



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS.
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POSGRADO**

**"INCIDENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE CANDIDA EN
EXUDADOS VAGINALES EN POBLACION DERECHOHABIENTE
DE UN HOSPITAL DE LA SECRETARIA DE SALUD"**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

PORFIRIO VEGA HERNANDEZ

ASESORADO POR:

M.C. J. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

1994



T

RG 269

.C 35

V4

c. 1



1080076871



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
DE POSGRADO**

**"INCIDENCIA DE DIFERENTES ESPECIES DE CANDIDA EN
EXUDADOS VAGINALES EN POBLACION DERECHOHABIENTE
DE UN HOSPITAL DE LA SECRETARIA DE SALUD"**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

PORFIRIO VEGA HERNANDEZ

ASESORADO POR:

M.C. J. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

1994





T
RF 269
CBS
V4



NUNCA DIGAS CUAN GRANDES SON TU BONDAD Y TU INTELIGENCIA.
DEMUESTRALO PACIENTEMENTE CADA DIA.

SI TE PROPONES A CAMBIAR A MEJOR, DIFICILMENTE LO
CONSEGUIRAS. SI NO TE LO PROPONES, CAMBIARAS A PEOR.

DEDICATORIAS

A TI SEÑOR:

POR GUIAR TODOS LOS PASOS QUE HE DADO,
E ILUMINARME EN LAS DETERMINACIONES QUE HE TOMADO.

A MIS PADRES:

POR TODO EL APOYO Y COMPRESION QUE SIEMPRE ME HAN
BRINDADO, GRACIAS A ELLO HE LOGRADO LO MUCHO O LO POCO QUE
SOY, PARA ELLOS TODO MI CARIÑO Y GRATITUD.

A MI ESPOSA E HIJO:

A MARU POR HABERME OTORGADO TODO:
CARIÑO, APOYO, COMPRESION, MOTIVACION Y U N HIJO,
FORMANDO ASI MI PROPIA FAMILIA.

A DANIEL POR SER EL, EL PRINCIPAL ALICIENTE PARA
TERMINAR MI CARRERA.

A MIS HERMANOS:

JULIETA Y FRANCISCO POR SOPORTARME Y AGUANTARME Y PARA
ENSEÑARLES QUE LAS LIMITACIONES Y BARRERAS QUE HAY EN LA
VIDA, UNO LAS CREA Y SOLO UNO LAS PUEDE SUPERAR.

A MIS ABUELOS:
POR TODO EL CARIÑO QUE ME DIERON Y QUE ME HAN DADO.

A MIS TIOS:
POR TODAS LAS ENSEÑANZAS Y CONSEJOS
QUE HE RECIBIDO DE ELLOS

A MIS SUEGROS:
SR. EFREN Y SRA. IRMA, ASI COMO TAMBIEN A LA SEÑORAS.
AMALIA Y BETTY, POR LA PACIENCIA, CONFIANZA Y APOYO
QUE ME HAN BRINDADO.

A LA FAMILIA DURON CARRIZALES:
POR AYUDARME Y ALENTARME EN LOS MOMENTOS DIFICILES QUE
PASE, ESPECIALMENTE A JUAN CARLOS QUE LO CONSIDERO COMO
UN HERMANO MAS.

A MIS AMIGOS:
A TODOS Y A CADA UNO DE ELLOS POR COMPARTIR MOMENTOS
Y EXPERIENCIAS INOLVIDABLES, POR ESE APOYO QUE SIEMPRE
ME HAN DADO DE UNA MANERA INCONDICIONAL.

A MIS MAESTROS:
POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS, CONSEJOS Y EXPERIENCIAS,
A TODOS ELLOS LES DOY LAS GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA U.A.S.L.P.

M.C. J. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ.

POR EL ASESORAMIENTO Y AYUDA EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO. POR BRINDAR NO SOLO SUS CONOCIMIENTOS SINO TAMBIEN SU AMISTAD, PARA EL, MI ADMIRACION, RESPETO Y AGRADECIMIENTO COMO PERSONA Y MAESTRO.

Q.F.B. MARIA EUGENIA TORRE.

POR BRINDARME SU AMISTAD, COOPERACION, EXPERIENCIA Y APOYO.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL PARA:

DRA. CLAUDIA ROMANO MORENO.

Q.F.B. ANA JULIA MARURI JIMENEZ.

Q.F.B. MATILDE CERVANTES CASTILLO.

POR TODAS Y CADA UNA DE SUS SUGERENCIAS
ASI COMO SU COLABORACION.

INDICE GENERAL

TITULO	PAGINA
RESUMEN	I
INTRODUCCION GENERAL	1
GENERALIDADES Características Macro y Microscópicas de las diferentes especies de <u>Candida</u>	3
ANTECEDENTES	7
OBJETIVOS (General y Particulares)	8
MATERIAL Y METODOS Material de Cristaleria y Varios.	9
MATERIAL BIOLOGICO	10
PREPARACION DE REACTIVOS Y SUSTANCIAS	10
PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	11
PREPARACION DE REACTIVOS	12
METODOLOGIA	14
Tabla No. 1.- Características Fisiológicas para la identificación de las diferentes especies de <u>Candida</u> .	17
RESULTADOS Anexo de la descripción de:	18
a).- Fotografias	
Foto No. 1.- Filamentación en Suero de las muestras analizadas.	19
Foto No. 2.- Producción de Clamidosporas por <u>Candida albicans</u>	20

TITULO	PAGINA
Foto No. 3.- Fermentación y asimilación de Carbohidratos por las diferentes especies de <u>Candida</u>	21
a).- Gráficas	
Gráfica No. 1.- Porcentaje de positividad de las muestras analizadas (En base a 290 muestras.)	22
Gráfica No. 2.- Frecuencia de las diferentes especies de <u>Candida</u> en las muestras positivas (En base a 87 muestras)	23
c).- Tablas	
Tabla No. 2.- Levaduras encontradas en las diferentes muestras analizadas.	24
Tabla No. 3.- Porcentaje de positividad de las diferentes especies de <u>Candida</u> en las muestras analizadas	25
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFIA	29

RESUMEN

Las levaduras del género Candida habitan generalmente en el tracto digestivo del hombre, otros mamíferos y aves. También puede encontrarse formando parte de la flora de las mucosas bucales y vaginales, y en la zona perianal. Se ha reportado la presencia de C. albicans y otras especies del mismo género en la vagina de la mujer sana no embarazada (5-10%). Esta proporción aumenta durante el embarazo y la administración de anticonceptivos. Por lo anterior, se estudio la frecuencia de diferentes especies de Candida en exudados vaginales de pacientes femeninos que ocurren a consulta externa al Hospital del ISSSTE de San Luis Potosí, S.L.P; Identificando las diferentes especies de Candida por siembra en Agar Dextrosa Sabouraud, pruebas de fermentación y asimilación de azúcares, producción del tubo germinal de clamidosporas.

De 290 muestras de exudados vaginales analizada; se encontró un 30% de muestras positivas y un 70% de muestras negativas para levaduras. De las muestras positivas, se observó una mayor proporción de C albicans (7.2%), seguida de C rugosa (5.%), C krusei (5.1%), y otras especies en proporciones más bajas. De esta forma se concluye que la C albicans se encuentra en mayor proporción que las otras especies, en las muestras analizadas.

INTRODUCCION

Entre las infecciones humanas con mayor incidencia en personas de cualquier clase social, se encuentran las causadas por hongos levaduriformes del género Candida; infectando tanto piel, como uñas y mucosas ya sean orales ó vaginales. (Odds, 1982) .

Los hongos del género Candida se definen como levaduras unicelulares con reproducción asexual, y algunas de ellas tienen desarrollo pseudomicelial y micelial (en condiciones específicas) ya sea por gemación ó brotación. No producen pigmento carotenoide ni asimilan el inositol, debido a la carencia de las enzimas que producen y/o metabolizan dichos compuestos. Sintetizan polisacáridos extracelulares, dando positiva la reacción del Iodo y numerosas especies son capaces de producir fermentación alcohólica (Torres Rodríguez, 1987; Odds, 1982).

La clasificación taxonómica del género Candida está incluida dentro de la familia-forma Cryptococcaceae, clase-forma Blastomycetes, y se incluye en el Phylum-forma Deuteromycotina. (Bonifaz, 1990; Arenas, 1993; Torres Rodríguez, 1987; Casas Rincón, 1967; Ellis, 1994; Koneman, 1983; Herrera y Ulloa, 1990; Glodaere, 1979).

Entre las especies de Candida que destacan en relación con los procesos patológicos en el hombre encontramos: C. parapsilosis, C. tropicalis, C. pseudotropicalis, C. krusei, C. guilliermondii, C. stellatoidea, C. zeylanoides, C. lusitaniae, C. glabrata, y por último la especie presente en la mayoría de los procesos patológicos conocidos como Candidosis, es la C. albicans (Bonifaz, 1991; Ellis, 1994; Koneman y Roberts, 1987; Ulloa y Hanlin, 1987; Greenfield, 1992; Holmes, 1988; Kam, 1978).

Candida albicans habita como parte de la flora normal, tanto del hombre, como de algunos otros animales. (principalmente homeotérmicos), en las mucosas bucal, vaginal e incluso en la zona perianal.

Dentro de los factores que pueden influir en la transición de flora normal a una forma patógena de Candida encontramos (Torres Rodríguez, 1987; Ellis, 1994; Rippon, 1990; Arenas, 1993; Ellis, 1994; Feo, 1981; Diddle, 1969):

- * Higiene bucal defectuosa.
- * Embarazo.
- * Desequilibrio en la flora bacteriana, ya que ésta produce ácido láctico que es un inhibidor del crecimiento levaduriforme.
- * Alimentos ricos en glúcidos.
- * Administración de anticonceptivos y hormonas esteroides, así como de antibióticos de amplio espectro.
- * Enfermedades inmunosupresoras.
- * Personas a las que se les realizó un transplante (principalmente de riñón)

Por otra parte, existen datos que demuestran la presencia de C. albicans y de otras especies de Candida en la vagina de mujeres sanas, no embarazadas (5-10%) (Ellis, 1994; Koneman y Cols., 1987; Koneman y Roberts, 1987; Lennette y Cols., 1987 Monif. 1983); por lo que a la C. albicans se le ha considerado como oportunista endógeno, mientras que las demás especies ocasionalmente patógenas se pueden encontrar como saprobias en:

- * En las mucosas respiratorias.
- * En la zona genital (C. tropicalis y C. pseudotropicalis)
- * En la zona cutánea (C. stellatoidea).
- * En la zona interdigital y umbilical (C. krusei y C. parakrusei).

GENERALIDADES

DESCRIPCION DE LAS ESPECIES MAS COMUNES

Candida albicans

DESCRIPCION MACROSCOPICA: (Robin, Berkhout, 1929, tomado de Bonifaz, 1990).

Colonias blanco cremosas ó amarillentas; lisas y brillantes, de consistencia blanda, que en 48 horas alcanzan de 3 a 5 mm. de diámetro, olor "sui generis" a levadura; al envejecer las colonias se tornan mates, rugosas, con pliegues, esto es en medio de Agar Glucosado y Peptonado de Sabouraud a 37 C (Rippon, 1990; Ellis, 1994; Koneman y Cols., 1987; Arenas, 1993; Herrera y Ulloa, 1990; Lennette y Cols., 1987).

DESCRIPCION MICROSCOPICA:

Se observan formas unicelulares, esféricas ú ovoides; sin cápsula ni pigmento carotenoide, de paredes lisas y su tamaño varía entre 3-6 y 6-12 μ . A estas células se les denomina blastoconidios (óblastosporas), donde su reproducción se realiza por gemación unipolar ó multipolar.

En medios especiales (*Agar Harina de Maíz con Tween 80*) se originan brotes alargados llamados pseudohifas; así como también se producen los típicos y característicos clamidoconidios (ó clamidosporas) terminales, que se desarrollan sobre hifas cortas y más gruesas, de forma esférica, pared gruesa y de diámetro de 10 a 15 μ (Bonifaz, 1990; Arenas, 1993; Ellis, 1994).

Otra característica morfológica es la producción en el suero sanguíneo de tubos germinativos, un apéndice elongado que crece hacia afuera, y tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la célula

levaduriforme; esto ocurre después de 120 minutos a 37° C para C.albicans y de 120 a 180 minutos para C.stellatoidea (Rippon, 1990; Shephero, M.G.,1979), aunque también se ha reportado la inducción del tubo germinal por diferentes aminoácidos (Macías y Cols., 1994).

Candida tropicalis

DESCRIPCION MACROSCOPICA: (Castellani, Berkhout; 1923, tomado de Bonifaz, 1990).

Se observan colonias de color amarillo cera, aspecto liso ó rugoso y al envejecer en el medio se desarrolla micelio alrededor de la colonia.

DESCRIPCION MICROSCOPICA:

En medio de Agar Sabouraud Dextrosa se observan formas ovoidales ó globosas, de 4-7 X 5-10 μ que se reproducen por gemación. En medios más pobres, como Agar Patata Zanahoria, se desarrolla pseudomicelio con células alargadas y abundantes blastoconidios dispuestos sobre la pseudohifa. (Arenas, 1994; Bonifaz, 1990; Ellis, 1994).

En suero sanguíneo no produce tubos germinativos a 37° C en 4 horas de incubación. (Ellis, 1994; Torres Rodríguez, 1987).

Candida guilliermondii

DESCRIPCION MACROSCOPICA: (Castellani, Langeror. y Guerra, 1938, tomado de Bonifaz, 1990).

En medio de Agar Sabouraud Dextrosa se presentan colonias planas y lisas poco brillantes, de color cremoso a las 72 horas. Transcurridas de dos a tres semanas cambian a color rosa pálido, con bordes dentados.(Arenas, 1993; Bonifaz, 1990; Ellis 1994).

DESCRIPCION MICROSCOPICA:

Se aprecian blastoconidios (blastosporas) ovoides de 2-5 X 3-7 μ y células más pequeñas, cortas y cilíndricas. En medios pobres, como *Agar Harina de Maíz con Tween 80*, hay desarrollo del pseudomicelio corto y fino con células ovoides en cadena con blastoconidios verticales. (Arenas, 1993; Bonifaz, 1990; Ellis, 1994).

En suero sanguíneo no produce tubos germinativos a 37° C en 4 horas de incubación. (Ellis, 1994; Torres Rodríguez, 1987)

Candida krusei

DESCRIPCION MACROSCOPICA: Castellani, Berkhout, 1923, tomado de Bonifaz 1990; Arenas, 1993). A las 72 horas de cultivo se aprecian colonias lisas, planas, deslustradas, de color crema amarillento, de consistencia blanda, con desarrollo de pseudomicelio en los bordes. (Arenas, 1993; Bonifaz, 1990; Ellis, 1994; Herrera y Ulloa, 1990).

DESCRIPCION MICROSCOPICA:

Se observan células cilíndricas, alargadas, con diámetro de 3-5 X 7-20 μ . En medios poco ricos en nutrientes, como *Agar Harina de Maíz* ó el *Agar Patata Zanahoria-Bilis*, se encuentra muy desarrollado el pseudomicelio. (Arenas, 1993; Bonifaz, 1990; Ulloa y Hanlin, 1985).

Torulopsis glabrata

Aunque Meyer y Yarrow (1973) propusieron incluir a Torulopsis dentro del género Candida, la opinión más generalizada es la de mantener dos géneros separados. (Anderson, Lodder y De Vries, 1938).

DESCRIPCION MACROSCOPICA:

En *Agar Sabouraud Dextrosa* se desarrollan colonias lisas y blandas de diámetro 1-2 mm. En 48 horas toman color cremoso. (Arenas, 1993).

DESCRIPCION MICROSCOPICA:

Las células son ovals ó redondas de diámetro de 2-4 por 3.5-5 μ , con brotes unipolares, no desarrolla pseudomicelio. (Arenas,1993; Bonifaz,1990).

Esta especie de levadura, se puede confundir con Histoplasma capsulatum, debido a que las levaduras se presentan en el interior de las células, en el caso de infecciones sistémicas(Bonifaz,1990).

NOTA:

Es importante mencionar que cualquier especie de *Candida* crece en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: Agar Sabouraud Dextrosa, Gelosa Sangre, Infusión de Cerebro Corazón y Extracto de levadura.

ANTECEDENTES.

La candidosis vaginal es una de las infecciones más frecuentes del aparato genital de la mujer en los años de procreación (Arenas, 1993.) Las condiciones requeridas no son del todo conocidas. La frecuencia de infección del tracto genital femenino en pacientes no gestantes, ha sido estudiada por diversos autores: Hilton reporta un 28 .% de positividad; Gough y cols. un 31.3 % y Schnell un 29.7% en enfermas ginecológicas y un 9.3 % en los exámenes rutinarios de la población en general. Rojas y Guerrero (1992) reporta mayor frecuencia de C.albicans en pacientes con infección vaginal resistente a tratamiento.

Por otra parte, en nuestro estado hay muy pocos reportes sobre la incidencia de C. albicans en las diferentes poblaciones. En 1990, Moctezuma y Acosta analizaron la frecuencia de diferentes especies de Candida en pacientes de distintas secciones del Hospital Central, tomando 570 muestras de la faringe de pacientes hospitalizados (Con un rango de edad de recién nacido hasta 90 años), reportando que la presencia en la población total fue de un 13 % para C. albicans y de un 14.5 % para Candida sp., y la presencia de la levadura fue de un 15.5% en el sexo femenino y de un 8% en el sexo masculino, mientras que de acuerdo a la edad de los pacientes estudiados y en base a los intervalos propuestos se encontró una frecuencia significativamente mayor (p 0.01) en los niños de 5 días a 3 años de edad, obteniéndose un 23% para C.albicans y de un 24 % para Candida sp. Por lo anterior, sería de interés conocer la frecuencia de diferentes especies de Candida en otras poblaciones de esta ciudad.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la incidencia de diferentes especies de Candida en exudados vaginales.

OBJETIVOS PARTICULARES

* Determinar la incidencia de cada especie en los exudados vaginales, en una población de un Hospital de la Secretaría de Salud.

* Determinar qué especie de Candida es más frecuente en la población analizada.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL DE CRISTALERIA:

- Cajas de petri de vidrio .
- Tubos de ensaye de diferentes tamaños.
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Cámara de Neubauer.
- Agitador.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Campanas de vidrio (Tubo de Durham invertido).
- Tubos de Wickerham.

VARIOS:

- Mechero de Bunsen.
- Balanza granataria.
- Espátula.
- Estufa bacteriológica. (FELISA).
- Gradilla metálica.
- Asa de platino.
- Microscopio binocular (NIKON OPTIPHOT-2 TYPE 104)
- Autoclave.
- Baño serológico (YAMATO, SHAKING BATH. CONSTANT TEMPERATURE. MODEL BT-25.)
- Taponés de algodón.
- Micropipetas de 200 y 1000 ml.
- Refrigerador.

MATERIAL BIOLÓGICO:

- 1.- Exudados vaginales.
- 2.- Suero humano.

REACTIVOS Y SUSTANCIAS:

- Hidróxido de sodio al 1 %
- Solución salina al 0.85% estéril.
- Azul algodón lactofenol.
- Rojo de bromocresol.
- Tween 80.
- Cloramfenicol (Antibiótico para el medio de cultivo).

MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar Sabouraud Dextrosa. (Lab. DIBICO)
- Extracto de levadura. (Lab. DIBICO)
- Agar Harina de Maíz (Preparación casera).

CARBOHIDRATOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

- Glucosa.
- Sacarosa.
- Maltosa.
- Galactosa.
- Lactosa.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

AGAR HARINA DE MAIZ

Harina de maíz	40 g.
Agar bacteriológico	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

Esterilizar en autoclave a 1 atm. de presión durante 10 ó 15 minutos.

USOS: Medio para producción de pseudomicelio y clamidosporas en el género Candida

MEDIO DE WICKERHAM

Extracto de levadura	4.5 g.
Peptona	7.5 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

Añadir rojo de bromocresol y agregar unas gotas de hidróxido de sodio al 1% hasta tomar un color rojo naranja intenso. Colocar 4 ml. de este medio en tubos de ensaye de 12 por 150 con tapón de rosca y esterilizar a 0.6 atm. de presión por 15 minutos. Añadir 1 ml. de la solución de azúcares a utilizar al 6% previamente esterilizadas a 0.75 atm. (10 libras) por 15 min.

USOS: Medio para fermentación de sustancias hidrocarbonadas.

AGAR SABOURAUD DEXTROSA (ASD)

Mezcla de peptonas	10.0 g.
Dextrosa	40.0 g.
Agar bacteriológico	15.0 g.
Agua destilada	1000.0 ml.
pH final	5.6 9+ 10.2

Suspender 65 g. del medio en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme y esterilizar a 1 atm. de presión por 15 minutos. Enfriar y vaciar en tubos de ensaye previamente esterilizados.

USOS: Para cultivo de Candida y Dermatofitos.

PREPARACION DE REACTIVOS

SOLUCION SALINA ESTERIL AL 0.85 %.

Se disuelven 0.85 gr. de cloruro de sodio en 100 ml. de agua destilada. Esterilizar a 1 atmósfera de presión durante 15 min., guardar en refrigeración de 4-10° C.

USOS: Para toma de muestras y diluciones de las mismas.

SUERO SANGUINEO.

Se disuelven a 0.85 gr. de cloruro de sodio en 100 ml. de agua destilada. Esterilizar a 1 atmósfera de presión durante 15 min. guardar en refrigeración de 4-10° C.

USOS: Para toma de muestras y diluciones de las mismas.

SUERO SANGUINEO:

Preparación.- Se extrae sangre periférica de un individuo sano, se deja coagular a temperatura ambiente, se remueve el coágulo para posteriormente centrifugarse a 3 000 rpm/ 5 min., para separar el suero del resto de los componentes sanguíneos.

USOS:

Para pruebas de inducción de tubo germinal en C.albicans y C. parapsilosis.

SOLUCIONES DE CARBOHIDRATOS:

Preparación.- Se disuelven 20 gr. del carbohidrato a utilizar en 100 ml. de agua destilada, en baño de agua a 56° C durante 5 min. Esterilizar a una presión de 0.75 atm. durante 15 min.

USOS:

Para la fermentación y asimilación de carbohidratos por las levaduras.

INDICADOR ROJO DE BROMOCRESOL:

Preparación.- Disolver 0.04 gr. de rojo de bromocresol en 100 ml de agua destilada, añadir una pequeña cantidad de hidróxido de sodio 1 N para alcalinizar la solución y dejarla en reposo hasta el día siguiente, una vez solubilizado el colorante, añadir ácido clorhídrico 1 N hasta un pH neutro, después añadir 100 ml del indicador a 1 lt. del caldo de fermentación (Medio de Wickerham).

USOS:

Como indicador de pH.

METODOLOGIA

Se tomaron 290 muestras de pacientes femeninos que acudían a consulta externa al Hospital del ISSSTE de esta ciudad, en tubos de 13 x 100 que contenían 2 ml de solución salina estéril al 0.85% y un hisopo estéril (para la toma de muestra). Una vez que cada muestra fue tomada y rotulada, se transportó al CIEP de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, donde se procedió a realizar un estudio en fresco con azul de algodón lactofenol y una siembra por duplicado de las mismas muestras en tubos de agar inclinado conteniendo ASD para la identificación de las muestras positivas para levaduras. Los cultivos en los que no hubo crecimiento levaduriforme (identificación al microscopio) se descartaron como muestras negativas para levaduras.

PRUEBA DEL TUBO GERMINAL (FILAMENTACION EN SUERO)

Para esta prueba, se utilizó suero humano de cualquier individuo sano como agente inductor, colocando 0.5 ml. en un tubo de ensaye para cada muestra, inmediatamente se añaden 1 000 000 levaduras/ml (las cuales se cuantificaron en una cámara de Neubauer con diluciones apropiadas) para un volumen final de 0.5 ml. y se incuban en una baño serológico de 37° C durante 2-3- hrs., posteriormente, se toma una gota de la suspensión y se coloca sobre un portaobjetos observándose al microscopio para comprobar la formación de tubos germinales. Se utilizó un control positivo de Candida albicans para la formación del tubo germinal, y un control negativo de la misma levadura sin la adición de suero:

CULTIVO EN AGAR HARINA DE MAIZ (PARA LA PRODUCCION DE CLAMISDOSPORAS).

Para este medio se realiza una siembra por estria de las muestras a analizar en cajas de Petri, agregando sobre la superficie sembrada una gota de Tween 80 (agente tensoactivo) al 0.02% con el fin de reducir la tensión superficial, induciendo a las levaduras a la formación de clamidoconidios; posteriormente se coloca un cubreobjetos, y se incuba en la estufa bacteriológica a 25° C durante 72 hrs., observando al microscopio la

formación de los clamidoconidios. Se utilizó un control positivo de C. albicans y un control negativo de C. tropicalis.

PRUEBAS BIOQUIMICAS.

PRUEBA DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

Principio.- La fermentación que realizan las levaduras se detecta en un medio de cultivo adecuado que contiene un carbohidrato como sustrato único, mediante la producción de gas, en tanto que la producción de ácido no indica fermentación. Para su realización, se utilizan tubos Wickerham y tubos de Durham, estos últimos se colocan en forma invertida dentro de los tubos de Wickerham para posteriormente agregar a cada uno 4 ml de medio de Wickerham con indicador rojo de bromocresol, después se añade a 1 ml. de cada carbohidrato (glucosa, maltosa, galactosa, sacarosa y lactosa) utilizar en diferentes tubos de prueba con sus respectivos controles positivos y negativos.

Posteriormente, se añade a cada tubo empleado para la fermentación de los diferentes carbohidratos, 3 000 000 levaduras/ml, y se incuban a 37° C durante 48 hrs. y finalmente se lee la producción de ácido por el cambio de color del indicador en el medio de cultivo y la producción de gas por la eliminación del líquido de los tubos de Durham, en comparación con los controles. (Foto No. 3).

PRUEBA DE ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS.

Principio.- El crecimiento que llevan a cabo las levaduras con un carbohidrato diferente como única fuente de carbono, se observa por la turbidez o la formación de un precipitado después de centrifugar a 3 000 rpm. durante 5 min. Para esto, se utilizan los mismos tubos de Wickerman sin tubos de Durham ni indicador de pH en las mismas condiciones mencionadas para la fermentación de carbohidratos.

NOTA 1:

Para la determinación de las diferentes especies de Candida en las muestras de levadura estudiadas, se tomó como base el cuadro descrito en la tabla No. 1.

NOTA. 2:

Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon Optiphot-2 Type 104 con un aumento de 40x, localizado físicamente en el laboratorio de Inmunología Celular y Molecular del CIEP/FCQ/UASLP.

Tabla No. 1.- CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE Candida. (*)

	MUCILLO O PSEUDOMICELIO		CLAMIDOSPORAS		FILAMENTACION EN SUERO, 37° C, 4 h.		AUXONOGRAMA						ZIMOGRAMA				OTROS CARACTERES							
					GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	GALACTOSA	LACTOSA	RAFINOSA	INOSITOL	CELOBIOSA	XILOSA	TREHALOSA	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	GALACTOSA	LACTOSA	RAFINOSA	UREASA	RED. TETRAZOLIO	RES. ACCIONE (CRECIMIENTO)	UTILIZACION DE KNOS
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	B	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	R	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	-	-	-	V	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	R	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	B	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	V	-	-	+	+	+	+	+	+	-	R	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	R	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	+	+	+	+	V	-	-	-	-	+	+	V	-	-	-	-	-	-	R	-	-

+ = positivo, - = negativo +- casi siempre es positivo; V = a variable; B = a blanco; R = a rosado; Vi = a violeta; Red. = a reducción; Res = a resistencia a.

(*) TOMADO DE : ARENAS, R. MICOLOGIA MEDICA ILUSTRADA ED INTERAMERICANA pp 231

RESULTADOS

Para la identificación de las diferentes especies de Candida se procedió de la siguiente forma:

Crecimiento de levaduras en ASD. La producción de tubo germinal en suero humano normal (Foto No. 1).

La producción de clamidosporas en Medio de *Agar Harina de Maíz* (Foto No. 2).

Pruebas Bioquímicas de Fermentación y asimilación de carbohidratos (Foto No. 3)

Se analizarón un total de 290 muestras de exudados vaginales de pacientes femeninos que acudían a consulta externa al Hospital del ISSSTE de esta ciudad, de las cuales 87 fueron positivas para levaduras (30%) Fig. No. 1, Tabla No. 2), obteniendo una mayor proporción de C.albicans (7.24%) seguida de C.rugosa (5.51%) y otras especies en proporciones más bajas (Tabla No. 3, Fig. No. 2).

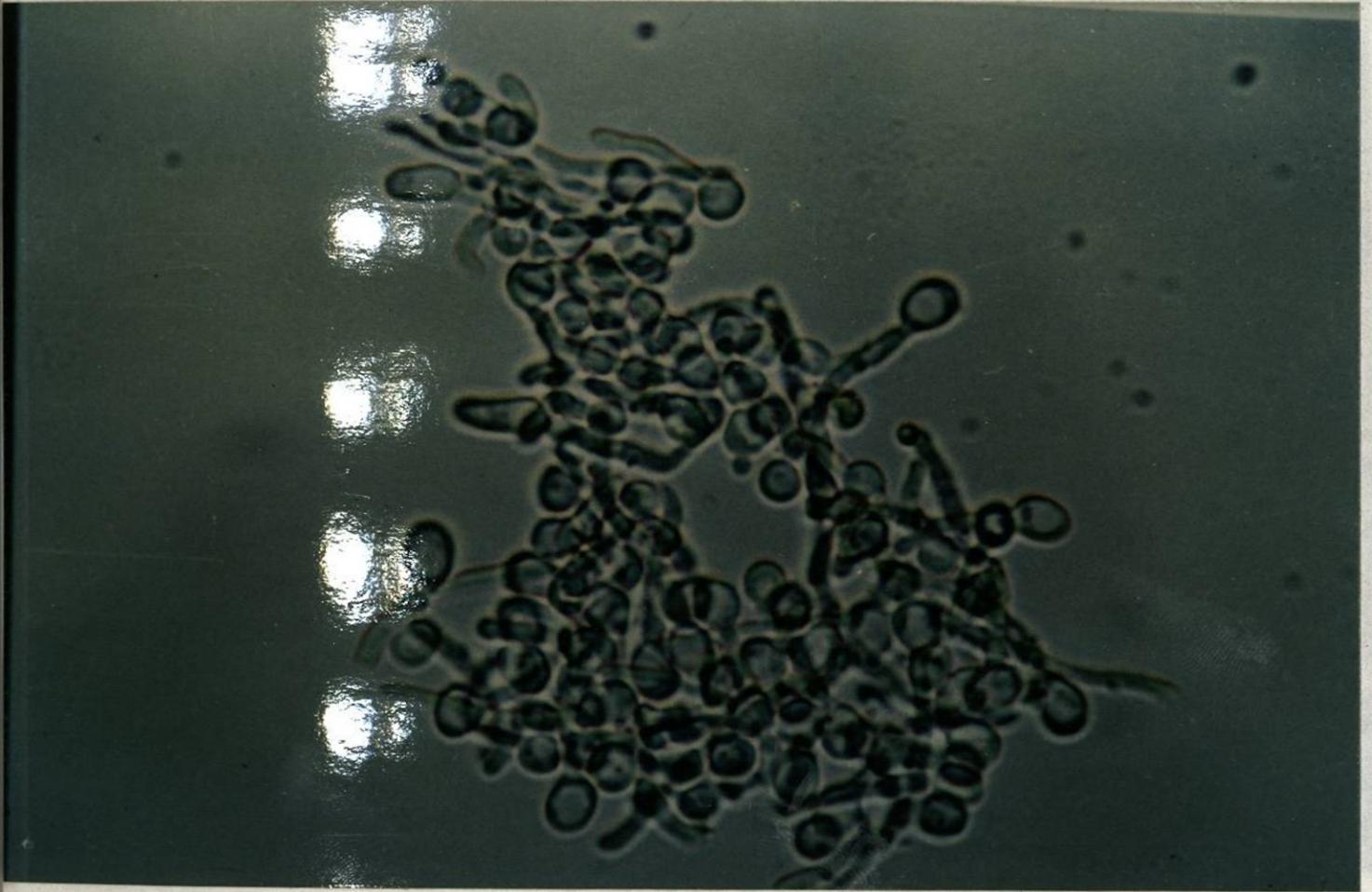


Foto No. 1 .- FILAMENTACION EN SUERO DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS (3 hrs. A 37° C EN SOLUCION SALINA ESTERIL. (Microscopio Nikon Optiphot-2 Type 104. Aumento 40 x).

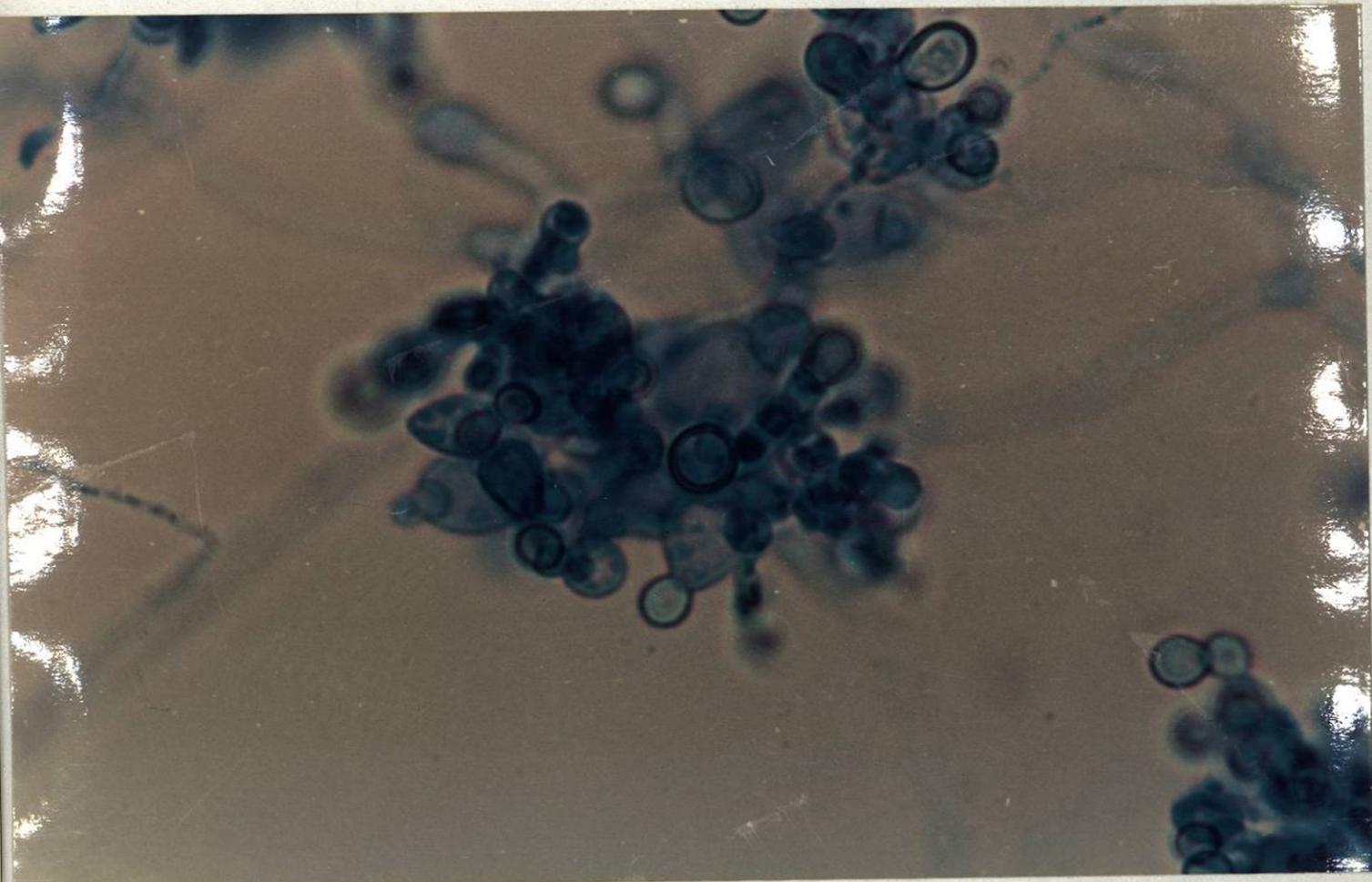


Foto No. 2.- PRODUCCION DE CLAMIDOSPORAS POR Candida albicans
72 hrs. a 28° C EN AGAR DE HARINA DE MAIZ-TWEEN 80. (Microscopio
Nikon Optiphot-2 Type 104. Aumento 40 x).

SIN TUBO DE DURHAM E INDICADOR

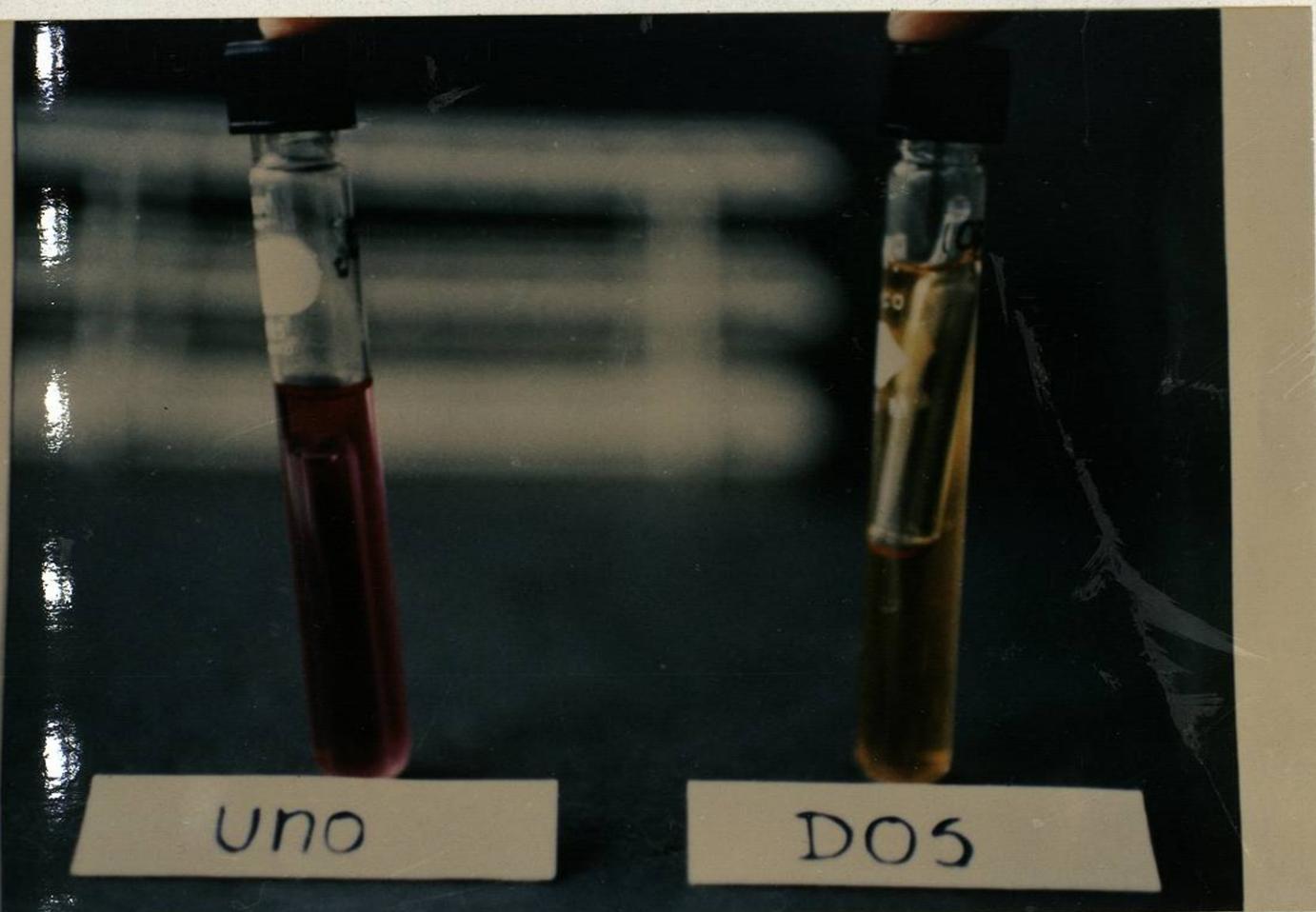
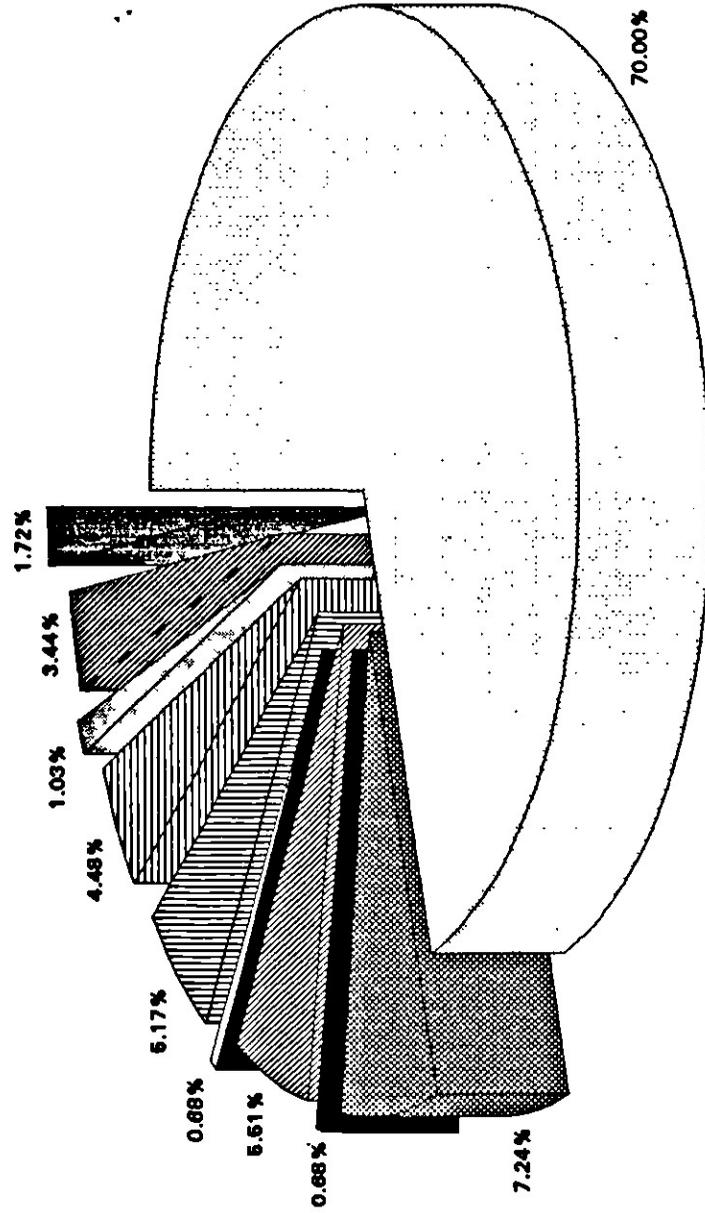


Foto No. 3.- FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS POR LAS DIFERENTES ESPECIES DE Candida (72 hrs. a 37° C EN MEDIO DE WICKERHAM CON Y SIN TUBO DE DURHAM E INDICADOR).

GRAFICA No. 1.- PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN BASE A 290 MUESTRAS).

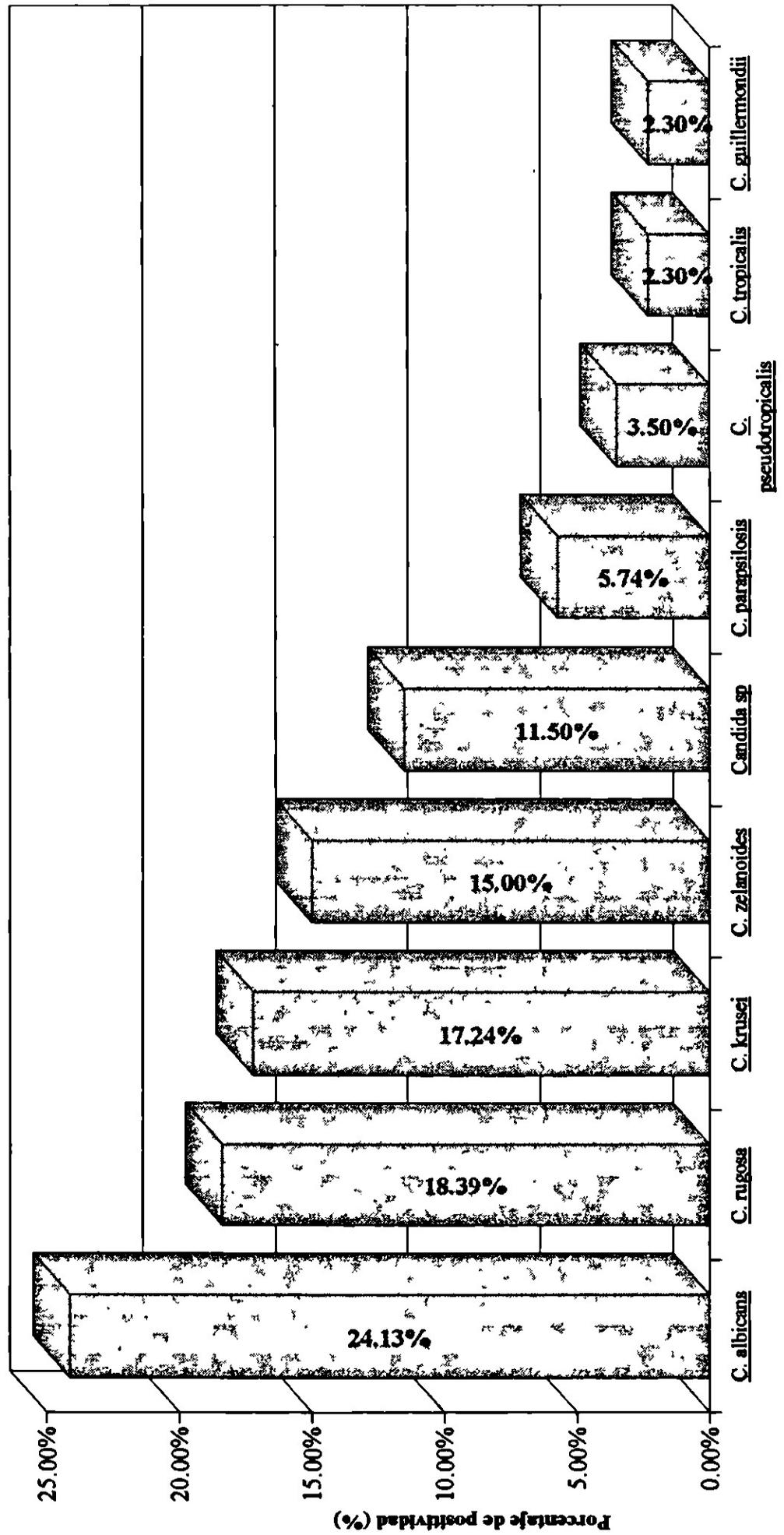
GRAFICA No. 1.- PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN BASE A 290 MUESTRAS).

Grafica No. 1.- PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS



GRAFICA No. 2 .- FRECUENCIA DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE Candida EN LAS MUESTRAS POSITIVAS. (EN BASE A 87 MUESTRAS POSITIVAS).

Gráfica No. 2.- PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE Candida EN LAS MUESTRAS POSITIVAS



Especie de Candida

Tabla No. 2 .- LEVADURAS ENCONTRADAS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

ESPECIE	No. DE MUESTRA	PORCENTAJE(*) (%)
NEGATIVAS	203	70
<u>C. albicans</u>	21	7.24
<u>C. rugosa</u>	16	5.51
<u>C. Krusei</u>	15	5.17
<u>C. zalanoides</u>	13	4.48
<u>Candida sp</u>	10	3.44
<u>C. parapsilosis</u>	5	1.72
<u>C. pseudotropicalis</u>	3	1.03
<u>C. tropicalis</u>	2	0.68
<u>C. guillermondii</u>	2	0.68

(*) En base a 290 muestras analizadas.

Tabla No. 3 .- PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE Candida EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

ESPECIE	No. DE MUESTRA	PORCENTAJE (*) (%)
<u>C. albicans</u>	21	24.13
<u>C. rugosa</u>	16	18.39
<u>C. Krusei</u>	15	17.24
<u>C. zalanoides</u>	13	15.0
<u>Candida sp</u>	10	11.5
<u>C. parapsilosis</u>	5	5.74
<u>C. pseudotropicalis</u>	3	3.5
<u>C. tropicalis</u>	2	2.3
<u>C. quillermondii</u>	2	2.3

(*) En base a 87 muestras positivas.

DISCUSION

Las levaduras de importancia médica son todas aquellas especies de hongos con hábitos de crecimiento especialmente unicelular, capaces de producir enfermedad tanto en el hombre como en animales. De las 361 especies y 39 géneros descritos en la literatura (Rippon, 1990; Ellis, 1994), aproximadamente 24 de ellas son consideradas patógenas (Rippon, 1990), destacando las del género Candida, que están relacionadas con procesos patológicos en el hombre conocidos como Candidosis (Bonifaz, 1990; Arenas, 1994; Koneman cols., 1987; Herrera y Ulloa 1990; Torres Rodríguez, 1987; Ellis, 1994). Algunas de las especies de Candida pueden ser los agentes etiológicos, siendo más común la C. albicans y raramente C. tropicalis, C. Krusei, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. pseudotropicalis, C. kefyr) y C. (Torulopsis) glabrata. Todas son ubicuas y se encuentran normalmente en humanos, especialmente C. albicans, la cual está reconocida como comensal del tracto gastrointestinal (Ellis, 1994; Rippon, 1990).

Por otra parte y aunque existen extensas e innumerables investigaciones sobre casi la totalidad de las especies de Candida, también es verdad que dentro de todo los estudios efectuados, existen muy pocos trabajos acerca de la incidencia de Candida en exudados vaginales, y mucho menos en nuestra comunidad.

Los resultados encontrados en este trabajo (30% de frecuencia de nuestras positivas para levaduras) coinciden con lo reportado en la literatura. Bonifaz (1990) reporta frecuencias de un 5% a un 30% en una población de pacientes del Hospital General de México, Hilton y Warnock, 28% , Schnell, un 29.7%. Siendo todos estos reportes en la población femenina en edad reproductiva (20-34 años) de los Estados Unidos para el mismo tipo de muestras, y por Gough y cols. , 31.3% en una población de pacientes de Londres, Inglaterra.

Con respecto a las diferentes especies de Candida encontradas en este trabajo, son similares a lo reportado en la literatura , pues se reportan frecuencias de C. albicans entre 5% y 10% en exudados vaginales de

mujeres no embarazadas (Bonifaz, 1990; Arenas, 1994; Rippon, 1990; Torres Rodríguez, 1987; Herrera y Ulloa, 1990; Ellis, 1994; Koneman y cols. 1987), mientras que para las demás especies encontradas, la frecuencia es menor que la reportada para C. albicans, aunque varía en los diferentes estudios realizados por ejemplo, en este trabajo se encuentra una frecuencia de 5.74% para C. parapsilosis y de 2.3% para C. tropicalis, mientras que Neely y Cols. ,(1988) reportan 11% y 18% respectivamente para estas mismas especies en aislados pediátricos en Cincinnati, USA. Además, aquí se reporta una frecuencia de 2.3% de C. guillermondi, mientras que Ellis, (1994) reporta aislamientos principalmente de piel, pero no indica la frecuencia encontrada, Arenas (1983) reporta de 3-6% de C. krusei en la cavidad bucal humana, mientras que en este trabajo se encontró un 17.24%.

Finalmente, para las demás especies de Candida en General, se reportan enfermedades de diferente etiología en humanos, pero no se indican las frecuencias, por ejemplo: Di Silverio y Cols. , (1991) reportan 12.5% de Candida sp en pacientes con SIDA, Rippon (1990) encuentra infecciones en uñas por C. parapsilosis y en pulmón por C. pseudotropicalis.

Cabe mencionar, que en la mayoría de los Laboratorios de Análisis Clínicos, cuando una muestra es positiva para levaduras, se reporta únicamente como Candida sp, por lo que este trabajo es importante para determinar la epidemiología de las diferentes especies de Candida en nuestro Estado, y esperamos que sirva de base para una mejor identificación de las mismas, y por lo tanto para un mejor tratamiento así como su curación.

CONCLUSIONES

- 1.- En las muestras analizadas se encontró una frecuencia de positividad de 30% de todas las especies de Candida.
- 2.- La flora normal de la vagina de las mujeres normales relativamente variada, pues se encontraron 9 especies diferentes de Candida.
- 3.- La especie más frecuentemente encontrada fue C.albicans, (7.24%), seguida de C. rugosa (5.51%), C. krusei (5.17%) y otras especies en proporciones más bajas, coincidiendo estos datos con lo reportado en la literatura.

BIBLIOGRAFIA

- Arenas, R. 1993. *Micología Médica Ilustrada*, Nueva Editorial Interamericana.
- Bonifaz, A. 1990. *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez Cervantes, México, D.F.
- Casas Rincón, G. 1967. Estudio de 500 cepas de levaduras aisladas de diverso material humano. *Rev. Mex. de Dermatología*. Vol. II. pp 120-121.
- Di Silverio, A., Brazzelli, V., Brandozzi, G., Barbarani, G., Maccabruni, A. and Sacchi, S. 1991. Prevalence of Dermatophytes and yeasts (Candida spp, Malassezia furfur) in HIV patients. *Mycopathologia*, Vol. 114, pp 103-107.
- Diddle, A. 1969. Oral contraceptive medications and vulvovaginal candidiasis. *Obstet. Gynecol.*. Vol.34 pp 373-377.
- Ellis, D.H. 1994. *Clinical Mycology. The human opportunistic mycoses*. Pfizer, Inc.
- Feo, M. 1981. Supervivencia y desinfección de C. albicans en el cepillo de dientes. *Mycopathologia*. Vol. 74 pp 129-134.
- Ghannoum, M.A. and Abu-Elteen, K.H. 1990. Pathogenicity determinants of Candida. *Mycoses*. Vol. 33, No. 6 pp 265-282.
- Glodaere, M.J. 1979. Vaginal microbial flora in normal young women. *J. Brit. Med.* Vol. 1. pp 1450-1453.
- Gough, P.M. 1985. Candidosis of the genital tract in non pregnant women. *europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.* Vol. 19. pp 237-246.
- Greenfield, R.A. 1992. Host defense system interactions with Candida. *J. of Medical and Veterinary Mycology*. Vol. 30 pp. 89-104.
- Herrera T. y Ulloa, M. 1990. *El reino de los hongos. Micología Básica y Aplicada*. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Hilton, A.L. and Warnock, D.W. 1975. Vaginal candidiasis and the role of the digestive tract as a source of infection. *Brit. J. Obstet. Gynec.* Vol. 82. pp 922-926.
- Holmes, a. R. 1988. Nutritional factors determine germ tube formation in Candida albicans. *Sabouradia*. Vol. 26 pp. 127-131.

- Kam, L.A. 1978. Congenital cutaneous candidiasis. Am. J. Dis. Child. Vol. 129. pp 1215-1218.
- Koneman, E.W., Allen, S.D. Dowell, V.R. y Sommers, H.M. 1983. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. Ed. Médica Panamericana Buenos Aires, Argentina.
- Koneman, E.W. y Roberts, G.D. 1987, Micología Práctica de Laboratorio. 3a. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Lennete , E.H. Balows, A. Hausler, W. J. y Shadomy, H. J. 1987. Manual de Microbiología Clínica. 4a. Ed. Médica Panamericana, Buenos aires, Argentina.
- Macias, I., Martínez V., Moctezuma, M. G. y Acosta, I. 1994. Effect of different amnioacids on the dimorphism of *Candida albicans*. Abstracts of XII Congress of the International Society for Human and Animal Mycoology. pp P0622-D144.
- Moctezuma Zárate, M. G. y Acosta Rodríguez, I. 1990. prevalencia de *Candida albicans* en pacientes del Hospital Central " Dr. Ignacio Morones Prieto" correlación con la edad y el sexo. Memorias del Primer Foro de Investigación Universitaria. Editorial Universitaria Potosina. UASLP. pp 23.
- Monif, G. 1983. Clasification and pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. Am. J. Obstet. Gynecol. Vol. 125. pp 935-939.
- Neely, A., Odds, F., Basatia, B. and Holder, I.A.1988. Characterization of *Candida* isolates from pedriatric Burn patients. J. of Clinical Microbiology. Vol.26. pp 1645-1649.
- Odds, F.C. 1982. Genital Candidosis. Clin. Exp. Dermatol. Vol. 7. pp345-350.
- Rippon, J.W.1990.Tratado de micología Médica.3a.ed. Ed.Interamericana.Mc.-Graw Hill.
- Rojas Pedral, M.M. y Guerrero Díaz, J.1992. Presencia de levaduras en pacientes con infección vaginal rebelde atratamiento. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Microbiología.pp W-16.
- Torres Rodríguez,J.M.1987. Micosis que afectan la piel y mucosas. Ed. Doyma.Barcelona, España.
- Ulloa, M. y Hanlin, R. 1985. Atlas de Micología Básica. Ed. Concepto.Mexico, D.F