

40
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**



EVALUACION DE LA TECNICA DE FORMACION DE
TUBO GERMINATIVO DE Candida albicans y Candida
stellatoidea EN SUERO HUMANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
CONCEPCION ROBERTO ROJAS HERRERA



MEXICO, D. F.

AGOSTO 1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION.....	1
FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
OBJETIVOS.....	20
HIPOTESIS.....	20
MATERIAL Y METODO.....	21
RESULTADOS.....	27
DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	48
CONCLUSIONES.....	55
ANEXOS.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	63

INTRODUCCION:

El género Candida está clasificado en la subclase formal Blastomycetidae:le vaduras imperfectas, de la clase formal Deuteromycetes, subdivisión Deuteromycotina. Esta clasificación se basa en la recomendada por Alexopoulos y - Mims (1979) y es muy semejante a la sugerida por Ainsworth y colaboradores (1973). La clasificación de Candida dentro del grupo de los hongos es como sigue:

Reino Protisto

Myceteae (Hongos)

División Amastigomycota

Subdivisión Deuteromycotina

Clase formal Deuteromycetes

Subclase formal Blastomycetidae:

Levaduras imperfectas.

Géneros representativos:

Candida y Cryptococcus

(5, 6)

Candida es un género heterogéneo, actualmente clasificado dentro de la familia Cryptococcaceae, hongos imperfectos (Deuteromycetes). Las especies de Candida están frecuentemente presentes como miembros de la flora normal de la boca, garganta, intestino grueso, vagina y piel. Durante el nacimiento, o poco después, todos los humanos son colonizados por diferentes especies de Candida. (25,34).

En pacientes inmunocomprometidos por enfermedad o por efectos secundarios de las drogas usadas para tratar sus enfermedades, estos microorganismos -- pueden invadir los tejidos más profundos produciendo severas infecciones poniendo su vida en peligro. La candidiasis es una infección causada por diversas especies de Candida. La candidiasis es la micosis sistémica más co--

mún y es de incidencia mundial. (25, 34).

Cuadro No. 1. Factores que predisponen a infecciones por Candida.

Fisiológicos:

Embarazo
Vejez o infancia.

Traumáticos:

Maceración
Otra infección.

Hematológicos:

Inmunodeficiencia celular
Anemia aplásica
Agranulocitosis
Linfoma, enfermedad de Hodgkin, leucemia
Hipogammaglobulinemia y agammaglobulinemia.

Endocrinos:

Diabetes mellitus
Hipoparatiroidismo
Enfermedad de Addison.

Iatrogénicos:

Inmunosupresión
Trasplante
Posoperatorio
Tratamiento con esteroides
Antibióticos
Píldoras anticonceptivas
Cateterismo
Vacunación
Hiperalimentación.

Varios:

Estado maligno
Desnutrición
Malabsorción
Tíoma
Herencia
Drogadicción

Candida albicans es la principal especie patógena, que causa infecciones superficiales leves, severas o crónicas de piel, uñas y mucosas en individuos aparentemente sanos, así como serias infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. C. tropicalis, C. parapsilosis y C. guilliermondii se han convertido en causas importantes de endocarditis, pielonefritis, artritis y candidiasis diseminada en pacientes con catéteres intravenosos, sometidos a cirugía cardiovascular y drogadictos (cuadro No. 1). A C. albicans le sigue C. tropicalis en cuanto a potencial patógeno (cuadro No. 2). (25, 34) .

Cuadro No. 2. Especies de Candida ordenadas de acuerdo a su importancia patógena.

- C. albicans
- C. tropicalis
- C. guilliermondii
- C. parapsilosis
- C. stellatoidea
- C. pseudotropicalis
- C. krusei
- C. rugosa
- C. glabrata

El cuadro No. 1 indica los cambios orgánicos en el individuo que permiten la rápida proliferación de especies de Candida. Sin embargo, el factor predisponente más común sigue siendo el uso de antibióticos de amplio espectro, como tetraciclina, o combinaciones de drogas que disminuyen la flora normal y permiten la proliferación de Candida. (11).

El cuadro No. 2 muestra la secuencia patogénica de las especies de Candida que se han hallado involucradas en cuadros clínicos. La patogenicidad de -- C. stellatoidea fue demostrada por Hurley (1965) en animales de laboratorio y concluyó que, debido al aumento de la prevalencia de C. stellatoidea en humanos en aquel entonces, también era patógena para el hombre. (15)

El cuadro No. 3 muestra la clasificación de las manifestaciones clínicas de las infecciones por Candida, según Rippon (1974). (28)

Por lo común, el diagnóstico de las infecciones por Candida es muy difícil. La dificultad surge del hecho de que este microorganismo es, con mucha frecuencia, un invasor secundario en personas que tienen otra enfermedad, de modo que los tejidos enfermos presentan una flora microbiana mixta. Es muy difícil, incluso si se logra aislar e identificar a Candida, determinar el papel exacto representado por estos agentes etiológicos en la enfermedad del paciente. (38).

Cuadro No. 3. Manifestaciones clínicas de las infecciones por Candida.

I. Enfermedades infecciosas.

A. Afección mucocutánea.

1. Bucales: glositis, estomatitis, queilitis, boqueras.
2. Vaginitis y balanitis.
3. Infecciones bronquiales y pulmonares.
4. Digestivas: esofagitis, trastornos entéricos y perianales.
5. Candidiasis mucocutánea crónica.

B. Afección cutánea.

1. Candidiasis intertriginosa y generalizada.
2. Paroniquia y onicomicosis.
3. Enfermedad del área del pañal.
4. Granuloma por candidiasis.

C. Afección generalizada.

1. Aparato urinario.
2. Endocarditis.
3. Meningitis.
4. Septicemia.
5. Candidemia iatrógena.

II. Enfermedades alérgicas.

A. Cándides.

B. Eccema.

C. Asma.

D. Gastritis.

El aislamiento repetido de diferentes especies de levaduras de múltiples muestras del mismo paciente seguramente indica colonización y frecuentemente puede indicar infección local o sistémica. En este caso, debe consultarse al médico sobre los siguientes pasos a seguir, ya que la identificación completa del o los agentes etiológicos puede ser importante para tomar una decisión terapéutica. Si un médico piensa que un paciente inmunocomprometido tiene evidencias de una neumonía primaria producida por una levadura o un microorganismo levaduriforme, debe intentarse una identificación completa. Otras situaciones importantes que justifican una identificación completa de levaduras incluye su recuperación de líquidos normalmente estériles como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, abdominal o torácico. Si se recuperan levaduras simultáneamente de más de un líquido corporal, debe identificarse totalmente cada aislado. Si los aislamientos son de la misma especie, puede sospecharse de una infección diseminada. (17,38).

El tubo germinativo es la forma morfológica inicial observada durante la transición levadura/micelio de C. albicans y C. stellatoidea. Son cortos filamentos hifales laterales de las células individuales levaduriformes. Los tubos germinativos no tienen constricción en la base de origen de la célula madre. Al inicio de su formación miden aproximadamente 1/3 de largo y 1/5 - 1/6 de ancho del diámetro de la célula madre. (13, 25, 33, 34, 30).

La formación de tubo germinativo comienza con cambios considerables en la pared celular de la célula madre. La pared del tubo germinativo está compuesta por cuatro de cinco capas que componen la pared de la célula madre. Durante el desarrollo, la célula madre contiene una mancha brillante que crece conforme el tubo germinativo se desarrolla. Estas manchas brillantes también se observan en los tubos germinativos y en las ramificaciones. Estas zonas brillantes se han interpretado como sitios donde la hifa o célula madre contienen más citoplasma y están extensamente vacuoladas. (10, 31).

Un modelo para la formación del tubo germinativo es el siguiente: Inicialmente las células contienen solo pequeñas vacuolas. El núcleo migra hacia lo

que es el inicio del tubo germinativo y se divide en dos, uno regresa a la célula madre y otro migra hacia la extensión del tubo germinativo. La célula madre vuelve a vacuolarse y el protoplasma se mueve dentro del tubo germinativo continuando la migración hacia el ápice dejando detrás zonas vacuoladas pero con núcleo en los compartimentos intercalares de la hifa. (10).

El dimorfismo es la interconversión ambientalmente controlada de fases morfológicas de los hongos. Así, algunas especies de hongos son dimórficas, capaces de crecer con más de una forma en diferentes condiciones ambientales. - Por ejemplo, algunos de los hongos patógenos crecen como levaduras a 37°C y como mohos (micelio) a 25°C. (6,25).

El crecimiento como levadura es el crecimiento unicelular de los hongos, cuya morfología es esférica o elipsoide de 3 a 15 μm de diámetro. Muchas levaduras se reproducen por brotación, aunque algunas presentan fisión binaria.- Las levaduras producen colonias en medios sólidos, que son pastosas o cremosas, opacas y generalmente miden de 0.5 a 3.0 mm de diámetro. (6, 25).

La hifa es el crecimiento multicelular de los hongos, cuya morfología es de largos filamentos en forma de tubos cilíndricos ramificados con diámetro de 2 a 10 μm . Algunas hifas están divididas en células por tabiques que se forman típicamente con intervalos regulares durante el crecimiento filamentososo. Otros mohos están compuestos por hifas no tabicadas. El micelio es la masa de hifas entrelazadas que se acumula durante el crecimiento activo del moho. La parte del micelio que penetra en el sustrato y absorbe sus nutrientes se llama micelio vegetativo o de sustrato. El micelio aéreo es el que se proyecta por encima de la superficie hacia el aire y habitualmente posee las estructuras reproductoras del hongo. (5, 6, 25).

Las blastosporas son esporas asexuales (talosporas), forma de reproducción de los hongos imperfectos, que se forman por el proceso de gemación a partir de las células del micelio. Las blastosporas, o yemas de la gemación, pueden permanecer adheridas a la célula madre y seguir formando yemas, produciendo

así racimos ramificados de blastosporas o blastoconidios. (5,6, 25).

Las especies de Candida producen levaduras elipsoidales o esféricas, con brotes (yemas), de 3 a 6 μm de diámetro y se reproducen asexualmente por yemas o fisión de yemas. Las yemas (blastoconidios) pueden permanecer adheridas a la célula madre y formar los racimos ramificados de blastoconidios. - Los blastoconidios individuales que siguen adheridos a sus vecinos en cadena pueden alargarse para producir filamentos llamados pseudohifas. En un examen más detenido de estos filamentos, se ve que no tienen igual diámetro en toda su longitud, si no que presentan constricciones en los puntos de tabicación, las cuales ponen en evidencia que los filamentos se hallan compuestos de células no desprendidas, alargadas y en gemación. El micelio resultante de la acumulación de pseudohifas se conoce como pseudomicelio. (5, 25,- 34).

C. albicans es capaz de producir hifas verdaderas de ancho uniforme que crecen por elongación apical y forman tabiques en ángulos rectos con poros revestidos con membrana. Las verdaderas hifas tabicadas resultan de la germinación de "células de transición": blastoconidias redondeadas o aplanadas, o clamidosporas. Las clamidosporas son esporas inactivas redondas, grandes y de pared gruesa, que resultan de las células terminales de las pseudohifas. Las clamidosporas propician la resistencia del hongo en condiciones ambientales desfavorables, y cuando dichas condiciones mejoran, germinan por uno o más tubos germinales y producen un nuevo crecimiento. (25, 34).

De esta manera, C. albicans es capaz de producir levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas. Como parte de la flora normal, el microorganismo crece como una levadura con brotes; las hifas se producen sólo durante la invasión de tejidos. Aunque se conoce un cierto número de estímulos ambientales que desencadenan o bloquean la conversión in vitro de levaduras a hifas, no se conoce con certeza la regulación de la morfogénesis de C. albicans. Un estímulo incuestionable es el suero normal. Luego de 90 minutos en suero a 37°C, C. albicans comienza a formar hifas. Esta reacción se manifiesta por la apari

ción de un tubo germinal: un apéndice elongado que crece hacia afuera, y tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble del largo de la célula levaduriforme. El tubo germinal no tiene constricción en su punto de origen. -- Los tubos germinales se diferencian de las pseudohifas por la falta de esta constricción y son formados sólo por C.albicans y C.stellatoidea. (13, 25, - 34).

Taschdjian y colaboradores (1960) observaron que las esporas de C. albicans producen cortos tubos germinativos en suero humano de 37°C a 41°C en 90 minutos. El suero humano empleado para esta observación fue suero mezclado (pool) o individual, suero hemolizado o no hemolizado, suero fresco o inactivado, - así como en material almacenado a muy bajas temperaturas. De otras especies de Candida, sólo C.stellatoidea, cuyo estado de especie se consideraba dudoso, formó los cortos tubos germinativos. (36).

La tabla No. 1 contiene un breve resumen histórico de las investigaciones - realizadas acerca de la formación de tubo germinativo en suero humano, así como las posibles diferenciaciones entre C.albicans y C. stellatoidea. También contiene las investigaciones, más recientes, realizadas en medios más - simples o inductores químicos.

Tabla No. 1. Investigaciones de la formación del tubo germinativo de <u>Candida albicans</u> y <u>Candida stellatoidea</u> .	
Reynolds y Brande (1956).	Rápida formación de tubo germinativo de <u>C. albicans</u> en suero incubado a 37° C. (16).
Hill y Gebhard (1956).	Formación de micelio de <u>C. albicans</u> y <u>C. stellatoidea</u> en una hora in vivo, en animales de laboratorio. (16)
Taschdjian y col. (1960).	<u>C. albicans</u> y <u>C. stellatoidea</u> forman tubos germinativos en suero humano en 90 minutos a 37 - 41°C. (36).
Mackenzie (1962).	La cantidad de levaduras formando micelio es inversamente proporcional a la concentración celular incubada. (21).
Buckley y col. (1963).	La albumina de huevo puede sustituir al suero o plasma para la formación de tubo germinativo. (16).
Kaminsky y Quinlan (1963).	<u>C. albicans</u> y <u>C. stellatoidea</u> forman coágulo en plasma después de incubar 12-24 hrs. a 37°C. (16).
Andleigh (1964).	Diferenciación entre <u>C. albicans</u> y <u>C. stellatoidea</u> posible sólo por métodos bioquímicos. (16).
Landau y col. (1964).	Mayor producción de tubos germinativos en suero cuando se alcanza el 100% de saturación de la transferrina, y aún más diluyéndolo en agua destilada. (19).
Landau y col. (1965).	Propiedad del suero para la germinación caracterizada como estable al calor, independiente del complemento y la properdina, no removible por diálisis y no relacionada a aglutininas y precipitinas contra <u>C. albicans</u> . (18).

Tabla No. 1. Continuación.	
Kamaya (1968).	Bajo condiciones extremas de pobreza de nutrientes, <u>C. stellatoidea</u> produce filamentos largos y delgados mientras <u>C. albicans</u> permanece en la fase de levadura. (16).
Richard y col. (1968).	En suero humano normal ocurre agrupamiento (clumping) de levaduras y micelio de <u>C. albicans</u> . (4).
Mardon y col. (1969).	Una variante bioquímica de <u>C. albicans</u> , que no forma tubo germinativo, forma pseudohifas en un medio definido con una atmósfera de CO ₂ : O ₂ en relación 2:1. (22).
Mardon y col. (1971).	En un medio definido, la fuente de nitrógeno es importante para la germinación, y <u>C. stellatoidea</u> produce menos tubos germinativos que <u>C. albicans</u> . (23).
Barlow y col. (1971).	La concentración en el suero, de urea, proteínas, colesterol, calcio, hierro, fósforo, aminoácidos, hormonas esteroideas, escualeno y mucopolisacáridos no afectan la germinación; ésta se ve aumentada con concentraciones de glucosa mayores o iguales a 150 mg/dl. (2).
Evans y col. (1975).	En un medio definido, 10 ⁴ -10 ⁶ células/ml, 0.2-2.0% de glucosa, pH 7.4 y 40°C son las condiciones óptimas para la mayor producción de filamento de <u>C. albicans</u> . (8).
Auger y Joly (1977).	En un medio definido, la germinación aumenta en pH neutro; se inhibe con 10 ⁸ células por ml de <u>E. coli</u> y otras bacterias a menores concentraciones. (1)
Mattia y Cassone (1979).	Relación entre la fase estacionaria de crecimiento de <u>C. albicans</u> y la inducibilidad para formar tubo germinativo. En inductores químicos la fase exponencial da menor grado de germinación. (24).

Tabla No. 1. Continuación.	
Hazen y Cutler (1979).	Evidencia de que <u>C. albicans</u> produce un factor - bioquímico capaz de regular su germinación, este factor también es producido por <u>C. tropicalis</u> - (12).
Shepherd y col. (1980).	La concentración de DNA permanece constante durante la formación de tubo germinativo, pero después de la formación el DNA se incrementa considerablemente. La concentración de RNA si aumenta durante la formación del tubo germinativo. (33).
Hedden y Buck (1980).	Los verdaderos tubos germinativos, a diferencia de lo que es el inicio de una pseudohifa, no tienen constricción en su punto de origen en la célula madre. (13).
Buffo y col. (1984).	En un medio definido, pH de 6.5 a 7.5 y temperatura de 37 - 40°C facilitan el crecimiento micelial de <u>C. albicans</u> . El cambio de una de estas - variables, evita este crecimiento. (3).
Saéz y Traore (1984).	Estudio de la morfogénesis de <u>C. albicans</u> en suero humano durante 24 horas a 37°C. Los tubos -- germinativos aparecen desde la primera hora de - incubación. (30).
Walker y col. (1984).	En dos medios definidos, el Mg^{+2} juega un papel central en la regulación del dimorfismo de <u>C. - albicans</u> . (37).
Sevilla y Odds. (1986).	Estudio de la morfogénesis de <u>C. albicans</u> en 6 diferentes medios químicamente definidos. Todos los parámetros morfogenéticos están influenciados por las condiciones ambientales de crecimiento. (32).
Pollack y Hashimoto (1987).	En cuatro medios definidos, el tubo germinativo se forma en pH desde 3 hasta 9 cuando no hay -- glucosa en esos medios. Aún con glucosa 1 mM se suprime la formación de tubo germinativo a pH - 3-4. (26).

Tabla No. 1. Continuación.	
Holmes y Shepherd (1988).	En un medio definido, a 37°C se forman 90% de -- tubos germinativos en una hora, cuando las levaduras estuvieron previamente en un período de -- inanición de fuente de carbono, pero no de fuente de nitrógeno. (14).
Pollack y Hashimoto (1988).	El bicarbonato es esencial para que se lleve a -- cabo la germinación a temperaturas subóptimas -- (25-30°C) en inductores químicos. (27).

Poco después de las observaciones de Taschdjian y del establecimiento de su método como ayuda para la identificación de C. albicans y C. stellatoidea, se realizaron varias investigaciones dirigidas a definir el factor, o factores, presente en el suero que permite la germinación de C. albicans. Las tablas 2, 3 y 4 contienen los factores intrínsecos y extrínsecos en el suero que favorecen y no favorecen la formación de tubo germinativo, así como -- aquellos factores que son insignificantes para el proceso de germinación.

Tabla No. 2. Factores que afectan aumentando el % de formación de tubo germinativo en suero.

A. Factores químicos:

1. Adición de 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$ de Fe^{2+} , para conseguir el 100% de saturación de la transferrina (100%ST).
2. Suero con 100%ST.
3. Dilución 1:3 de suero con 100%ST en agua destilada.
4. Concentración de glucosa 150 - 200 mg/dL.
5. Incubación en aereación.*

B. Factores físicos:

1. Concentración de levaduras de 10^4 a 10^6 células/ml.
2. Temperatura de 37°C.
3. Dilución 1:2 del suero en agua destilada.
4. Incubación con 160 rpm de agitación.*

C. Factores de procedimiento:

1. Uso de sueros de pacientes con discrasia sanguínea, o con hemoglobinopatía.
2. Uso de suero de cordón umbilical.

* En suero de caballo.

Tabla No. 3. Factores que afectan insignificamente en el % de formación de tubo germinativo en suero.

A. Factores químicos:

1. La concentración de urea.
2. La concentración de proteínas.
3. La concentración de colesterol.
4. La concentración de calcio, hierro o fósforo.
5. La concentración de aminoácidos.
6. La concentración de hormonas esteroideas.
7. La concentración de escualeno.
8. La concentración de mucopolisacáridos.
9. Concentración de glucosa mayor de 200 mg/dL.
10. La presencia de hemoglobina.
11. Presencia de precipitinas y aglutininas contra C. albicans.
12. Inactivación de la properdina.
13. Inactivación de fracciones C₃ y C₄ del complemento.
14. pH 6.0 - 6.6, 7.8 - 8.4 .

B. Factores físicos:

1. Concentración de levaduras menor de 10^3 células/ml.
2. Diluciones del suero en solución salina hasta 50%v/v.
3. Temperatura 35-36°C, 39-41°C.

C. Factores de procedimiento:

1. Uso de suero mezclado (pool).
2. Uso de suero hemolizado.
3. Uso de suero inactivado.
4. Uso de suero almacenado prolongadamente.
5. Lavado de las levaduras con solución salina antes de inocularlas.
6. Uso de suero que se separó de la sangre total después de un prolongado almacenamiento de ésta.
7. Uso de suero que se sometió a diálisis.
8. Uso de suero de pacientes con candidiasis mucocutánea.
9. Uso de suero de pacientes bajo terapia con antibacterianos, antineoplásicos o corticosteroides.
10. Empleo de inóculo procedente de PDA o infusión cerebro-corazón.

Tabla No. 4. Factores que afectan disminuyendo el % de formación de tubo germinativo en suero.

A. Factores químicos:

1. Suero con transferrina insaturada.
2. Presencia de cisteína (15.7 mg/ml).
3. Concentración de cisteína mayor o igual a 10^{-2} M.*

B. Factores físicos:

1. Concentración del suero en solución salina me nor o igual a 30% v/v.
2. Concentraciones de levaduras mayores de 10^8 - células por ml.
3. Temperatura 32-34°C, 43-45°C.

C. Factores de procedimiento:

1. Uso de sueros de pacientes bajo terapia con anfotericina B y/o nistatina.
2. Uso de inóculos de cepas muy viejas.

* En suero de ternera fetal.

(2, 12, 18, 19, 21)

Debido a que el suero es considerado un medio muy complejo, a mediados de los 70's los investigadores encaminaron sus estudios hacia el empleo de medios sintéticos simples para tratar de elucidar los factores que rigen la morfogénesis de C. albicans. Sin embargo, aún en nuestros días el fenómeno del dimorfismo de C. albicans no está completamente explicado en cuanto a su regulación, a pesar de los ya varios factores hallados que estimulan la morfogénesis (Tabla No. 1). Con una revisión de las Tablas 1, 2, 3 y 4 se puede observar que, a nivel general, el dimorfismo de C. albicans no sólo está regulado por la temperatura y el pH, ni por las condiciones nutricionales que se pueden encontrar en el líquido complejo que es el suero. En la actualidad, continúan las investigaciones para tratar de llegar a una clara y total explicación del fenómeno de la morfogénesis. Por tal motivo, estas investigaciones se realizan en medios simples y con modificaciones ambientales aisladas, para evitar las discusiones y los análisis extensos que resultan de las investigaciones realizadas en suero. Algunos de los medios sintéticos simples, o inductores químicos, que se están empleando son los siguientes: N-Acetil-D-glucosamina, prolina, glucosa-sales-biotina, aminoácidos de Lee + sales, caldo Bacto-peptona 1%, caldo Sabouraud modificado, medios de ensayo con metionina. Al igual que en el suero, en todos estos medios se han hallado varios factores que facilitan o disminuyen el proceso de germinación, así como factores con poca significancia para este proceso. (1, 3, 8, 14, 23, 24, 22, 33, 26, 27).

En el procedimiento de la prueba de formación de tubo germinativo, pueden usarse con éxito suero humano o bovino, incluso suero de ternero fetal que se vende comercialmente. Otros medios comercializados en los que también se realiza la prueba son seroalbúmina, ovalbumina, bilis bovina diluida, o peptona. (34).

FUNDAMENTACION DEL TEMA:

El procedimiento de la prueba de formación de tubo germinativo en suero humano, varía de un laboratorio de diagnóstico microbiológico a otro. Este -- hecho apoya el presente trabajo, el cual está dirigido a obtener la mayor -- optimización de la prueba, y tener así las bases para apoyar o no su uso. -- Entre los aspectos más importantes involucrados en las variaciones del procedimiento se encuentran: diferentes tiempos de lectura, diferentes formas de inocular el suero, empleo de sueros sin conocer su concentración de glucosa ni el pH que tienen, empleo de sueros mezclados, individuales o almacenados. La optimización de la prueba es importante puesto que es la forma rápida y no costosa de diferenciar C. albicans y C. stellatoidea de todas las demás levaduras patógenas.

En los laboratorios de diagnóstico microbiológico, la prueba de formación -- de tubo germinativo en suero humano se realiza de rutina, ya que es considerada útil para la identificación de C. albicans. Debido a su muy bajo costo, la optimización de la prueba es importante, ya que se busca evitar los gastos que representaría emplear los medios sintéticos comercializados en -- los que también se realiza la prueba. El suero humano es un material sin -- costo y fácil de obtener en todos los laboratorios de análisis clínicos, y por lo tanto se considera como un recurso que debe ser aprovechado al máximo, siempre y cuando sea verdaderamente útil.

Actualmente, hay quienes consideran poco útil la prueba. Pero esto se debe precisamente a las variaciones en la manera de realizarla y a la falta de -- investigaciones que fundamenten esta idea. Es por esto que su optimización es importante, ya que se evitaría el empleo de otras pruebas substituyentes costosas y no tan sencillas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Una de las pruebas más útiles para la rápida identificación presuntiva de C. albicans, como principal patógeno del género Candida, y C. stellatoidea es la prueba de formación de tubo germinativo. C. albicans y C. stellatoidea se diferencian con una prueba de asimilación de sacarosa y por su sensibilidad a la cicloheximida. C. albicans asimila sacarosa y crece en medios comerciales que contienen cicloheximida; C. stellatoidea no hace ninguna de estas -- dos cosas. C. stellatoidea reduce intracelularmente la sal de tetrazolio del medio Pagano-Levine y forma colonias rosadas a purpuras; C. albicans no -- hace esto. (13, 34, 36).

En el presente trabajo se pretende llegar a la optimización de la técnica -- de formación de tubo germinativo de C. albicans y C. stellatoidea en suero humano. La investigación está basada en la composición química del suero, -- con base en las determinaciones que el laboratorio de química sanguínea ya le ha realizado, y se excluye la adición de reactivos que supuestamente mejoran los resultados. De tal manera que se evitan modificaciones del procedimiento general ya conocido que pudieran representar más costo a la prueba y le pudieran restar demasiada práctica y rapidez.

La evaluación de la técnica tiene sus bases en el hecho de conseguir o no -- su optimización, ya que con esto se puede tener la fundamentación del uso -- o desuso de la prueba.

OBJETIVOS:

1. Determinar las concentraciones de glucosa, el intervalo de pH y el tiempo de incubación necesarios para la formación óptima de tubos germinativos de Candida albicans y Candida stellatoidea en suero humano, manteniendo la temperatura de incubación entre 35 - 37°C.
2. Utilizar sueros humanos con diferentes pH y concentraciones de glucosa, y un tiempo de incubación necesarios para la formación óptima de tubos germinativos de C. albicans y C. stellatoidea, manteniendo la temperatura de incubación entre 35 - 37°C.

HIPOTESIS:

Se ha observado que concentraciones de glucosa de 150 a 250 mg/dL y pH de 6.5 a 7.5 son condiciones que promueven en mayor grado el crecimiento micelial de Candida albicans y Candida stellatoidea; estas condiciones se pueden encontrar en el suero humano, así que la formación de tubos germinativos se espera ocurrirá en un menor tiempo de incubación cuando se empleen sueros humanos con estas condiciones, ya que el tubo germinativo es la forma morfológica inicial observada durante la transición levadura/micelio.

MATERIAL Y METODO.

Material:

1. Material de vidrio:

Tubos de ensayo 13 X 100 mm.

Tubos de ensayo 18 X 150 mm cortados a la mitad.

Pipetas graduadas 1 ml.

Pipetas graduadas 10 ml.

Porta-objetos 25 X 75 mm.

Cubre-objetos 22 X 22 mm.

Cajas petri.

Pipetas Pasteur.

2. Material diverso:

Contador de células, dos teclas (Clay Adams).

Tapones de plástico (Vacutainer).

Asas bacteriológicas.

Gradillas.

Mecheros.

Goteros de vidrio.

3. Aparatos:

Autoclave, 170 - 270°C, -30 a 60 psi (AMSCO de México).

Potenciómetro, 53 - 59 mV/pH (25°C) (pH -Metro Indumex, M 822).

Electrodo para pH, combinado referencia/calomel (Schott Gerate).

Incubadoras, ajustadas a 35 - 37°C (Empotradas).

Microscopio óptico, científico binocular (Carl Zeiss).

4. Medios de cultivo:

Gelosa Biggy (Bioxon).

Gelosa Clamidospora (Bioxon).

5. Soluciones:

Cloruro de bario 1% p/v.

Acido sulfúrico 1% v/v.

Solución reguladora pH 7 (Zigma de México).

Solución reguladora pH 4 (Zigma de México).

Solución salina estéril.

6. Material biológico:

Cepas de Candida proporcionadas por el Hospital General de México, -- SSA.

Candida albicans HGM38.

Candida stellatoidea HGM56.

Candida tropicalis HGM92.

Cepas de Candida proporcionadas por la Escuela Nacional de Ciencias - Biológicas, IPN.

Candida albicans

Candida stellatoidea

Cepas de levaduras aisladas de diferentes procesos infecciosos en el Hospital General Regional No. 25 del IMSS, y en el Hospital General - Gonzalo Castañeda del ISSSTE.

Sueros humanos.

Método:**1. Obtención de los sueros:**

Los sueros que se emplearon fueron separados de la sangre total tomada el mismo día, y se usaron previa determinación de glucosa. Variablemente se usaron sueros que procedieron del servicio de urgencias o de la sección de química sanguínea (rutina) del laboratorio clínico - del Hospital General Regional No. 25 del IMSS.

2. Determinación del pH de los sueros:

Se calibró el potenciómetro con soluciones reguladoras de pH 7 y 4. - Se procedió a determinar el pH de los sueros separados en recipientes adecuados y estériles.

3. Preparación del estándar de turbiedad de sulfato de bario:

0.2 ml de $BaCl_2$ 1% p/v se agregó gota a gota a 9.8 ml de H_2SO_4 1% v/v. Así se obtenía el tubo No. 2 del Nefelómetro de MacFarland, cuya concentración celular aproximada es 6×10^8 /ml. (20).

4. Preparación del inóculo:

Las cepas control se sembraron en tubos con gelosa Biggy y se incubaron de 18-24 horas a 35-37°C. Posteriormente se suspendieron con -- asa bacteriológica en 3 ml de solución salina estéril. El inóculo se estandarizó por comparación visual con el tubo No. 2 del Nefelómetro de MacFarland.

Se prepararon así suspensiones de C. albicans, C. stellatoidea y C. tropicalis. Variablemente se usaron cepas control de C. albicans y C. stellatoidea procedentes del Hospital General o del IPN. C. tropicalis se empleó como control negativo.

5. Inoculación de los sueros:

Cada suero con concentración de glucosa y pH conocidos, se distri

buyó en tres tubos 13 X 100 estériles. Se colocaron con pipeta graduada de 1 ml estéril 0.5 ml de suero en cada tubo. Un tubo se inoculó con cinco gotas de suspensión de levaduras de C. albicans, con ayuda de un gotero de vidrio estéril y previa agitación de la suspensión. -- Otro tubo se inoculó así con C. stellatoidea y el tercero con C. tropicalis.

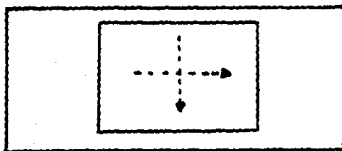
Los sueros inoculados se incubaron estáticamente a 35 - 37°C.

6. Determinación del por ciento de formación de tubo germinativo:

Se hicieron las lecturas de tubo germinativo a los 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de incubación. Con una asa bacteriológica se agitó cada suero y con la misma se colocaron 2 gotas entre porta y cubre objetos. Con un microscopio óptico y con aumento de 40 X se contaron, con ayuda de un cantador de células, las células que formaron y las que no formaron tubo germinativo en un campo microscópico.

En otro campo microscópico se contó igual hasta tener un total de 100 células y así obtener el % de aquellas que formaron tubo germinativo al tiempo de lectura dado.

El recorrido de campos microscópicos se hacía de una manera salteada y en la dirección que se muestra en el siguiente esquema:



Así se determinó el por ciento de formación de tubo germinativo de ca

da especie de Candida inoculada en el suero, y de cada una se obtienen 5 lecturas de tubo germinativo.

7. Determinación de las condiciones óptimas del suero:

Siguiendo la metodología ya descrita, se realizaron pruebas de formación de tubo germinativo para determinar que condiciones de pH y concentración de glucosa del suero eran óptimas. Una vez halladas estas condiciones, se confirmaron realizando pruebas con sueros que tuvieran estas condiciones óptimas, pero las lecturas de tubo germinativo se hicieron sólo hasta que se tuviera un mínimo de 50%, dado que este porcentaje era fácilmente observable en el microscopio.

8. Aplicación de la metodología descrita:

Se realizaron pruebas de formación de tubo germinativo a cepas de Candida recientemente aisladas de 52 muestras biológicas, empleando sueros con condiciones óptimas de pH y concentración de glucosa. Esto con el fin de determinar la eficiencia de la metodología con este tipo de cepas. Aquí también se leyó hasta que se tuviera 50% de formación de tubo germinativo.

Estas cepas se encontraban en tubos con gelosa Biggy y generalmente se usaban poco después de haber mostrado un buen crecimiento.

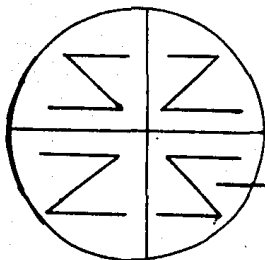
9. Comparación de la prueba de formación de tubo germinativo con la de clamidosporas:

Para determinar la eficiencia del uso de la prueba de formación de tubo germinativo, se aplicó simultáneamente la prueba de formación de clamidosporas a las cepas recientemente aisladas, ya que ésta prueba es considerada de mayor validez para la identificación de C. albicans.

Las pruebas se realizaron en agar para clamidosporas en caja de petri. Se emplearon cepas control de C. albicans y C. stellatoidea, no se --

les colocó cubre-objetos encima a los inóculos y se leyó en el microscopio con aumento 10 X después de 18-48 horas de incubación a 25 - -- 28°C.

El siguiente esquema muestra el método empleado:



Caja de petri con agar para clamidosporas, seccionada para 4 cepas.

Forma de inculación, con asa bacteriológica.

RESULTADOS:

El pH que se ensayó fue de 7.50 a 9.00 y la concentración de glucosa (c-g) fue de 70 a 270 mg/dL.

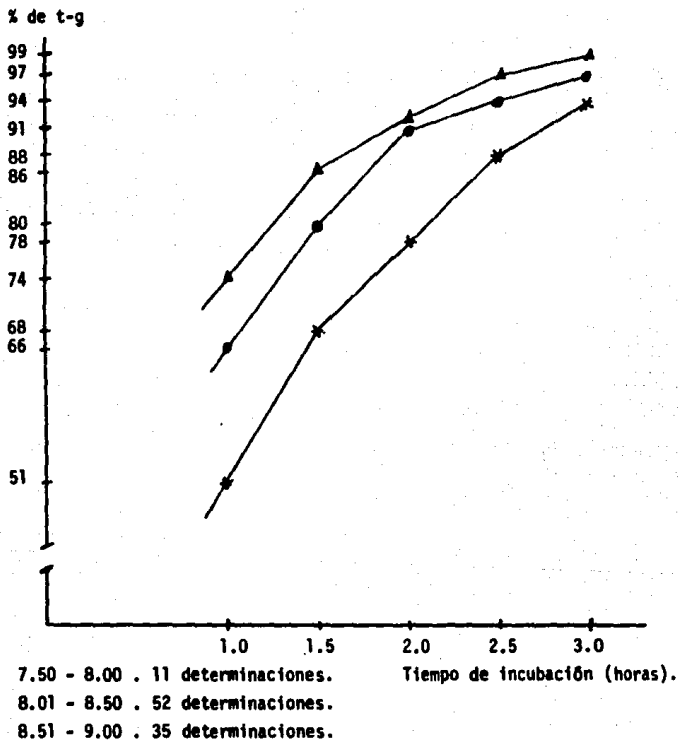
Entre el pH y la c-g del suero, se encontro que el pH tiene mayor influencia en la formación de tubo germinativo (F de t-g) que la c-g. El pH óptimo fue de 7.50 a 8.50.

En las gráficas No. 1 y 2 se muestra la influencia del pH del suero en la F de t-g, sin considerar la c-g. En estas gráficas se observa como a medida que el pH aumenta, el % de tubo germinativo (t-g) es menor, sobre todo en las primeras lecturas.

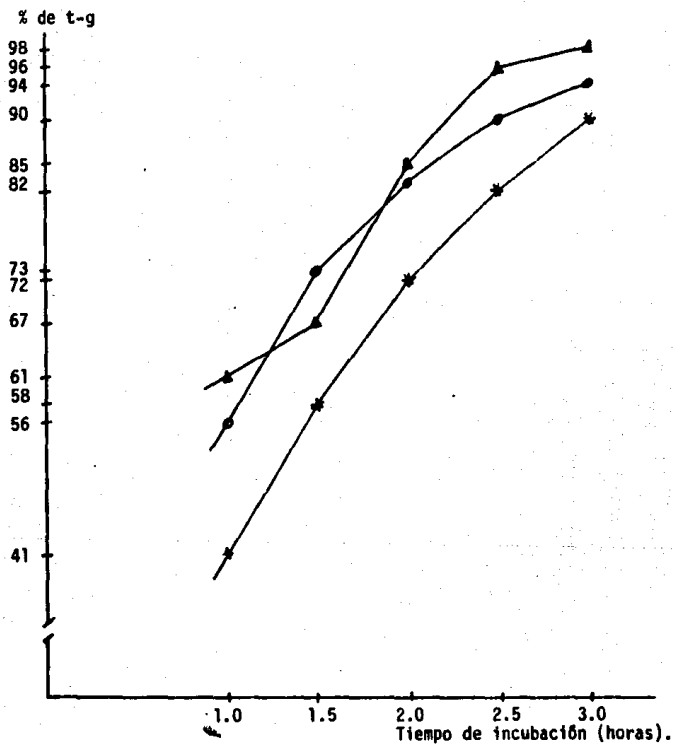
Los puntos de todas las gráficas que se reportan, son la media del número de determinaciones realizadas que se indican en cada gráfica.

En las gráficas No. 3 y 4 se muestra la menor influencia de la c-g del suero en la F de t-g, sin considerar el pH. En estas gráficas se observa que con tres diferentes intervalos de c-g se obtienen resultados similares en la F de t-g. Estos resultados similares se obtienen también con c-g de 111-150 mg/dL (15 determinaciones) y 191-230 mg/dL (18 determinaciones).

Gráfica No. 1. % de F de t-g de *C. albicans* en relación al tiempo de incubación con diferentes pH de los sueros. Concentración de glucosa 70- - 270 mg/dL.



Gráfica No. 2. % de F de t-g de *C. stellatoidea* en relación al tiempo de incubación con diferentes pH de los sueros. Concentración de glucosa 70 - - 270 mg/dL.

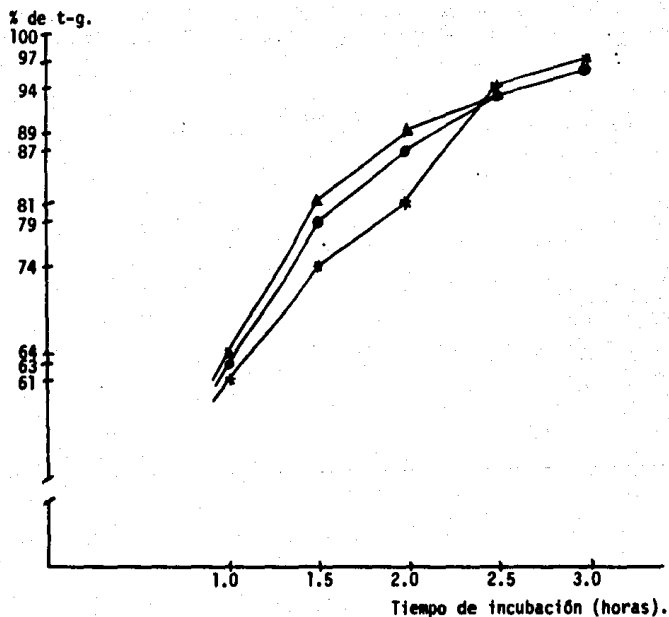


▲ pH 7.50 - 8.00 . 11 determinaciones.

● pH 8.01 - 8.50 . 52 determinaciones.

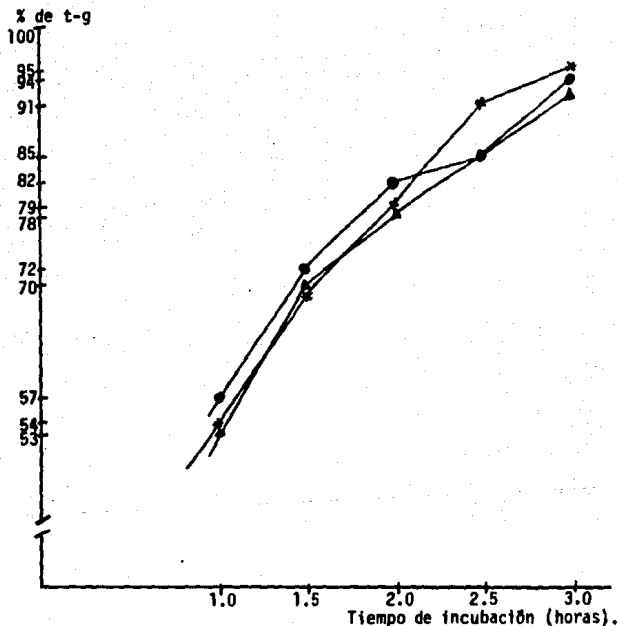
* pH 8.51 - 9.00 . 35 determinaciones.

Gráfica No. 3. % de F de t-g de *C. albicans* en relación al tiempo de incubación con diferentes - concentraciones de glucosa de los sueros. pH 7.50 - 9.00 .



- ▲ Glucosa 231 - 270 mg/dL. 13 determinaciones.
- Glucosa 151 - 190 mg/dL. 42 determinaciones.
- Glucosa 70 - 110 mg/dL. 10 determinaciones.

Gráfica No. 4. % de F de t-g de *C. stellatuidea* en relación al tiempo de incubación con diferentes concentraciones de glucosa de los sueros. pH - 7.50 - 9.00.



- ▲ Glucosa 231 - 270 mg/dL. 13 determinaciones.
- Glucosa 151 - 190 mg/dL. 42 determinaciones.
- Glucosa 70 - 110 mg/dL. 10 determinaciones.

En la Tabla No. 1 se observa mejor la mayor influencia del pH del suero en la F de t-g. A pesar de que dos sueros diferentes tenían diferente c-g, - el pH similar de ambos sueros promovió un similar % de F de t-g. En la Tabla No. 2 se muestra la menor influencia de la c-g del suero en la F de t-g. En dos sueros que tenían la misma c-g pero diferente pH, se obtuvo - diferente % de F de t-g en cada suero.

En estas Tablas (1 y 2) se observa que la c-g del suero también es importante para la F de t-g, aunque en menor grado. Se observa que a medida -- que la c-g aumenta también aumenta el % de F de t-g, sobre todo en las primeras lecturas. Esto se muestra mejor en la Tabla No. 1. Así que el intervalo de c-g óptimo para la F de t-g fué 151-270 mg/dL.

En las Gráficas 1 - 4 se observa que al tiempo de incubación de una hora - se tiene más de 50 % de F de t-g en ambas especies, cuando se emplean las condiciones óptimas de c-g y sobre todo de pH.

De esta manera se establecen las condiciones óptimas de pH y c-g del suero para obtener F de t-g de 50 % o más en una hora de incubación:

pH : 7.50 - 8.50 .
Glucosa: 151 - 270 mg/dL.

Tabla No. 1. Mayor influencia del pH sobre la F de t-g. Comparación de sueros particulares con diferente concentración de glucosa, pero similar pH. % de F de t-g.

Condiciones de los sueros.		Especie	Hora de lectura.				
Glucosa mg/dL.	pH		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
		% de F de t-g.					
133	8.21	A.	66	74	89	99	99
		B.	43	66	81	98	99
229	8.26	A.	66	88	92	96	98
		B.	60	72	82	90	96
171	8.04	A.	72	86	95	99	99
		B.	80	84	98	99	99
243	8.05	A.	83	90	98	99	99
		B.	80	85	87	92	98
120	8.56	A.	61	76	86	98	99
		B.	56	81	96	99	99
180	8.50	A.	82	96	98	99	99
		B.	60	80	91	95	98
240	8.49	A.	92	98	98	99	99
		B.	85	90	91	94	96

A. C. albicans.

B. C. stellatoidea.

Tabla No. 2. Menor influencia de la concentración de glucosa sobre la F de t-g. Comparación de sueros particulares con similar concentración de glucosa, - pero diferente pH. % de F de t-g.

Condiciones de los sueros.		Especie	Hora de lectura.				
Glucosa mg/dL	pH		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
		% de F de t-g.					
91	7.95	A.	80	94	99	99	99
		B.	61	76	96	98	99
93	8.54	A.	30	47	61	76	81
		B.	15	39	52	64	75
180	8.50	A.	82	96	98	99	99
		B.	60	80	91	95	98
180	8.92	A.	38	63	80	91	95
		B.	15	23	50	65	80
229	8.26	A.	66	88	92	96	98
		B.	60	72	82	90	96
225	9.00	A.	28	40	50	62	75
		B.	30	38	43	52	64

A. C. albicans.

B. C. stellatoidea.

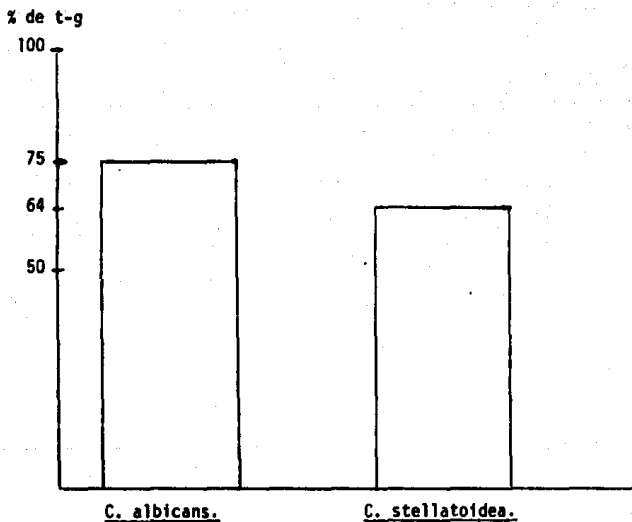
La Gráfica No. 5 indica los resultados obtenidos cuando se emplean las condiciones óptimas de pH y c-g del suero. Las gráficas 6 y 7 muestran los resultados obtenidos cuando se emplea sólo una de las dos condiciones óptimas del suero. La Gráfica No. 8 indica los resultados obtenidos cuando no se emplean las condiciones óptimas de pH y c-g del suero.

Durante el trabajo experimental de ésta investigación, se observó que el pH de los sueros aumenta conforme pasa el tiempo después de haberse obtenido de la muestra de sangre. Así, se obtenían pH bajos (7.50-8.40) en sueros que tenían 1 - 3 horas de haberse obtenido, y pH altos (8.60 - 9.50) en sueros que tenían 4 - 5 horas de haberse obtenido. Debe tenerse en cuenta que esto no sucedía con toda precisión, sino en términos generales.

Se trabajaron 7 sueros con concentración de glucosa mayor de 270 mg/dL (de 290 a 360 mg/dL) y en los resultados obtenidos (Gráfica No. 9) no se observó influencia importante; pero debe considerarse que en estos 7 sueros se incluyen aquellos con pH desde 7.80 hasta 8.80.

Durante el trabajo experimental de esta investigación, se observó que los inóculos de cultivos de levaduras que habían permanecido más de 24 horas en el mismo medio de cultivo a 35 - 37°C ó a temperatura ambiente, después de haber mostrado ya un buen crecimiento, tenían una menor capacidad de formación de tubo germinativo. A éste tipo de inóculos se les llamó inóculos de cultivos viejos. La Tabla No. 3 muestra ésta baja capacidad de F de t-g en diferentes condiciones de pH y concentración de glucosa; los resultados dados son la media del número de determinaciones realizadas.

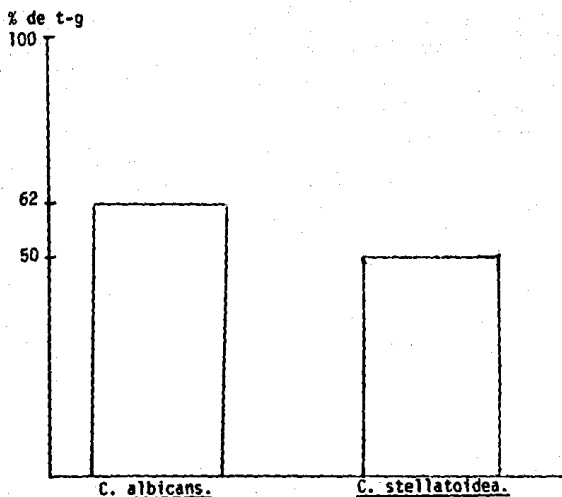
Gráfica No. 5. Efecto en la F de t-g con el empleo de condiciones óptimas de pH y concentración de glucosa del suero.* % de F de t-g en 1 hora de incubación.



* pH 7.50 - 8.50, glucosa 151 - 270 mg/dL.

1. 52 determinaciones realizadas.

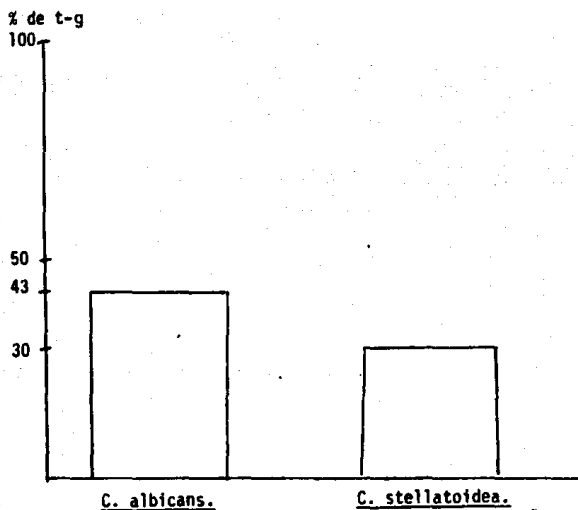
Gráfica No. 6. Efecto en la F de t-g con el empleo de sólo el pH óptimo del suero.* % de F de t-g en 1 hora de incubación.†



* pH óptimo 7.50 - 8.50, glucosa 70 - 150 mg/dL.

†. 40 determinaciones realizadas.

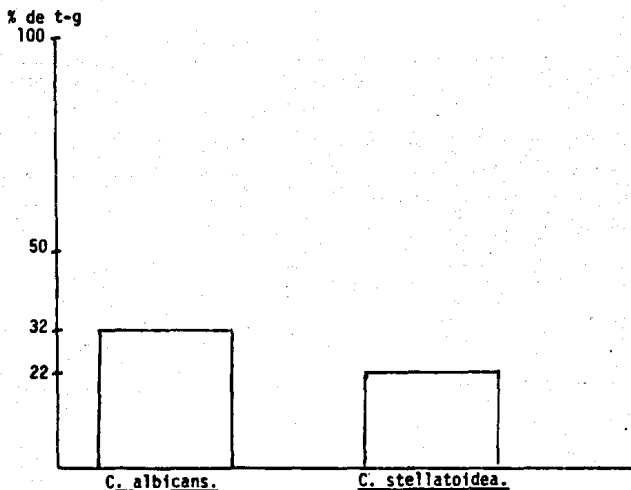
Gráfica No. 7. Efecto en la F de t-g con el empleo de sólo la concentración de glucosa óptima del suero.* % de F de t-g en 1 hora de incubación.¹



* Glucosa óptima 151 - 270 mg/dL. pH 8.51 - 9.00 .

1. 26 determinaciones realizadas.

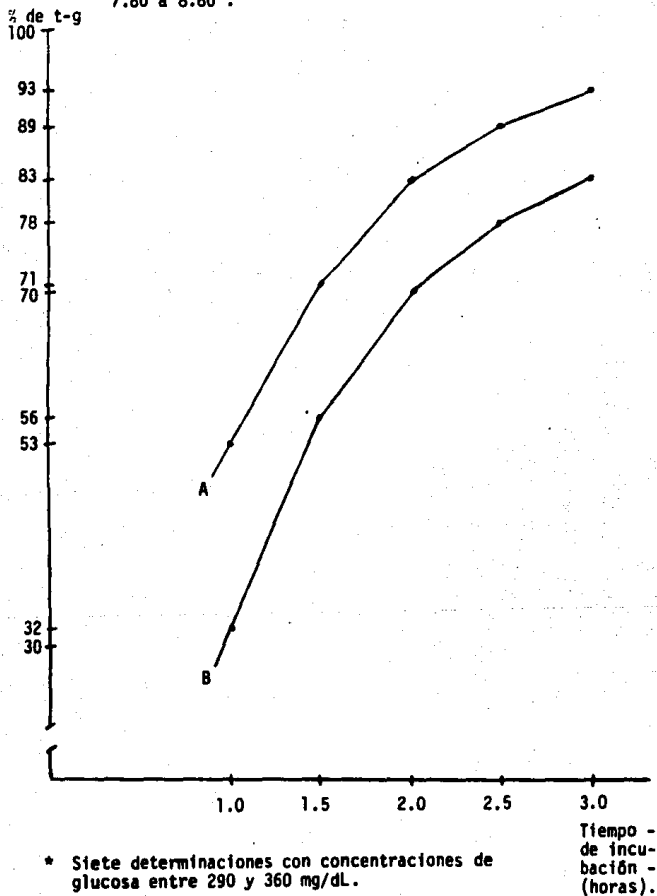
Gráfica No. 8. Efecto en la F de t-g con el empleo de sueros sin condiciones óptimas de pH y concentración de glucosa.* % de F de t-g en 1 hora de incubación.



* pH 8.51 - 9.00, glucosa 70 - 151 mg/dL.

1. 19 determinaciones realizadas.

Gráfica No. 9. % de F de t-g en relación al tiempo de incubación con concentración de glucosa mayor de 270 mg/dL.* pH de - 7.80 a 8.80 .



* Siete determinaciones con concentraciones de glucosa entre 290 y 360 mg/dL.

A. C. albicans.
B. C. stellatoidea.

Tabla No. 3. Efecto en la F de t-g cuando se emplean inóculos de cultivos viejos.* % de F de t-g en 3 horas de incubación.

Condiciones de los sueros.	Especie	Hora de lectura.				
		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Condiciones óptimas ¹	A. (19)	38	61	75	85	93
	B.	45	65	77	87	93
Condiciones no óptimas. ²	A. (2)	2	6	11	22	31
	B.	2	7	11	22	32
pH 7.50-8.50 ³ .	A. (38)	35	55	69	82	90
	B.	35	53	76	80	89
pH 8.51-9.00 ³	A. (7)	27	42	53	65	76
	B.	23	41	50	64	73

* Más de 24 horas en el mismo medio de cultivo a 35 - 37°C o temperatura ambiente, después de haber mostrado desarrollo.

1. pH 7.50 - 8.50, glucosa 151 - 270 mg/dL.
2. pH 8.51 - 9.00, glucosa 70 - 150 mg/dL.
3. Glucosa desde 70 hasta 270 mg/dL.

A. C. albicans.

B. C. stellatoidea.

() Número de determinaciones realizadas.

Considerando un resultado positivo a una F de t-g mayor o igual a 50 % y un resultado negativo a una F de t-g menor de 50 % en una hora de incubación, en relación a si se emplean o no las condiciones óptimas de pH y c-g del suero, se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo de un resultado positivo y eficiencia de la prueba de F de t-g, según el Valor Predictivo de una Prueba de Laboratorio de R.S. Galen (1979).

En las Tablas 4 y 5 se muestra el cálculo de estos parámetros con una muestra de 71 determinaciones realizadas.

Aquí la sensibilidad se aplica como la posibilidad de tener un resultado positivo cuando al realizar la prueba si se emplean las condiciones óptimas de pH y c-g del suero. La especificidad es la posibilidad de tener un resultado negativo cuando al realizar la prueba no se emplean éstas condiciones óptimas. El valor predictivo de tener un resultado positivo se aplica en este caso como la posibilidad de no tener un resultado positivo cuando no se emplean las condiciones óptimas; pero para éste parámetro debe tenerse en cuenta la consideración que se hace de un resultado positivo y un resultado negativo.

La eficiencia se aplica como la funcionalidad del empleo de las condiciones óptimas de pH y c-g del suero para la formación óptima de t-g. (9).

Tabla No. 4. Formación óptima de t-g de C. albicans.

Determinaciones realizadas.	Número con resultado positivo ¹	Número con resultado negativo ²	Total
Número con condiciones óptimas.	TP 48	FN 4	TP + FN 52
Número sin condiciones óptimas.	FP 1	TN 18	FP + TN 19
Total	TP + FP 49	FN + TN 22	TP + FP + FN + TN 71

1. F de t-g mayor o igual a 50 % en una hora de incubación.
2. F de t-g menor a 50 % en una hora de incubación.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = \frac{48}{48 + 4} \times 100 = 92.3 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = \frac{18}{18 + 1} \times 100 = 94.7 \%$$

$$\text{Valor predictivo de un resultado positivo} = \frac{TP}{TP + FP} \times 100 = \frac{48}{48 + 1} \times 100 = 97.9\%$$

$$\begin{aligned} \text{Eficiencia} &= \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN} \times 100 \\ &= \frac{48 + 18}{48 + 1 + 4 + 18} \times 100 = 92.9 \% \end{aligned}$$

TP = Ensayo positivo
 TN = Ensayo negativo
 FP = Falso positivo
 FN = Falso negativo

Tabla 5. Formación óptima de t-g de C. stellatoidea.

Determinaciones realizadas.	Número con resultado positivo ¹	Número con resultado negativo ²	Total
Número con condiciones óptimas.	TP 41	FN 11	TP + FN 52
Número sin condiciones óptimas.	FP 0	TN 19	FP + TN 19
Total	TP + FP 41	FN + TN 30	TP + FP + FN + TN 71

1. F de t-g mayor o igual a 50 % en una hora de incubación.
2. F de t-g menor a 50 % en una hora de incubación.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = \frac{41}{41 + 11} \times 100 = 78.8\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = \frac{19}{19 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Valor predictivo de un resultado positivo} = \frac{TP}{TP + FP} \times 100 = \frac{41}{41 + 0}$$

$$\times 100 = 100\%$$

$$\begin{aligned} \text{Eficiencia} &= \frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN} \times 100 = \\ &= \frac{41 + 19}{41 + 0 + 11 + 19} \times 100 = 84.5\% \end{aligned}$$

TP = Ensayo positivo.

TN = Ensayo negativo.

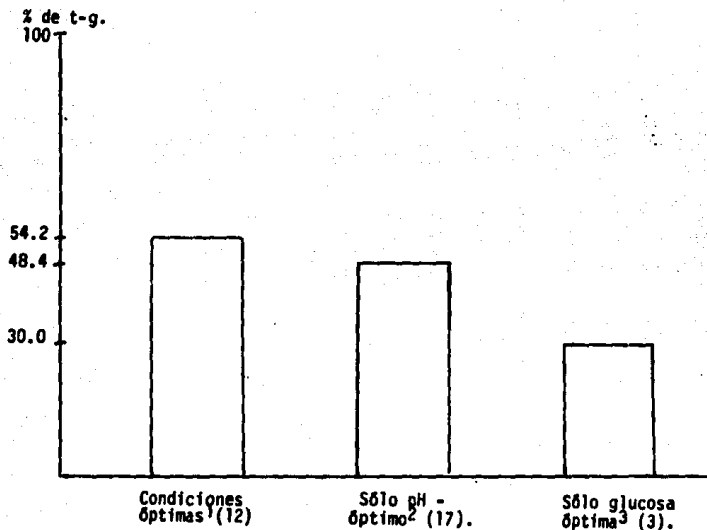
FP = Falso positivo.

FN = Falso negativo.

De una muestra de 52 cepas de levaduras de Candida recién aisladas de diferentes procesos infecciosos, el 61.5 % (32) formaron tubo germinativo; - - 38.5 % (20) no lo formaron. En la gráfica No. 10, se indican los resultados obtenidos de las pruebas de F de t-g realizadas a estas levaduras.

A las mismas levaduras se les realizó la prueba de clamidosporas, para tener una comparación de ambas pruebas. La Tabla No. 6 muestra esta comparación, y abajo se indican los datos de sensibilidad, especificidad, eficiencia y el valor predictivo de un resultado positivo de la prueba de F de - - t-g en relación a la prueba de clamidosporas, ya que ésta última es considerada de mayor validez para la identificación de C. albicans. El cálculo de estos parámetros está basado en el Valor Predictivo de una Prueba de Laboratorio de R. S. Galen (1979). (9).

Gráfica No. 10. % de F de t-g de cepas de Candida recién aisladas de diferentes procesos infecciosos, en relación al uso de condiciones óptimas del suero en una hora de incubación.



1. pH 7.50 - 8.50, glucosa 151 - 270 mg/dL.
2. pH 7.50 - 8.50, glucosa 70 - 270 mg/dL.
3. Glucosa 151 - 270 mg/dL, pH 8.40 - 8.60.

() Número de cepas y de determinaciones realizadas bajo las condiciones indicadas.

Tabla No. 6. Comparación de la prueba de T-g con la de clamidosporas, usando cepas recién aisladas de diferentes procesos infecciosos.

Cepas aisladas	Número con t-g.	Número sin t-g	Total
Número con clamidosporas.	TP 30	FN 0	TP + FN 30
Número sin clamidosporas.	FP 2	TN 20	FP + TN 22
Total	TP + FP 32	FN + TN 20	TP+FP+FN+TN 52

$$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 = \frac{30}{30 + 0} \times 100 = 100 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 = \frac{20}{20 + 2} \times 100 = 90.9 \%$$

$$\text{Valor predictivo de un resultado positivo} = \frac{TP}{TP + FP} \times 100 = \frac{30}{30 + 2}$$

$$\times 100 = 93.7 \%$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN} \times 100$$

$$= \frac{30 + 20}{30 + 2 + 0 + 20} \times 100 = 96.1 \%$$

DISCUSION DE LOS RESULTADOS:

El intervalo de pH óptimo del suero dado en los resultados, es el más bajo que se puede encontrar en el suero humano "in vitro", durante el mismo día que se obtiene de la muestra de sangre.

El intervalo propuesto (7.50 - 8.50) concuerda con los resultados de otras investigaciones. Landau y col. (1965) indicaron que la formación de tubo - germinativo (F de t-g) no se afectaba por pH de 6.1 - 8.2 del suero (en -- éste caso el pH lo regularon con soluciones buffer, con lo que conseguían pH menores de 7.50). Y en medios diferentes de suero se tiene cierta similitud: Mardon y col. (1971) propusieron pH óptimo 6.95, Evans y col. - - (1975) encontraron pH óptimo 7.40, Auger y Joly (1977) indicaron un pH óptimo de 6.70 a 7.20, Buffo y col. (1984) hallaron pH óptimo 6.50 - 7.00. - (1,3, 8, 18, 23).

Así, el pH óptimo para la F de t-g es un pH cercano a la neutralidad; de esta manera, el mejor pH que se puede encontrar en el suero humano es el - más bajo que éste tiene: 7.50 - 8.50. Y mientras más bajo (cercano a la - neutralidad) sea éste, mejor será la F de t-g.

Si en un laboratorio de diagnóstico microbiológico no se cuenta con un potenciómetro ni con tiras reactivas para pH de buena sensibilidad, el ha - llazgo de que el pH de los sueros aumenta (se hace alcalino) conforme pasa el tiempo de haberse obtenido, puede ayudar a elegir un suero con un buen pH para la F de t-g. Así es que mientras más fresco sea un suero, mayor - será la posibilidad de que tenga un pH óptimo (cercano a la neutralidad). Y como el dato de la concentración de glucosa (c-g) del suero es fácil de conocer, no resulta difícil obtener las dos condiciones del suero óptimas para la F de t-g.

Landau y col. (1965) indicaron que había mayor F de t-g a partir de c-g - del suero de 150 mg/dL, y Barolow y col. (1974) mencionaron que había más

F de t-g con 200 mg/dL que con 100 mg/dL de glucosa en el suero. Estos datos se parecen a los indicados aquí como c-g del suero óptima para la F de t-g: 151 - 270 mg/dL. Aún en investigaciones hechas en medios diferentes de suero, se observa la similitud: Evans y col. (1975) propusieron 200 mg/dL de glucosa para la mejor F de t-g. (2, 8, 18).

El hecho de que el pH del suero se halla encontrado con mayor influencia en la F de t-g que la concentración de glucosa, está de acuerdo con Buffo y col. (1984) quienes encontraron que en un medio líquido definido, el pH y la temperatura juegan un papel muy importante en el dimorfismo de C. albicans, siendo pH 6.5-7.5 y temperatura 37-40°C las condiciones que mayor promoción de crecimiento micelial tienen y el cambio considerable de una sola de estas variables evita este crecimiento.(3)

A pesar de la mayor influencia del pH del suero en la F de t-g, la concentración de glucosa también es importante, ya que como se observa en la Tabla No. 1, en pH similares hay mayor % de t-g cuando mayor es la c-g; o - - bien, hay mayor % de t-g en una hora de incubación cuando sólo la c-g es óptima (Gráfica No. 7) que cuando no hay ninguna de las dos condiciones óptimas (Gráfica No. 8).

No se encontró influencia importante en las determinaciones con c-g de 290-360 mg/dL (Gráfica No. 9) probablemente porque en esas determinaciones se incluyen pH desde 7.80 hasta 8.80 y como ya se mencionó el pH es de mayor importancia. Además, Barlow y col. (1974) indicaron que el crecimiento de C. albicans en suero humano a 37°C aumentaba con c-g desde 50 hasta 250 mg/dL, y a partir de esta última concentración hasta 500 mg/dL ya no había aumento ni disminución del crecimiento. En un medio inductor diferente al suero, Evans y col. (1975) hallaron que se tenía igual crecimiento de C. albicans en c-g de 200 y 2000 mg/dL. (2, 8).

Esto sugiere que la máxima promoción de la c-g para la F de t-g es cuando se encuentra entre 250 y 270 mg/dL y que mayores concentraciones ya no aumentan ni disminuyen la F de t-g.

Se encontró que el tiempo de incubación óptimo para la F de t-g, bajo las condiciones de temperatura, tamaño de inóculo, volumen de suero y condiciones óptimas de pH y c-g en el suero ya indicadas, fue una hora, porque empleando solo una de las condiciones óptimas de pH y c-g del suero, en este tiempo de incubación se tiene un % de t-g considerable para su fácil lectura en el microscopio.

El hecho de que el 18.8% de las cepas de C. albicans ensayadas en suero humano por Saéz y Traore (1984) presentaran sus primeros t-g a partir de la 2a. hora de incubación, puede deberse a que los sueros que emplearon no -- eran individuales ni frescos, sino eran muestras de pool de sueros (sueros mezclados) que habían permanecido almacenados. Esto pudo traer como consecuencia que en algunas muestras de pool el pH aumentara tanto como para -- disminuir la F de t-g hasta que los primeros tubos germinativos aparecieran en la segunda hora de incubación. (30)

Por la anterior observación puede deberse que en la mayoría de las investigaciones realizadas en suero se sugiera más de dos horas para hacer las -- lecturas. Taschdjian y col. (1960) y Mackenzie (1962) usaron pool de sueros e individuales, pero almacenados y sus lecturas las hicieron después -- de dos horas de incubación. Landau y col. (1965) usaron suero individual -- pero no fresco, y las lecturas las hicieron hasta las cuatro horas. Barlow y col. (1974) usaron pool de sueros e individuales, pero almacenados y sus lecturas las hicieron hasta las 6 horas de incubación. (2, 18, 21, 36).

Así, la mezcla de los sueros, de diferentes pH, y su almacenamiento disminuye su capacidad de promover la F de t-g y las levaduras forman tubo germinativo muy lentamente.

La baja capacidad de la F de t-g que se observó en las levaduras de los -- inóculos de cultivos viejos (Tabla No. 3), puede ser consecuencia de una -- ligera disminución de las funciones morfobioquímicas debido a una relativa deshidratación del medio y a una baja de nutrientes del mismo. Mackenzie -

(1962) mencionó que la edad del inóculo aparentemente afecta la presencia o ausencia del desarrollo de la hifa y que el porcentaje de las células que forman filamento decrece conforme decrece su viabilidad. (21).

Los parámetros del Valor Predictivo de una Prueba de Laboratorio para la -- formación óptima de t-g de C. stellatoidea (Tabla No. 5) se obtuvieron muy variables debido a que ésta especie forma sus t-g lentamente en relación a la F de t-g de C. albicans, es decir, en general C. stellatoidea forma menos tubos germinativos que C. albicans. Esta observación es más apreciable a los 60 y 90 minutos de incubación.

Esta menor producción de tubos germinativos de C. stellatoidea la observaron Mardon y col. (1971) tanto en suero humano como en otros medios inductores de la F de t-g. En el presente trabajo, generalmente C. albicans formó más tubos germinativos que C. stellatoidea, sobre todo a los 60 y 90 minutos de incubación. (23).

Sin embargo, los resultados de los parámetros tanto para C. albicans como para C. stellatoidea si son aceptables, y además se debe tener en cuenta cómo se considera un resultado positivo y uno negativo en las Tablas 4 y 5.

En la actualidad hay quienes consideran a C. stellatoidea como una variante de C. albicans: Koneman y Roberts (1985) las consideran como el mismo microorganismo; Roberts (1986) no toma en cuenta a C. stellatoidea como una especie sino como una combinación de C. albicans, y por lo tanto menciona que la prueba de F de t-g es un punto relevante para la identificación de C. albicans. Desde los primeros reportes de la técnica de F de t-g se indicó -- esta observación: Taschdjian (1960) mencionó que el estado de especie de -- C. stellatoidea era dudoso, Kamaya (1968) consideró la posible variación de especie de C. stellatoidea respecto de C. albicans. (16, 17, 29, 36).

La prevalencia de C. albicans y C. stellatoidea (especies de Candida que forman tubo germinativo) encontrada por esta técnica fue de 61.5%. Este es un dato ligeramente menor al porcentaje propuesto por Koneman y Roberts

(1985) quienes mencionaron que el 75% de todas las levaduras halladas en el laboratorio clínico son C. albicans. El dato disminuido puede deberse a que la muestra total fue pequeña (52 cepas aisladas), o a un aumento de infecciones oportunistas por otras especies de Candida en la actualidad, o -- bien al aislamiento de otras especies de Candida como contaminantes que no provocaron cuadro clínico. (17).

El menor porcentaje de t-g que se obtuvo en una hora de incubación con cepas aisladas en el Hospital (Gráfica No. 10), comparativamente con las cepas control (Gráficas 5, 6 y 7), probablemente se debe a que estas últimas tienen mayor capacidad morfoquímica por su constante reinoculación a medios frescos "in vitro", y en las primeras ésta capacidad disminuye por estar inhibidas por la respuesta inmune del huésped o incluso por un tratamiento antifúngico. Sin embargo, aún usando sólo la glucosa óptima (Gráfica No. 10), en una hora de incubación se tiene un % de F de t-g fácilmente observable en el microscopio.

Así como Taschdjian y col. (1960) y Mackenzie (1962) compararon la prueba de F de t-g con la de clamidosporas, aquí también se realizó la comparación de ambas pruebas, pero además se calcularon los parámetros indicados abajo de la Tabla No. 6. Galen (1979) considera la sensibilidad como la posibilidad de tener, en éste caso particular, un resultado positivo en la prueba de F de t-g cuando la cepa en cuestión forma clamidosporas. Aquí se obtuvo sensibilidad del 100% porque no se encontró una cepa que si formara clamidosporas pero no tubos germinativos, a pesar de que sí existen cepas con ésta característica: Mardon y col. (1969) estudiaron el dimorfismo en una variante bioquímica de C. albicans que no forma t-g. En la cartilla de reacciones para levaduras propuesta por Koneman y Roberts (1985) la prueba de tubo germinativo aparece como variable para C. albicans y C. stellatoidea, y la prueba de clamidosporas aparece como positiva para C. albicans y variable para C. stellatoidea. (9, 17, 21, 22, 36).

Galen (1979) considera la especificidad como la posibilidad de tener un -- resultado negativo en la prueba de F de t-g cuando la cepa en cuestión no

forma clamidosporas. Se obtuvo una especificidad ligeramente baja (90.9%) - debido a que C. stellatoidea es variable en clamidosporas. Así que las dos - cepas aisladas en el Hospital que sí formaron t-g pero no clamidosporas (Tabla No. 6), presuntivamente se tratan de C. stellatoidea. (9).

El valor predictivo de tener un resultado positivo se refiere a la posibilidad de que al realizar la prueba no sucedan falsos positivos. Nuevamente la variabilidad de C. stellatoidea en la formación de clamidosporas influyó en el resultado obtenido (93.7%).

La eficiencia es la posibilidad de que al realizar la prueba de tubos germinativos, los resultados sean correctos en relación a la formación o no de -- clamidosporas. Aquí se obtuvo una eficiencia del 96.1%, la cual, al igual - que el resultado de los otros parámetros, es un resultado aceptable según -- los criterios del Valor Predictivo de una Prueba de Laboratorio, de R. S. Galen (1979), para la prueba de F de t-g en relación a la prueba de formación de clamidosporas. (9).

Se debe tener presente la importancia de las condiciones del procedimiento - para la F de t-g propuesto en este trabajo que se mantuvieron constantes:

1. Temperatura de 35-37°C es óptima para la F de t-g, además de ser la más usada en las incubadoras de los laboratorios.
2. La manera de inócular el suero es importante dado que, además de ser un inóculo suficientemente pequeño, se tiene la seguridad de que la superficie de contacto con el sustrato de todas las levaduras inóculadas será total.
3. Inóculo de 18-24 horas de incubación a 35-37°C, o cuando ya muestra - buen crecimiento, es importante, dado que inóculos de cultivos viejos - (que tienen más de 24 horas en el mismo medio de cultivo a temperatura ambiente o 35-37°C, después de haber mostrado desarrollo) tienen una - menor capacidad de F de t-g.
4. EL empleo de sueros frescos e individuales (no mezclados) es fundamen-

tal, puesto que su mezclado y almacenaje les disminuyen su promoción de F de t-g.

5. Volumen de 0.5 ml. de suero es ideal, dado que es fácil conseguir esta cantidad de suero; y si se desea trabajar con un control positivo y un control negativo en la prueba, se requieran 1.5 ml de suero, lo cual no es dificultoso obtener.
6. La incubación estática (sin agitación), resulta ser adecuada, además de no ser comunes en los laboratorios las incubadoras con agitación.

CONCLUSIONES:

1. Se logró determinar las concentraciones de glucosa y el intervalo de pH del suero humano, así como el tiempo de incubación, necesarios para la formación óptima de tubos germinativos (t-g) de C. albicans y C. --stellatoidea, a temperatura de incubación de 35-37°C. Estas concentraciones de glucosa e intervalo de pH óptimos son: 151-270 mg/dL y pH -- 7.50 - 8.50 para una hora de incubación.
2. Concentraciones de glucosa de 150 a 250 mg/dL sí promueven la formación de t-g (F de t-g) en un menor tiempo de incubación y no obstante que pH de 6.5 a 7.5 no se encontró en los sueros empleados, el intervalo de 7.50 - 8.50, que es cercano al propuesto en la hipótesis, sí promueve una rápida F de t-g.
3. Puede emplearse sólo una de las dos condiciones óptimas del suero y obtener buenos resultados. Si no se emplean las condiciones óptimas del suero, la incubación deberá prolongarse hasta más de 1.5 horas.
4. Respecto a los resultados obtenidos con cepas de Candida aisladas de muestras biológicas, se puede concluir lo siguiente:
 - a) No es común encontrarse con la variante de C. albicans que no -- forma tubo germinativo.
 - b) Si una cepa forma t-g, pero no clamidosporas, presuntivamente se trata de C. stellatoidea; aquí se encontró el 3.8% de estas cepas.
 - c) Puede existir una cepa de C.stellatoidea que no forme t-g ni clamidosporas.
 - d) Siempre que una cepa de levaduras forme verdaderos tubos germinativos, por muy bajo que sea su % de formación, se trata de C. albicans o de C. stellatoidea.

5. Se ha logrado la optimización de la prueba de formación de t-g de C. albicans y C. stellatoidea en suero humano. Con esto se ha llevado a cabo la evaluación de la técnica y se concluye lo siguiente:
- a) El procedimiento propuesto en éste trabajo se considera sencillo y práctico.
 - b) Este procedimiento bien llevado a cabo, disminuye considerablemente el tiempo que anteriormente se ocupaba en realizar la prueba.
 - c) El suero humano, empleado como aquí se propone, sí es verdaderamente útil para la prueba de F de t-g.
 - d) Con la optimización de la prueba, ya no se le puede considerar obsoleta, ni tampoco ser totalmente sustituida por pruebas de mayor costo y no tan sencillas.
 - e) Al tener así una prueba barata, sencilla, rápida y de buena sensibilidad, especificidad y eficiencia para la identificación de - - C. albicans y C. stellatoidea, se tienen las bases que apoyan la continuación de su uso.

ANEXOS:

No. 1. Criterios de identificación de las especies de Candida proporcionadas por El Hospital General de México.*

PRUEBA

	<u>C. albicans</u> HCM38	<u>C. stellatoidea</u> HCM56	<u>C. tropicalis</u> HCM92
Asimilación:			
Sacarosa	+	-	+
Lactosa	-	-	-
Fermentación:			
Galactosa	+	-	+
Trehalosa	+	-	+
Tubos germinativos	+	+	-
Clamidosporas	+	-	-
Reducción de la sal de tetrazolio (Medio Papanicolaou-Levine).	-	+	+

* Datos proporcionados por los otorgantes de las cepas.

No. 2. Criterios de identificación de las especies de Candida proporcionadas por el I.P.N.*

Prueba	<u>C. albicans</u>	<u>C. stellatoidea</u>
Asimilación:		
Glucosa	+	+
Sacarosa	+	-
Lactosa	-	-
Fermentación:		
Glucosa	+	+
Galactosa	+	-
Trehalosa	+	-
Ureasa	-	-
Utilización de KNO_3	-	-
Tubos germinativos	+	+
Clamidosporas	+	+

* Datos proporcionados por los otorgantes de las cepas.

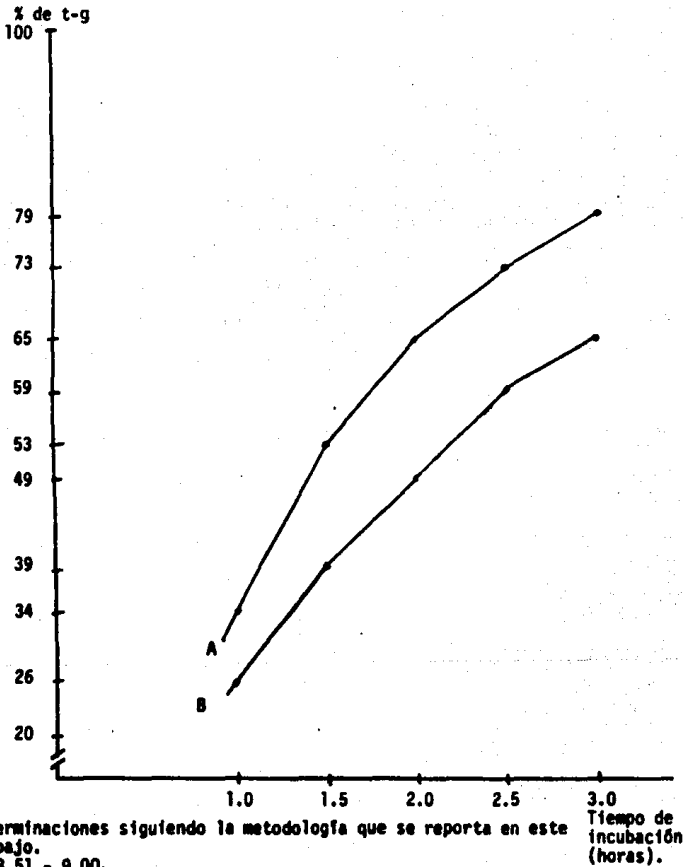
No. 3. Variación del pH de sueros mantenidos 24 horas en refrigeración.

pH inicial	pH 24 horas después.
7.98	8.64
8.58	8.94
8.55	8.92
8.31	8.90
8.40	8.86
8.36	8.66
8.41	8.90

No. 4. Variación del pH de sueros mantenidos 24 horas a temperatura ambiente.

pH inicial	pH 24 horas después.
8.03	9.12
8.64	9.32
8.42	9.24
8.44	9.30
8.22	9.11
8.16	9.23
8.54	9.29
8.32	9.20
8.40	9.09
8.27	9.12
8.49	9.45

No. 5. Siete determinaciones de F de t-g empleando sueros de un día anterior que se mantuvieron en refrigeración*.

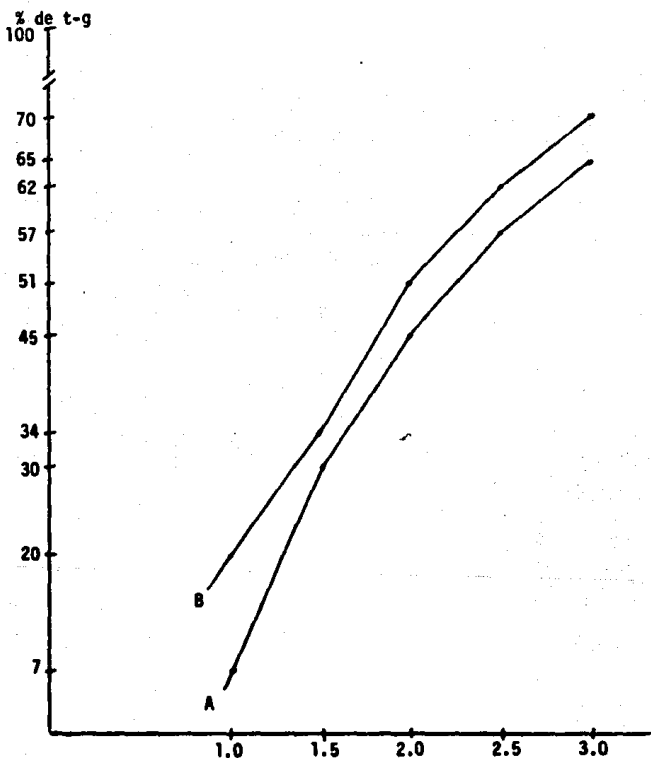


* Determinaciones siguiendo la metodología que se reporta en este trabajo.
 pH 8.51 - 9.00.
 Glucosa 151 - 270 mg/dL.

A. C. albicans

B. C. stellatoidea

No. 6. Once determinaciones de F de t-g empleando sueros de un día anterior que se mantuvieron a temperatura ambiente.*



* Determinaciones siguiendo la metodología que se reporta en este trabajo.

pH 9.01 - 9.50

Glucosa 151 - 270 mg/dL.

Tiempo de incubación - (horas).

A. C. albicans

B. C. stellatoidea.

No.7. Abreviaciones empleadas.

t-g:	tubo germinativo.
F de t-g:	formación de tubo germinativo.
c-g:	concentración de glucosa.
T P :	ensayo positivo.
T N :	ensayo negativo.
F P :	falso positivo.
F N :	falso negativo.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Auger, P. y J. Joly. 1977. Factors influencing germ tube production in Candida albicans. Mycopathologia 61 (3): 183-186.
- 2.- Barlow, A. J., T. Aldersley y F. W. Chattaway. 1974. Factors present in serum and seminal plasma wich promote germ tube formation and mycelial growth of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 82 : 261-272.
3. Buffo, J., M. A. Herman y D. R. Soll. 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in Candida albicans. Mycopathologia 85: 21-30.
4. Chilgren, R. A., R. Hong y P. G. Quie. 1968. Human serum inter-actions with Candida albicans. J. Immunol. 101 (1): 128-132.
5. Conant, N. F., D. T. Smith, R. D. Baker y J. L. Callaway. 1972. Micología. 3a. ed. Editorial Interamericana. México. p. 518-526.
6. Cooper, B. H. 1982. Introducción a la micología clínica. p. 645-653. - En Lennette, E. H. Microbiología Clínica. 3a. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
7. Esterly, N. B., R. B. Shelby y R. Crunse. 1967. The relation-ship of transferrin and iron to serum inhibition of Candida albicans. J. Invest. Derm. 49 (5): 437-442.
8. Evans, G. V., F. C. Odds, M. D. Richardson y K. T. Holland. 1975. - - Optimum conditions for initiation of filamentation in Candida albicans. Can. J. Microbiol. 21: 338-342.
9. Galen, R.S. 1979. Diagnostic Medicine. Predictive Value Theory. New Math in the lab. p. 31-39.

10. Gow, N. A. R. y G. W. Gooday. 1984. A model for the germ tube formation and mycelial growth form of Candida albicans. J. Med. Vet. Mycol. 22: - 137-143.
11. Hamilton, H. K. y M. B. Rose. 1986. Clínica y terapéutica. 1a. ed. Editorial Interamericana. México D. F. p. 383-384.
12. Hazen, K. C. y J. E. Cutler. 1979. Autorregulation of germ tube formation by Candida albicans. Infect. Immun. 24 (3): 661-666.
13. Hedden, D. M. y J. D. Buck. 1980. A reemphasis-germ tube diagnostic for Candida albicans have no constrictions. Mycopathologia 70 (2): 95-101.
14. Holmes, A. R. y M. G. Shepherd. 1988. Nutritional factors determine - - germ tube formation in Candida albicans. J. Med. Vet. Mycol. 26:127-131.
15. Hurley, R. 1965. The pathogenicity of Candida stellatoidea. J. Path. -- Bact. 90 (1): 351-354.
16. Kamaya, T. 1968. Simple rapid identification of Candida albicans with - emphasis on the differentiation between C. albicans and C. stellatoidea. Mycopathol. Mycol. Appl. 35: 105-112.
17. Koneman, E. W. y G. D. Roberts. 1985. Micología. Práctica de laboratorio. 3a. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. p. 177-185.
18. Landau, J. W., N. Dabrowa y V. D. Newcomer. 1965. The rapid formation in serum of filaments by Candida albicans. J. Invest. Derm. 44 (3) : - 171-179.
19. Landau, J. W., N. Dabrowa, V.D. Newcomer y J. R. Rowe. 1964. The relationship of serum transferrin and iron to the rapid formation of germ tubes by Candida albicans. J. Invest. Derm. 43: 473-482.

20. MacFaddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2a. ed. Williams and Wilkins, Baltimore. P. 482-483.
21. Mackenzie, D. W. R. 1962. Serum tube identification of Candida albicans. J. Clin. Pathol. 15: 563-565.
22. Mardon, D., E. Balish y A. W. Phillips. 1969. Control of dimorphism in a biochemical variant of Candida albicans. J. Bacteriol. 100 (2) : - 701-707.
23. Mardon, D., S. K. Hurst y E. Balish. 1971. Germ tube production by Candida albicans in minimal liquid culture media. Can. J. Microbiol. - 17: 851-856.
24. Mattia, E. y A. Cassone. 1979. Inducibility of germ tube formation in Candida albicans at different phases of yeast growth. J. Gen. Microbiol. 113 : 439-442.
25. Mitchell, T.G. 1986. Micología Médica. P. 1257-1268, 1334-1342. En Joklik, W. K., H. P. Willett y D. B. Amos. Zinsser Microbiología. 18a. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
26. Pollack, J. H. y T. Hashimoto. 1987. The role of glucose in the pH - - regulation of germ tube formation in Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 133 : 415-424.
27. Pollack, J. H. y T. Hashimoto. 1988. The requirements for bicarbonate and metabolism of the inducer during germ tube formation by Candida albicans. Can. J. Microbiol. 34 : 1183-1188.
28. Rippon, W. J. 1974. Medical Mycology. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. Edit. W. B. Saunders Company, Philadelphia. p. 297-347.

29. Roberts, G. D. 1986. Laboratory Methods in Basic Mycology. p. 752-755. En Bailey y Scott's (Eds.) Diagnostic Microbiology. 7a. ed. The C. V. Mosby Company, St. Louis Missouri.
30. Saéz, H. y Traore F. 1984. Morphogenese de Candida albicans dans le -- sérum humain. Tubes mycéliens et pseudomycéliens observés sur 250 souches. Pathol. Biol. 32 (3) : 160 - 164.
31. Scherwitz, C., R. Martín y H. Ueberberg. 1978. Ultrastructural investigations of the formation of Candida albicans germ tube and septa. Sabouraudia 16 : 115-124.
32. Sevilla, M. J. y F. C. Odds. 1986. Development of Candida albicans hyphae in different growth media - Variations in growth rates, cell -- dimensions and timing of morphogenetic events. J. Gen. Microbiol. 132: 3083-3088.
33. Shepherd, M. G., C. Y. Yin, S. P. Ram y P. A. Sullivan. 1980. Germ tube induction in Candida albicans. Can. J. Microbiol. 26 : 21-26.
34. Silva-Hutner, M., y B. H. Cooper. 1982. Levaduras de Importancia Médica. p. 678-694. En Lennette, E. H. Microbiología Clínica. 3a. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
35. Stewart, E., M. A. R. Gow y D.V. Bowen. 1988. Cytoplasmatic alkalization during germ tube formation in Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 134 : 1079 - 1087.
36. Taschdjian, C. L., J. J. Burchall y P. J. Kozinn. 1960. Rapid identification of Candida albicans by filamentation on serum and serum substitutes. Am. J. Dis. Child. 99 : 212 - 215.

37. Walker, G. M., P. A. Sullivan y M. G. Shepherd. 1984. Magnesium and - the regulation of germ tube formation in Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 130 : 1941 - 1945 .
38. Youmans, G. P. 1982. Criptococosis, Candidiasis y Aspergilosis. p. 487-493. En Youmans, G. P., P. Y. Paterson y H. M. Sommers. Infectologia Clínica. 2a. ed. Editorial Interamericana. México, D.F.