que evidencien las especies aisladas comunmente - en cada medio. Con este fin es conveniente utilizar prue-- bas de fácil manejo y que ofrezcan confiabilidad como lo - son los sistemas de identificación para levaduras, existen tes en el mercado.

- Con estos datos y a partir de cierta práctica en el uso del medio BCG se pueden observar a simple vista las ca racterísticas morfológicas que ayudan en la diferenciación de las distintas especies de este género comunmente aisla- das en nuestro medio, lo que facilitaría un diagnóstico; - ya que resultaría más sugerente para el médico relacionar- una vaginitis a T. glabrata a que solamente se reporte co- mo Candida sp.

- En este estudió también pudimos concluir que el por centaje de pacientes con colonización y/o infección vagi - nal por levaduras (33.5%) fué mayor al de otros organismos relacionados con vaginitis como G. vaginalis (24%) y T. va ginalis (1.5%) en nuestro medio.

También podemos sugerir que el número de leucocitos - PMN encontrados no puede tomarse como punto significativo- para un sólo tipo de infección o para el grado de ésta, ya que los resultados no mostraron en ningún caso una rela -- ción proporcional.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

5. B I B L I O G R A F I A

1. Bertholf M.E., and Stafford M.J., colonization of Candida albicans in Vagina, Rectum, and Mouth. The Journal of family practice. Vol. 16: No. 5, 1983, pag. 919 - 924.

2. Brawner D.L., and Cutler J.E., Variability in Expression of a Cell Surface Determinant on Candida albicans as -- Evidenced by an Agglutinating Monoclonal Antibody. Infection and Immunity. Vol. 43: No. 3, 1984, pag. 966 - 972.

3. Casal M., and Linares M.J., Preliminary Investigation of Candida albicans Biovars. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 18: No. 2, 1983, pag. 430 - 431.

4. Casal M., y Linares M.J., Evaluación del sistema API 20C para la identificación rápida de organismos levaduriformes. Rev. Lat. amer. Microbiol. Vol. 26: 1984, pag. 77 - 80.

5. Charles D., y Glover D.D., Vaginopatías infecciosas. Mundo Médico. Vol 13: No. 143, 1986, pag. 85 - 92.

6. Conde C.J., Cervicovaginitis: una visión panorémica. Infectología. Vol. 5: No. 2, 1985, pag. 30 - 31.

7. Friedrich E.G., Vaginitis. American Journal of Obstetrics and Gynecology. Vol. 152: No. 3, 1985, pag. 247 -249.

8. Garrocho C., Adame L., Ruiz M.P., y Torres A.B., Candidiasis y tricomoniasis vaginal ¿pueden diagnosticarse - clínicamente con seguridad? . Ginecología y Obstetricia de México. Vol. 51: No. 316, 1983, pág. 199 - 203.

9. Mc Courtie J., and Douglas L.J., Relationship Between - Cell Surface Composition, Adherence, and Virulence of - Candida albicans. Infection and Immunity. Vol. 45: No. 1 1984, pag. 6 - 12.

10. Lee J.C., and King R.D., Characterization of Candida albicans Adherence to Human Vaginal Epithelial Cells in -- Vitro. Infection and Immunity. Vol. 41: No. 3, 1983, pag 1024 - 1030.

11. López R., Ruíz D., Robledo M.M., Vargas M.L., Significación patogénica de Candida en pacientes con vaginitis. -

Ginecología y Obstetricia de México. Vol. 50: No. 302 - 1982, pag. 145 - 148.

12. Persi M.A., Burnham J.C., and Duhring J.L., Effects of- Carbon Dioxide and pH on Adhesion of Candida albicans - to Vaginal Epithelial Cells. Infection and Immunity. - Vol. 50: No. 1, 1985, pag. 82 - 90.

13. Salkin I.F. New Medium for Differentiation of Candida - albicans from Candida stellatoidea. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 9: No. 4, 1979, pag. 551 - 553.

14. Schlitzer R.L., and Ahearn D.G., Characterization of A- typical Candida tropicalis and Other Uncommon Clinical- Yeast Isolates. Journal of Clinical Microbiology, Vol.- 15: No. 3, 1982, pag. 511 - 516.

15. Shepherd M.G., Pathogenicity of Morphological and Auxo- trophic Mutants of Candida albicans in Experimental In- fections. Infection and Immunity. Vol.50: No. 2, 1985,- pag. 541 - 544.

16. Sobel J.D., Muller G., and Buckley H.R., Critical Role- of Germ Tube Formation in the Pathogenesis of Candidal- Vaginitis. Infection and Immunity. Vol. 44: No. 3, 1984 pag. 576 - 580.

17. Sutherland J.E., Vaginitis: diagnóstico y tratamiento - médico. Mundo Médico. Vol. 12: No. 127, 1984, pag. 57 - 64.

18. Witkin S.S., Defective inmune responses in Patients -- with Recurrent Candidiasis. Infections in Surgery. Vol. 3: No. 46, 1985, pag. 677 - 680.

19. Campbell M.C., and Stewart J.L., The Medical Mycology - Handbook. E.U.A.; Ed. Wiley Medical Publication. 1980.

20. Conant, Smith, Baker, Callaway. Micología. Tercera Edi- ción, México; Editorial Interamericana, 1972.

21. Davis D.B., Dubelcco, Cisen, Ginsberg, Wood. Tratado de Microbiología. Segun edición. México; Editorial Salvat,

1984.

22. Emmons C.W., Chapman H.B., Utz J.P., Kwon-Chung. Medi - cal Mycology. Third edition, E.U.A.; Ed. Lea & Febiger.

23. Freeman B.A., Tratado de Microbiología de Burrows. 21a. edición. México; Editorial Interamericana, 1983.

24. Gardner H.L., Raymond H.K., Benign diseases of the vulva and vagina, First Edition. E.U.A. The C.U. Mosby Co. 1969.

25. Davidson H.N., Israel M.D., Henry J.B. Todd - Sanford,- Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6ta. Ed. México Editorial Salvat, 1983.

26. Koneman, Allen, Dowell, Sommers, Diagnóstico Microbiológico. Primera Edición. México; Editorial Panamericana,- 1983.

27. Myrvik, Pegnall, Weiser. Bacteriología y Micología Médica. 1era. Ed. México; Editorial Interamericana, 1977.

28. Silva E., Identificación de Candida albicans por medio- de antisuero específico de cepas procedentes de muestras clínicas. Tesis para obtener el grado de Q.F.B. -- Guadalajara, Jal., México. 1986.

29. Smith, Conant, Overman, Beard, Willett, Larsh, Amos, - Emijewsk, Glaseman, Osterhout, Sharp. Microbiología de- Zinsser. Tercera edición, México; Ed. UTHEA, 1985.

30. Vontver L.A., Gamette K.R. Differential Diagnosis Gynecology. Second Edition. E.U.A.; Appleton - Century - -- Crafts, 1984.

31. Willard J. Medical Micolgy. First Edition. E.U.A. W.B.- Saunders Co. 1974..

32. Youmans G.P., Paterson P.Y., Sommers H.M. Infectología- Clínica. 2da. edición, México; Ed. Interamericana,1984.

33. Difco Technical Information, Detection and Identifica - tion of Candida albicans, Difco laboratories, USA, 1976