



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" ZARAGOZA "

USO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO A BASE DE PULQUE
PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS DE INTERES MEDICO

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

MARTHA ELENA ARANDA MERLO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1989



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

1) Introducción	1-31
2) Fundamentación de la elección del tema	32-34
3) Planteamiento del problema	35
4) Objetivos	36
5) Hipotesis	37
6) Material y equipo	38-40
7) Metodología	41-51
8) Resultados	52-64
9) Análisis de costos	65-66
10) Análisis de resultados	67-70
11) Conclusiones	71-72
12) Bibliografía	73-78

1) Hongos

En la actualidad se usa el término hongo para designar a los organismos eucarióticos, portadores de esporas, aclorofílicos que se reproducen sexual y/o asexualmente y cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina o celulosa, o ambas sustancias, junto con otras muchas moléculas orgánicas complejas (3).

1.1.1. Importancia clínica

Algunos factores como la movilidad de las poblaciones humanas y el amplio uso terapéutico de drogas que alteran las inmunodefensas hacen necesarias técnicas de aislamiento e identificación de hongos patógenos (21).

Los datos clínicos de las micosis son como en todas las especialidades, el punto de partida más importante para efectuar un diagnóstico acertado. La ocupación del paciente también tiene gran importancia para la orientación diagnóstica (21,22).

Los estudios como biometría hemática, química sanguínea, son de gran ayuda dependiendo del tipo de micosis.

Los pacientes tratados con drogas que alteran inmunodefensas son susceptibles a infección por hongos que normalmente se consideraban seprófitos inofensivos, los pacientes con diabetes mellitus son también susceptibles a infecciones serias por hongos no considerados patógenos humanos (24).

Las muestras clínicas de las cuales puede aislarse hongos son por lo general: Escamas de piel, secreciones oculares, uñas, -

pus, esputo, abscesos, orina, heces, exudados faringeos, nasal, y vaginal.

1.1.2. Medios de cultivo .

El pronto tratamiento de las muestras clínicas recién tomadas y el agregado de antibióticos a muestras contaminadas son dos pasos que pueden seguirse para mejorar las posibilidades de aislamiento de hongos. La selección de medios para llevar a placas muestras sospechosas de contener hongos debe considerarse cuidadosamente (24).

Dos tipos generales de medios de cultivo son esenciales -- para el aislamiento primario de hongos de muestras clínicas, un medio debe ser no selectivo, es decir que permite el desarrollo de virtualmente todas las especies fungicas.

El agar glucosa de Sabouraud es el medio de aislamiento -- más comunmente empleado. Su bajo pH inhibe el desarrollo de muchas especies bacterianas contaminantes que pueden estar presentes en la muestra (21).

El segundo tipo de medio útil para el aislamiento fúngico primario es uno selectivo para hongos. Esto se consigue comunmente agregando antibióticos a un medio basal no selectivo, a fin de inhibir la contaminación bacteriana (21).

Las combinaciones de penicilina (20 unidades/ml), y estreptomycinina (40 unidades/ml) o gentamicina (5 microgramos/ml) pueden utilizarse para inhibir el desarrollo de bacterias (21).

Se puede agregar cicloheximida, en una concentración de -- 0.5 mg/ml, a fin de impedir el sobrecrecimiento de algunos hongos de desarrollo más rápido que pueden contaminar las placas de cultivo (21).

Las combinaciones de antibióticos se pueden agregar a una variedad de bases de cultivo, incluyendo el agar glucosa de Sabouraud. Estos medios son especialmente útiles para el aislamiento de dermatofitos de muestras cutáneas (21).

Aunque algunos autores han utilizado medios de cultivo selectivos conteniendo diversos colorantes (6), éstos no han sido utilizados rutinariamente para el cultivo de hongos, se han hecho ensayos con azul de tripano para el aislamiento de Cryptococcus sp. y Trichosporum cutaneum obteniéndose colonias azul-oscureas sin embargo no se usan porque afectan el color de la colonia, y el color del pigmento difundible, que frecuentemente se usan como criterio de clasificación (7,9,22).

Se han usado también varios medios de cultivo para aislamiento e identificación de hongos como agar hojuela de maíz --- (33), agar patata, agar arroz, etc.

Actualmente se recomienda incubar todos los cultivos fúngicos a una temperatura de 25-30°C, pero además, todo hongo aislado en cultivo primario que se presume dimórfico puede subcultivarse en otra placa o tubo y entonces incubarse secundariamente a 37°C para obtener la fase levaduriforme.

Todos los cultivos fúngicos deben incubarse un mínimo de-

8 días antes de ser descartados como negativos. Es importante -- mantener los medios durante todo este período, aún cuando los -- hongos de más rápido desarrollo pueden aparecer antes. El aislamiento de un moho no excluye la recuperación de una de las especies patógenas de más lento desarrollo en el mismo tubo o placa de cultivo.

1.1.3. Identificación de Hongos.

Los estudios micológicos que con frecuencia se realizan -- son (20).

- a) examen en fresco
- b) frotis
- c) cultivo
- d) inoculación animal
- e) inmunología
- f) biopsia

a) Examen en fresco: El material biológico (escamas, uñas, co-- tras, exudados, líquido cefalorraquídeo, sinovial etc.) se co-- loca entre portaobjetos y cubreobjetos en una gota de líquido-- aclarante que puede ser potasa al 25-30%, azul de algodón lacto-- fenol, eritrosina, azul de metileno ó tinta china (7,8,20).

Las preparaciones microscópicas así obtenidas pueden obser-- varse con iluminación normal o con diafragma de contraste de-- fase (7,9).

b) Frotis: Las técnicas que dan mejor resultado para poner de --
manifiesto las estructuras de hongos son: Giemsa, Gram, Método de --
Ziehl (9,20).

Se han también utilizado métodos más o menos rápidos para --
la identificación de hongos patógenos en piel, pero por lo gene--
ral involucran el uso de medios de cultivo de una u otra forma.
(10).

c) Cultivo: Se realiza en medios simples o con antibióticos, ---
también se han formulado medios a base de diferentes sustratos, -
para el aislamiento de hongos de interés médico (33,37).

Luego de haber llevado a cabo, los procedimientos adecuados
para la recolección (32), procesamiento e inoculación de la mues--
tra la tarea inmediata consiste en determinar, lo más pronto po--
sible la patogenicidad potencial del hongo aislado y en particu--
lar si pertenece o no al grupo dimórfico, para ello debe conside--
rarse lo siguiente:

1. Desarrollo rápido: Es decir aparición de una colonia madura,--
en cinco días, los hongos dimórficos son de crecimiento más len--
to requiriendo dos semanas ó más para producir colonias maduras.
2. Apariencia brillante, coloreada de la pigmentación superfi --
cial: Los hongos de desarrollo rápido producen comunente espo--
ros de colores brillantes; los hongos dimórficos son blancos, --
grises o marrones, pero nunca exhiben tonos pastel.

3. Producción de pigmentos hidrosolubles: que difunden en el agar haciendo que el reverso de la colonia aparezca brillantemente coloreada. Los hongos dimórficos pueden teñir de negro ó pardo el reverso de la colonia. No se producen otros colores.
4. Inhibición del desarrollo en agar con agentes antifúngicos como la cicloheximida: Los hongos dimórficos no son inhibidos.

La identificación presuntiva de un hongo dimórfico debe confirmarse demostrando su conversión a la forma de levadura cuando un subcultivo de la colonia se incuba a 37°C en un medio adecuado (21).

Para reducir el crecimiento de contaminantes en procedimientos micológicos de rutina se ha usado por diversos autores el lavado de las lesiones con etanol-éter antes de recolectar el material a cultivo sin influir en el crecimiento de los dermatofitos, sin embargo no se ha usado rutinariamente, teniendo para ello, medios de cultivo que incluyen en su formulación antibióticos (7,32).

Para la identificación de los hongos suelen tomarse en cuenta características tanto macroscópicas como microscópicas. Dentro de las características microscópicas están las dimensiones de las hifas, presencia o ausencia de septos, forma de esporas o conidias, presencia o ausencia de macroconidias y microconidias, tabiques en las esporas o conidios. Entre las características macroscópicas se debe considerar apariencia de

la colonia, color de la misma, así como los cambios de color de ésta con respecto al tiempo, y la presencia o ausencia de pigmento difundible (22,38).

Para la identificación de los hongos filamentosos suelen utilizarse los siguientes pasos:

1. Montaje por desmenuzamiento: con un par de agujas de ----- disección o varillas con punta afilada, extraer una pequeña --- porción de la colonia por examinar incluyendo algo de agar por debajo de la superficie. Colocar sobre un portaobjetos en una -- gota de lactofenol azul de anilina, desmenuzar la colonia con -- las agujas de disección y colocar un cubreobjetos, observar al -- microscopio (21).

Algunos autores han utilizado técnicas como la de cepillo-miniatuara para transferir y preparar replicas de cultivos micológicos (17).

2. Preparado con cinta adhesiva: Utilizando una cinta adhesiva-transparente, presionar la parte engomada utilizando una asa, - suave pero firmemente contra la superficie de la colonia, tomando una porción del micelio aéreo.

Colocar inmediatamente la cinta con la parte engomada hacia abajo sobre un portaobjeto con una pequeña gota de algodón-azul de lactofenol y examinar al microscopio (38).

3. Microcultivo: En los casos en que ninguno de los dos métodos descritos permitan establecer una identificación exacta o si se

desean preparados permanentes para futuros estudios se reco---
mienda la técnica de microcultivo en portaobjetos, puede obte-
nerse preparados de gran calidad en los que la disposición y es-
trutura de los esporos están magníficamente preservados (7,21,
24).

4. Técnicas diversas que se han ido implementando por varios --
autores:

- Como el método Rindell adaptado en la cual una suspensión del
hongo en salina se introduce en un capilar seguido de agar Sa--
bouraud se paran, se permite el crecimiento de los hongos, se -
inactiva con fenol al 3% y se sellan con parafina (32).

- Método para mantener cultivos de referencia (28) técnica ba--
sada en el almacenamiento a vacío, una porción de una colonia -
con bastante medio sólido se coloca dentro de tubos tapados con
algodón y éste tubo se coloca dentro de otro tubo en el cual en
el fondo se le coloca anhídrido fosfórico y un anillo de vidrio
para evitar el contacto sobre éste y el tubo pequeño, el tubo -
externo se cierra a vacío con la flama (27).

- Método modificado para cultivo de hongos en portaobjetos; un-
cuadro de agar nutritivo para hongos es inoculado colocado en-
tre dos cubreobjetos estériles y todo colocado en una caja de -
petri conteniendo agar-agua, después de que el crecimiento ade-
cuado ha ocurrido se monta el microcultivo de manera convencio-
nal (14).

5. Para el grupo de levaduras suelen usarse técnicas como la--- prueba de filamentación de C.albicans, auxonogramas y zimogramas
6. Se han realizado pruebas de inoculación animal e inmunológicas para la identificación de muchos hongos pero no suelen hacerse rutinariamente.

1.2 INFORME BREVE SOBRE EL PULQUE

1.2.1. Definición

El pulque es un líquido blanco, viscoso, dulce, con bajo --- contenido alcohólico y con cierto sabor ácido, obtenido por la fermentación del aguamiel, el cual es el jugo que se obtiene -- del maguey (34).

1.2.2. Importancia

Esta bebida posee importancia desde varios puntos de vista como son geográfico, económico, bioquímico y sanitario.

Desde el punto de vista geográfico tiene importancia el -- hecho de que esta planta, vive con poca cantidad de agua anual-- esto es, el maguey se desarrolla en zonas semidesérticas de la altiplanicie mexicana donde no se cuenta con suficiente agua. Evita el desgaste de las tierras inhibiendo la erosión al man-- tenerse las plantaciones en buen estado todo el tiempo. Ligado - a esto esta el lado económico del maguey.

El pulque posee múltiples sustancias como vitaminas, sales minerales, aminoácidos esenciales, y una pequeña cantidad de -- proteínas, que son requeridas para la dieta del ser humano (15)

1.2.3. Origen del pulque

El origen etimológico de la palabra pulque tiene varias po-- sibles raíces. El nombre de pulque entre los mexicanos era "Itza coctli" o sea vino blanco y cuando se descomponía se le conocía como "octli-poliuqui", y como esto sucedía fácilmente se piensa

que los que lo vendían pronunciaban la palabra poliuqui, derivan
dese de ésta la palabra pulque que en la actualidad se maneja.

Por otro lado se propuso que dicha palabra es voz araucana
derivada de pulqui, una bebida preparada de algarroba mientras -
que muchos piensan que es de origen antillano.

Antes del descubrimiento de América, los habitantes del ---
centro de la República ya aprovechaban el maguey de diferentes
formas tales como en la elaboración de sus chozas, fabricación -
de hilos, tejidos, escudos, sandalias.

El principal producto que se obtenía de éste era el pulque
que se les daba a los reyes y personas de gran autoridad, pues -
su consumo no era permitido para todos. En la sociedad de los --
indígenas, había grandes castigos que se aplicaban a la gente --
que negociara clandestinamente con este líquido.

Con la llegada de los españoles, el consumo del pulque, se
extendió ampliamente y se reglamentó su comercio (4,25).

Las autoridades, españolas intentaron varias veces restring
uir el comercio de éste y hasta prohibirlo entre los indios, -
pero al no lograrlo, crearon nuevas reglamentaciones para su co-
mercio.

En el siglo pasado el pulque despertó interés para su in--
vestigación, por el hecho de que se obtenía de un jugo natural-
de los magueyes llamado aguamiel y que fermentaba por si solo -
con microorganismos autóctonos. Aparte de ser un líquido embria-
gente se le conocían propiedades nutritivas en la alimentación-
mexicana (4,25).

1.2.4. Composición del pulque

La composición química y bromatológica del pulque varía -- dependiendo del lugar donde se encuentre, sea tinalcal, aduana, ó-pulquería, aunque para la realización de los estudios se hace -- una media de tales variables por lo que las siguientes tablas-- presentan de manera general la composición del mismo:

Análisis del pulque (4)	Contenido en 100 g	
Calcio	0.007	g
Carbohidratos	1.1	g
Hierro	0.0002	g
Niacina	0.004	g
Proteína	0.4	g
Riboflavina	0.0002	g
Tiamina	0.0002	g
Energía	43.0	kcal

Análisis Microbiológico (4)

	Tinalcal	aduanas	pulquería
Bacterias X 10^6 / ml	64	36	15
levaduras X 10^6 / ml	166	115	61
coliformes fecales % en el total de muestras analizadas	22.2	32	5.3

Composición química del pulque (15,29).

acidez total en ácido láctico	0.39	%
agua	94.0	%
cenizas	0.30	%
densidad a 15°C	0.992	
extracto seco a 10°C	1.65	%
glucidos	9.5	%
gomas	0.66	%
grado de alcohol	7.9	%
nitrógeno de aminoácidos	0.01	%
nitrógeno de aminoácidos aromáticos	0.001	%
nitrógeno proteico	0.03	%
proteínas totales	0.345	%
sacarosa	0.04	%
sales minerales	0.32	%
Vitamina B	25-30	UI/ml
Vitamina C	6.5	UI/ml

Contenido de aminoácidos en el pulque (25,26).

	Cantidad en 100 g	
Arginina	2.32	g
Fenilalanina	2.38	g
Histidina	1.00	g
Leucina	2.23	g
Lisina	3.43	g

metionina	0.15	g
treonina	1.36	g
triptofano	0.57	g
valina	1.40	g

Análisis químico (25)

	Tinacal	Aduana	Pulqueria
Alcohol % en Vol°Cl	5.56	7.16	6.33
pH	3.98	3.73	3.84
sacarosa mg/dl	114.40	97.33	85.36
viscosidad en centipoises	9.12	13.83	3.075

Constituyentes nutricionales del pulque (4,15,29)

Componentes y factores nutritivos	Contenido en 100 g	
Calcio	0.01	g
carbohidratos totales	0.08	g
cenizas	0.37	g
hierro	0.0007	g
fosforo	0.006	g
niacina	0.004	g
proteinas	0.37	g
riboflavina (vitamina B ₂)	0.003	g
tiamina (vitamina B ₁)	0.002	g
vitamina C	0.0051	g

1.4. Microorganismos empleados

Hongos

- Aspergillus niger
- Criptococcus neoformans
- Penicillium notatum
- Sporothrix shenckii
- Trichophyton tonsurans.

Bacterias

- Escherichia coli
- Pseudomona aeruginosa
- Staphylococcus aureus

1. Aspergillus niger

DIVISION: Mycota

SUBDIVISION: Eumycotina

CLASE: Ascomycetes

SUBCLASE: Euscomycetidae

ORDEN: Eurotiales

FAMILIA: Trichascaceae

GENERO: Aspergillus

ESPECIE: niger

AFECCION: Aspergilosis

LOCALIZACION: Aparato respiratorio, aparato digestivo, ojos, oídos, uñas, epidermis.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA: Cosmopolita (7,12)

FORMAS EN ESTADO PARASITARIO: Filamentos hialinos, septados, ramificados y conidios.

CULTIVO: Cabezas aspergilaras oscuras, radiadas y globosas que --

llegan hasta el tamaño de 1 mm de diámetro; los esterigmas contienen una serie en los cultivos jóvenes y dos en los viejos conidióforos de tamaño variable, vesículas globosas o subglobosas, de paredes delgadas, esclerotes globosos y superficiales que se reproducen en ciertas condiciones.

REPRODUCCION: Cuando todavía joven y vigoroso, el micelio produce abundantes conidióforos. Estos no se organizan de ningún modo sino que nacen aislados directamente de las hifas somáticas, la célula hifal que se ramifica para dar lugar al conidióforo se llama célula basal. Los conidióforos son hifas largas, erguidas, cada una terminada en una cabeza, la vesícula.

Sobre toda la superficie de la vesícula multinucleada se desarrolla una gran cantidad de esterigmas que la cubren.

Según la especie, pueden producirse uno o dos estratos de esterigmas, los conidios naturalmente salen de los esterigmas secundarios, los esterigmas que llevan los conidios, sean primarios o secundarios, tienen típicamente la forma de botella.

A medida que maduran los esterigmas, comienzan a formarse conidios en sus extremos, uno debajo del otro, en cadenas. Los conidios son globosos y unicelulares, con paredes externamente rugosas. Al principio uninucleadas, en muchas especies, por divisiones nucleares sucesivas, pronto se hacen multinucleados; sin embargo en la mayoría de las especies los conidios permanecen uninucleados.

Los conidios de los Aspergillus sp. se forman dentro del extremo del esterigma que en realidad es un tubo. En el extremo -

del esterigma, un tabique transversal delimita una porción del protoplasma con un núcleo. El protoplasto se redondea, segrega una pared propia dentro del esterigma tubular y desarrolla un conidio. La pared conidial puede fusionarse parcial o completamente con la pared del esterigma. Entre tanto, un segundo protoplasto debajo del primero se desarrolla para formar otra espora y empuja la primera espora hacia afuera, de modo que se forma una cadena de esporas a medida que el protoplasma del esterigma continúa creciendo y nuevos conidios se organizan uno debajo de otro.

No se ha descubierto el estado perfecto de la mayoría de los Aspergillus sp. y es muy posible que tales especies hayan perdido su capacidad de reproducción sexual. Esto parece ser lo más probable dado que los micólogos han hallado muestras evidentes de degeneración sexual aun en especies que forman ascas.

MEDIOS DE CULTIVO: Medios convencionales usados para hongos adicionados de antibióticos.

DIAGNOSTICO MICROLOGICO: El diagnóstico se basa en el hallazgo de fragmentos miceliales o de esporas por examen directo, y en la obtención de un cultivo que revela la presencia del conidióforo típico y de las cadenas de esporas. Como Aspergillus sp. crece rápidamente y actúa a menudo como contaminante, su desarrollo puede ocultar e inhibir por completo el crecimiento de algún hongo patógeno de crecimiento más lento que puede haber pasado inadvertido en el material clínico. Pueden utilizarse medios que contengan antibióticos como cloromicetina. Es necesario gran cautela antes de decidir que un aislado de Aspergillus sp. es el agente-

etiológico de una enfermedad pulmonar. Incluso cultivos positivos de esputo recogido en recipientes estériles y protegidos de contaminación por parte de esporas del aire no confirman el diagnóstico de aspergilosis de los pulmones ya que han podido penetrar durante el día por acción ciliar esporas aisladas en traquea y bronquios y aparecen en la muestra de esputo matutino.

El crecimiento del hongo en el conducto auditivo o en la vagina puede quedar restringido a la capa de epitelio escamoso - estratificado necrosado y en queratinización e inducir respuesta inflamatoria excesiva o nula.

En casos de aspergilosis de la órbita, los cortes de tejido revelan la presencia de células gigantes que contienen filamentos miceliales tabicados, así como elementos polimerfonucleares y macrófagos.

La inoculación por vía intravenosa al conejo común y al cobayo con una suspensión de material infeccioso de un cultivo en solución salina le produce la muerte en unos cuatro días, produciéndole una aspergilosis renal. En algunas especies se observa Aspergilosis hepática.

Para la intradermoreacción se prepara un antígeno con extracto de cultivo obtenido en medio de Raulin, que se muele, filtra y calienta a 60°C durante 20 minutos. Se inyecta 0.1 cc y los resultados se leen a las 48 horas.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL: No se puede formular diagnóstico de Aspergilosis bronquial o pulmonar sin demostraciones repetidas de

hifas ramificadas en el esputo.No es suficiente la sola identificación de esporas o el cultivo del hongo.En otras lesiones son necesarias biopsias y el hallazgo del organismo invadiendo los tejidos.Como a veces se observa aspergilosis pulmonar como infección secundaria en tuberculosis,bronquiectasias y carcinoma de los pulmones,deben descartarse estas enfermedades antes de considerarse la posibilidad de Aspergilosis pulmonar primaria.La infección simula muy de cerca tuberculosis y puede confundirse con micosis de otros tipos (7,21,22).

2. Cryptococcus neoformans

DIVISION: Mycota

SUBDIVISION: Euamycotina

CLASE-FORMA: Deuteromycota

ORDEN-FORMA: Moniliales

FAMILIA-FORMA: Cryptococcaceae

GENERO-FORMA: Cryptococcus

ESPECIE: Neoformans

AFECCION: Criptococosis

LOCALIZACION: Aparato respiratorio y nódulos en piel, pasa al sistema nervioso central, al líquido espinal, orina, fosas nasales, vagina.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA: Cosmopolita (7,12)

FORMAS EN ESTADO PARASITARIO: Se ven levaduras con gruesas cápsulas, en los esputos se ven acúmulos gelatinosos con cápsula de doble contorno, englobado en sustancia gelatinosa y refringente.

CULTIVO: Germina bien, a los siete días están desarrolladas las colonias blancas y algo amarillentas, húmedas, brillantes, elevadas de consistencia mucosa. Existen células proliferantes en gemación con un solo brote; en sus principios la cápsula no se observa y a los 20 días aparece la cápsula muy bien limitada, las colonias no están bien adheridas al medio y resbalan sobre éste.

REPRODUCCION: El hongo se reproduce tan solo por gemación.

MEDIOS DE CULTIVO: Deben cultivarse todos los materiales sobre - agar sangre y agar gelosa de sabouraud a temperatura ambiente, - puede añadirse cloromicetin al agar para evitar la presencia de bacterias en las muestras, pero no cicloheximida dada la sensibilidad a la misma.

Sobre Agar glucosa de Sabouraud a temperatura ambiente, el organismo crece con lentitud, produciendo colonias en forma de levadura. En las preparaciones microscópicas se comprueba la presencia del organismo y células en gemación con tubos cortos, lo que permite postular que el hongo trata de reproducirse en forma micelial. Sin embargo si se ha observado que el hongo se reproduce solo por gemación. En ésta etapa no se advierte cápsula, por cultivo continuado desarrolla una colonia típica húmeda, viscosa-mucosa de color pardo o crema.

En cuanto se observan células en gemación, se puede poner en evidencia la cápsula en preparaciones en tinta china. Se ha comprobado que en medios sintéticos, la tiamina constituye factor esencial de crecimiento (7).

C. neoformans no fermenta los azúcares, la capacidad para desarrollarse a 37°C, la asimilación positiva de glucosa, maltosa, sacarosa, y galactosa y negativa de lactosa y nitrato de potasio diferencian a C. neoformans de otras especies del género.

C. neoformans es el único miembro del género patógeno para el ratón. Debe inyectarse una suspensión salina (1:500) por volumen de células aglomeradas vía intraperitoneal (0.5 ml) o intracerebral (0.02 ml). En tres a cuatro semanas se observa la presencia del hongo encapsulado por examen directo (9).

DIAGNOSTICO MICOLOGICO: La aparición en los tejidos, esputo o exudado de organismos esféricos en gemación de paredes gruesas rodeadas por anchas cápsulas posee valor casi patognomónico de infección por C. neoformans, el cual difiere de otros hongos en su carácter ureasa positivo. En cultivo de esputo o piel, debe diferenciarse el hongo de los criptococos saprófitos por su capacidad para crecer a 37°C y mediante determinación de su patogenicidad para el ratón.

Se diferencia de otros hongos que producen células en forma de levadura y con yemas en los tejidos (Blastomyces dermatiti -- dis.) por su yema única, su cápsula ancha y su incapacidad para producir una colonia en forma de mohó a temperatura ambiente --- (22).

Como la criptococosis asienta con más frecuencia en el sistema nervioso central o meninges, es más importante el exámen del líquido cefalorraquídeo que el histológico. Sin embargo debe formularse el diagnóstico por métodos histológicos cuando se obtiene material de biopsia o se extirpa una masa intracranial.

Las lesiones de corta duración tienen a menudo consistencia gelatinosa debido a la enorme abundancia de material capsular -- producido por los organismos. C. neoformans es uno de los hongos más inertes, y puede existir durante largo tiempo en los tejidos sin provocar respuesta inflamatoria alguna.

Por otra parte, después de un período relativamente largo -- de residencia en los tejidos puede provocar una respuesta inflamatoria crónica, rica en células gigantes macrófagos y linfocitos

La fibrosis no es rara. Si bien se advierte a veces cierto grado de respuesta neutrófila, la criptococosis es esencialmente una infección no supurada. Puede producirse necrosis "caseosa", otro hallazgo en verdad raro, por la muerte de grandes masas de organismos.

Se ha demostrado la presencia de un tipo de hipersensibilidad retardada, utilizando como antígeno una vacuna destruida por el calor. Todas las infecciones más agudas, con meningitis -- y sin ella, dan reacciones negativas al mismo tipo de antígeno.

Se postuló que el exceso de polisacáridos capsulares impedía el desarrollo del tipo demorado característico de alergia. Se ha sugerido que el defecto radica en el antígeno. Se ha comprobado que un antígeno extraído de células criptocócicas enteras y muertas por éter o mercuriiodato contenía una gran cantidad de carbohidratos y no daba cutirreacciones demoradas en cobayos infectados con C. albicans o H. capsulatus. Este antígeno no se ha utilizado ampliamente en el hombre.

Por vía intraperitoneal al ratón, reproduce la enfermedad, vive dos semanas, hay lesiones en el peritoneo, mesenterio y sistema nervioso central; existen masas gelatinosas que contienen células con su cápsula. La inoculación intracerebral le produce la enfermedad y muerte en 5-10 días. La rata y el cobayo son mucho menos sensibles (9).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL: Las lesiones cutáneas, subcutáneas y --- glandulares suelen diagnosticarse por biopsia y cultivos sistemáticos. Estos últimos son necesarios en el diagnóstico diferencial con linfoblastoma. Las lesiones pulmonares deben diferenciarse de tuberculosis, de otros padecimientos no tuberculosos y de infecciones micóticas de los pulmones, especialmente actinomicosis -- del sistema nervioso central puede confundirse con meningitis -- tuberculosa, encefalitis, tumor cerebral, absceso del cerebro, -- Psicosis demencial, demencia parálitica, meningitis por Brucella sp. y otras micosis invasoras del sistema nervioso central como actinomicosis, blastomicosis, coccidioidomicosis, y candidiasis- (3,7,21,22).

3. Penicillium notatum

DIVISION: Mycota

SUBDIVISION: Eumycotina

CLASE: Ascomycetes

SUBCLASE: Eusacomycetidae

ORDEN: Eurotiales

FAMILIA: Gimnoascaceae

GENERO: Penicillium

ESPECIE: notatum

AFECCION: Contaminante de cultivos, rara vez causante de Penicilosis, se le ha asociado a procesos alérgicos (38).

LOCALIZACION: Aparato digestivo, fosas nasales, oídos y uñas (9)

DISTRIBUCION GEOGRAFICA: Cosmopolita (7,12)

FORMAS EN ESTADO PARASITARIO: Conidias en cadenas y esterigmas -- (3,9)

CULTIVO: Colonia pulverulenta aterciopelada, con gran cantidad de conidias e hifas con crecimiento aéreo.

REPRODUCCION: El micelio produce conidióforos simples, largos, -- erguidos, que se ramifican aproximadamente a dos tercios del extremo, en forma de escobillon característico, simétrico o asimétrico. La ramificación múltiple del conidióforo termina en un --- grupo de esterigmas, los cuales llevan largas cadenas conidiales

Los conidios son globosos y ovoides y bajo el microscopio -- parecen perlas de vidrio. Las enormes cantidades de conidios verdes azules o amarillos que se producen son responsables del -- característico color de la colonia.

Los conidios germinan facilmente en tubos germinativos de los cuales se desarrollan los micelios.

Nada sabemos acerca del estado perfecto o sexual de la mayor parte de las especies, pero se han hallado los cleistotecios de algunas especies, lo cual ha hecho posible formarse una idea clara del estado sexual de éstos hongos (3).

MEDIOS DE CULTIVO: Agar maltosa Sabouraud con cloromicetin (9).

DIAGNOSTICO MICOLOGICO: Se le ha asociado junto con Aspergillus sp., Cladosporium sp, Rhizopus sp, y Mucor sp, a procesos alérgicos. (38).

4. Sporothrix shenckii

DIVISION: Mycota

SUBDIVISION: Eumycotina

CLASE-FORMA: Deuteromycetes

FAMILIA-FORMA: Moniliaceae

GENERO: Sporothrix

ESPECIE: shenckii

AFECCION: Sporotricosis

DISTRIBUCION GEOGRAFICA: Cosmopolita (7,12).

FORMAS EN ESTADO PARASITARIO: Se ven cuerpos ovoides muy pequeños que son difíciles de descubrir y pequeñas células alargadas u ovoides en forma de cigarro (9).

CULTIVO: El desarrollo se observa de los 4 a 5 días; la colonia cremosa y levaduriforme es pequeña, de color blanco, después aumenta de tamaño, se hace húmeda, arrugada y con membrana radiada.

REPRODUCCION: La pigmentación de la colonia es de color negruzco marrón ó marrón-rojizo. Hay hifas delicadas y ramificadas con septos de dos micras, las hifas parten en ramas laterales y en éstas nacen los conidios, que son piriformes, ovoides o redondos; las esporas se agrupan en forma de racimos con un mango en la extremidad de la hifa.

A 37°C La colonia aparece blanda, de color crema a blanco y claramente levaduriforme. Microscópicamente, se observan células de levaduras con uno o múltiples brotes, esféricos, ovales ó-

en forma de cigarro; La conversión a la forma de levadura no es difícil, ocurriendo habitualmente 1-5 días después del traspaso del cultivo a un medio con sangre (21).

MEDIOS DE CULTIVO: Agar maltosa de Sabouraud con cloromicetina.

DIAGNOSTICO MICOLOGICO: El cultivo de los organismos es sin duda el mejor método para llegar al diagnóstico de esporotricosis.

Siempre que sea posible, procede obtener material de nódulos no rotos para evitar los contaminantes bacterianos que se encuentran en las lesiones abiertas. Pueden añadirse antibióticos al medio con objeto de impedir la contaminación bacteriana.

Es también factible la inyección, intraperitoneal de pus al ratón blanco o a las ratas pudiendo identificarse el hongo por examen directo del frotis y cultivos.

En el caso ordinario de esporotricosis, no puede identificarse fácilmente el organismo causal en los cortes de tejidos y el conocimiento cabal de este hecho posee suma importancia en el diagnóstico. Como la esporotricosis radica con más frecuencia en las extremidades superiores, en forma característica puede establecerse un diagnóstico clínico con certeza y corroborarlo por cultivo del hongo. Por otra parte, podría propiciar un diagnóstico clínico de la localización menos frecuente en las extremidades inferiores, ojo, o regiones periorbitales. Cuando las lesiones asientan en zonas menos características probablemente escaparía el diagnóstico al observador, debiendo entonces recurrir a la biopsia como primer método diagnóstico. Cuando el patólogo no reconoce la necesidad del cultivo, puede hacer un diagnóstico incorrecto.

La inoculación al cobayo y al ratón blanco, intraperitonealmente le produce lesiones, y en éstas se encuentran los elementos fusiformes aislados o englobados en células macrófagos, la inoculación en el testículo le produce orquitis encontrándose los mismos elementos.

La intradermoreacción se practica con un antígeno que recibe el nombre de esporotriquina se inyecta a 0.1 cc y la lectura se realiza de las 24-48 horas.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL: La forma linfática primaria de esporotricosis en presencia de lesiones posee una evolución tan característica que el diagnóstico es evidente. En los casos más complicados, cabe sospechar esporotricosis en presencia de lesiones --polimorfas múltiples que no corresponden a los métodos ordinarios de tratamiento. Los cultivos que deben obtenerse de lesiones no abiertas, brindan un método fácil de confirmación diagnóstica -- pueden reforzarse los datos que proporcionan los cultivos mediante aglutinación, pruebas cutáneas y de fijación de complemento.

Debe diferenciarse la esporotricosis de la sífilis, tuberculosis, lepra, coccidioidomicosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, tricofitosis de localización profunda y granulomas causados por drogas (7,38).

5. Trichophyton tonsurans

DIVISION: Mycota

SUBDIVISION: Eumycotina

CLASE-FORMA: Deuteromycetes

FAMILIA-FORMA: Moniliaceae

AFECCION: Tira tonsurante inflamatoria

LOCALIZACION: El cuero cabelludo solamente, nunca en piel.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA: Cosmopolita (7,12)

FORMAS EN ESTADO PARASITARIO: Los pelos contienen abundantes hifas tabicadas con artrosporas y en cadenas paralelas al eje del pelo.

CULTIVO: El cultivo es lento, la colonia se hace gigante lentamente, al principio como una masa hemisférica, después pulverulenta, puede o no haber crater central, se ven formas en clava adheridas al extremo delgado de las hifas, macroconidias con formas irregulares y de tamaño variado, microconidias en racimos o en cadenas de tipo piriforme (9).

REPRODUCCION: Mediante macroconidias de paredes delgadas con superficie lisa, forma en lápiz o fusiforme, divididas en 3-8 células y mediante microconidias numerosas que se ubican aisladamente a lo largo de hifas o en racimos (21).

MEDIOS DE CULTIVO: Agar maltosada de Sabouraud con cloromicetina- el color que desarrolla es blanco a ligeramente crema, pasa de éste color a canela, muy rara vez a violeta o permanece blanco.

Macroconidias irregulares en forma y tamaño de 28 X 10 micras --
y microconidias piriformes de 3-6 X 1-2 micras.

Para la inoculación experimental, se utiliza al cobayo el -
cual padece la infección como la especie humana.

DIAGNOSTICO MICOLOGICO: Se realiza mediante cultivo y observa---
ción macroscópica y microscópica de éste (22).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL: El diagnóstico es evidente cuando se --
advierten las lesiones, y la fluorescencia con luz de Wood. Pro--
cede considerar tiñas de la cabeza debido a otros hongos, por --
examen microscópico del pelo y por cultivo.

2) FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.

La micología (de la palabra griega mykes=hongo y logos=trata-
do) es el estudio de los hongos (3).

A las enfermedades causadas por hongos se les denomina micosis.

En 1956 González Ochoa propuso una clasificación de las micosis que se basa en la vía de entrada del hongo, en la afinidad que este tiene por el tegumento cutáneo y por la secuencia con que éste tejido es afectado (2,38).

Tipos de micosis:

1.- Micosis exclusivamente tegumentarias: Que comprenden dermatofitosis, pitiriasis versicolor, tiña palmaris, piedras. Solo afectan la piel, no atacan estructuras profundas, son contagiosas, muy frecuentes y fácilmente curables (38).

2.- Micosis inicialmente tegumentarias: Esporotricosis, micetomacromicosis, rinosporidiosis. No contagiosas, relativamente frecuentes, de muy difícil terapéutica, con excepción de la esporotricosis (38).

3.- Micosis secundariamente tegumentarias (micosis profundas): Histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, nocardiosis, actinomicosis, criptococosis, no son contagiosas, son poco frecuentes, sin tratamiento eficaz, con excepción de la actinomicosis (38).

4.- Micosis por hongos oportunistas: Candidosis, Geotricosis, Fico-micosis, aspergilosis, torulopsis. No contagiosas, son poco frecuentes, (excepto candidosis que es muy frecuente), en algunas de ellas el hongo es comensal en el huésped y se convierten en parásitos (oportunistas) cuando descienden por alguna causa sus defensas (especialmente la inmunidad celular) (38).

Caso puede observarse los hongos suelen encontrarse en todos los sitios anatómicos, de ahí la importancia de un tratamiento oportuno adecuado.

Según datos recopilados por González Ochoa (13) México tiene una situación desventajosa por lo que respecta a enfermedades por hongos, debido a tan variadas condiciones biogeográficas del país, se presentan prácticamente todas las enfermedades por hongos que han sido descritas en la literatura mundial (12).

De los datos notificados por el IMSS en los años (1975-84)- las tiñas ocupan el sexto lugar dentro de los 25 padecimientos - transmisibles más frecuentes en México (18) y dentro de las micosis más frecuentes se encuentran: Candidosis, Tiñas, siguiendo en importancia la Blastomycosis, el micetoma, y la esporotricosis, - (18,19) de ahí la importancia de elaborar medios que permitan un mejor diagnóstico de éstos padecimientos.

Dentro de la selección de las cepas utilizadas, para la formulación del medio de cultivo, se emplearon dos cepas que son de rápido crecimiento, que con frecuencia son contaminantes y -- que rara vez se asocian a padecimientos como Aspergillus niger y Penicillium notatum, se utilizaron también las cepas de Sporothrix shenkii (agente de micosis inicialmente tegumentaria) que tiene importancia epidemiológica en México, y Trichophyton tonsurans (agente de micosis exclusivamente tegumentaria) como representante de las tiñas que ocupan segundo lugar en cuanto a epidemiología micótica, por último se empleó la cepa de G. neoformans (micosis secundariamente tegumentaria) por carecer de representante de micosis profundas, de importancia dentro de los datos estadísticos como sería una cepa de Blastomyces der-----

metitidis (13,18,19).

Debido a que el pulque posee substancias nutritivas como --
vitaminas (tiamina, riboflavina, vit. C), aminoácidos (lisina, tripto-
fano, histidina, fenilalanina, leucina, metionina, valina, arginina),
proteínas, carbohidratos, substancias reductoras como por ejemplo:
ácido ascórbico, niacina, algunas sales minerales (calcio, fósfor,-
hierro) substancias que le dan sus propiedades características -
puede ser usado como medio de cultivo adecuado para hongos.

El empleo de éste medio de cultivo reduciría los costos de-
bido a que el pulque es un producto netamente mexicano y se en-
cuentra en abundancia en casi toda la República, a un precio re-
lativamente bajo (4,25).

3) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El laboratorio de microbiología es un lugar en el cual se puede efectuar el diagnóstico de enfermedades fúngicas. Un diagnóstico presuntivo puede a veces surgir de inmediato por observación microscópica de muestras infectadas (21).

Es importante seleccionar medios de cultivo adecuados para producir una óptima recuperación y llevar a cabo los procedimientos que permiten la identificación exacta de la especie aislada, (21).

Una vez aislado un hongo en cultivo puro, generalmente es posible identificarlo pero es indispensable cumplir ciertos pasos esenciales de recolección y manejo de muestras, especialmente de muestras naturalmente contaminadas con bacterias de crecimiento rápido y hongos no patógenos (24).

El diagnóstico micológico es importante y rutinariamente no se realiza en los laboratorios de microbiología. Los medios de cultivo pueden ser un inconveniente por lo que se pretende estructurar un medio de cultivo de fácil producción y adecuado para el desarrollo de este tipo de microorganismos.

4) OBJETIVOS

- 1.- Formular un medio de cultivo a base de pulque para el desarrollo de los hongos de interés médico.
- 2.- Disminuir la contaminación bacteriana en el aislamiento de los hongos de importancia médica.
- 3.- Realizar un estudio comparativo con cepas micológicas entre el medio formulado y los medios usuales.
- 4.- Disminuir los costos para el diagnóstico de infecciones micóticas.
- 5.- Probar con muestras clínicas, el medio formulado, usando los medios comerciales comparativamente, sacando de ello conclusiones acerca del crecimiento micológico.

5) HIPOTESIS

1.- Si el pulque proporciona la humedad y nutrientes necesarios para el desarrollo de hongos, se podrá utilizar para realizar un medio de cultivo para los mismos.

2.- Si se combinan adecuadamente sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano (antibióticos) en el medio se podrá obtener un mejor aislamiento y una menor contaminación en los cultivos micóticos.

6) MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de Aspergillus niger
- Cepa de Cryptococcus neoformans
- Cepa de Penicillium notatum
- Cepa de Sporothrix schenckii
- Cepa de Trichophyton tonsurans
- Cepa de Escherichia coli
- Cepa de Pseudomona aeruginosa
- Cepa de Staphylococcus aureus

EQUIPO

- Agitador mecánico para tubos de ensayo, Vortex/Genis modelo ---- K-550-G
- Balanza analítica METLER modelo N-80
- Balanza granataria Chau, modelo Florham Park
- Incubadora Mapas, modelo EC-334
- Microscopio American Optical, modelo One-Ten
- Potenciómetro
- Refrigerador Mabe, modelo Space line.

MATERIAL DE VIDRIO

- Cajas de petri 100 X 10 mm
- Cubreobjetos 22 X 22 mm
- Matraces erlenmeyer de 250,500,1000 ml
- Pipetas graduadas 1,2,5,10 ml
- Pipetas pasteur 9"
- portaobjetos 26 X 76 mm

- Probetas de vidrio 100,250 ml
- Tubos de ensayo 13 X 100,15 X 145, 15 X 165 mm
- varilla de vidrio
- vasos de precipitado 50,100,500,1000 ml.

COLORANTES

- azul de algodón Lactofenol
- cristal violeta No.292 Sigma
- Safranina No.450 Sigma

SOLVENTES

- Acetona Art.15853 Merck
- Agua destilada
- Alcohol etílico absoluto art. 15851 Merck
- Glicerol J.T.Baker 2136-60
- Pulque

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- A.E.D.T. (sal disódica $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) productos químicos - Monterrey.
- Bisulfito de sodio NaHSO_3 productos químicos Monterrey S.A.
- Cicloheximida
- Clozanfenicol
- Lauril sulfato de sodio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n \text{OSO}_3\text{Na}$ No.0483 Sigma
- Solución de ácido clorhídrico IN
- Solución de hidróxido de sodio IN.

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS	Art.No. BIXON
- Agar hierro y lisina	131-1
- Agar hierro triple azucar	114-1
- Agar citrato Simmons	216-1
- Agar dextrosa papa	119
- Agar dextrosa Sabouraud	107
- Agar Micobiotico	259
- Agar Micológico (Micofil)	247
- Agar Sal y Manitol	146-1
- Base de Agar Cetrimida	221-1
- Base de Agar Sangre	201-1
- Caldo urea	215-1
- Medio MIO	241-1
- Medio RM-VP	122-1

7) METODOLOGIA

La metodología utilizada comprende las siguientes etapas:

1. Soporte de crecimiento
2. Selectividad
3. Estabilidad
4. Reproducibilidad del medio con pulques de diversas fuentes.
5. Comparación del medio formulado con medios comerciales.
6. Prueba del medio con muestras clínicas.

La parte experimental fué realizada por ensayo y error.

Cabe mencionar que los medios expresados en el presente trabajo escrito son un resumen de lo realizado en la parte experimental.

1. PRIMERA ETAPA: Formulación del soporte de crecimiento.

Se desarrollaron los primeros ensayos para la obtención de un soporte de crecimiento. La preparación de los medios es como sigue:

Se procede a ajustar el pulque con hidróxido de sodio IN -- hasta pH 6, posteriormente se disuelven en la base del pulque correspondiente las sustancias participantes, calentando a ebullición 1 minuto; por último se vierte en tubos de ensayo (10 ml en cada tubo), se esteriliza en autoclave 15 lbs X 15 minutos se sacan de la autoclave y se colocan en plano inclinado, una vez solidificados y pasada la prueba de esterilidad que consiste en -- mantener los medios de cultivo en una estufa a 37°C X 24 hrs se procede a sembrar las cepas.

El primer ensayo consiste en la selección del pH óptimo de crecimiento y la cantidad de agar necesario para la obtención de una consistencia aceptable en el medio, en dichos medios se inocu- laron cepas de hongos.

TABLA 1.- Consistencia del medio.

medio	1	2	3	
pulque	100	100	100	ml
pH	5	5	5	
agar	0.5	1.0	1.5	g/dl

TABLA 2.- Consistencia del medio.

medio	4	5	6	
pulque	100	100	100	ml
pH	6	6	6	
agar	0.5	1.0	1.5	g/dl

TABLA 3.- Consistencia del medio.

medio	7	8	9	
pulque	100	100	100	ml
pH	7	7	7	
agar	0.5	1.0	1.5	g/dl

En los medios (1-9) se procedió a sembrar las cepas de hongos -- para observar su crecimiento, las observaciones de crecimiento -- se hicieron a los 8 días posteriores a la inoculación del medio.

Como segundo ensayo en la primera etapa se procedió a enriquecer al medio de cultivo adicionando peptona y a pH 6,7 utilizando como blanco medio preparado con agua.

TABLA 4.- Variación de peptona, concentración de agar = 1.5 g/dl.

medio	10	11	12	13	14	15	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	0.5	0.5	1.0	1.0	1.5	1.5	g/dl

TABLA 5.- Variación de peptona, concentración de agar = 1.5 g/dl

medio	16	17	18	19	20	21	
pulque a pH=7	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	0.5	0.5	1.0	1.0	1.5	1.5	g/dl

Debido a que los hongos suelen usar como nutrientes carbohidratos se procedió a utilizar dextrosa para enriquecer el medio variando sus concentraciones con el fin de encontrar la más adecuada.

TABLA 6.- Variación de dextrosa, concentración de agar = 1.5 g/dl

medio	22	23	24	25	26	27	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	1.0	1.0	1.5	1.5	g/dl

TABLA 6.- Variación de dextrosa, concentración de agar = 1.5 g/dl

medio	28	29	30	31	32	33	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
dextrosa	2.0	2.0	2.5	2.5	3.0	3.0	g/dl

TABLA 7.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.0g/dl

medio	34	35	36	37	38	39	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	---	---	1.0	1.0	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	---	---	---	---	0.5	0.5	g/dl

TABLA 7.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.0g/dl
(continuación).

medio	40	41	42	43	44	45	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml

ager	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0	g/dl

TABLA 8.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.5 g/dl

medio	46	47	48	49	50	51	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
ager	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	---	---	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
dextrosa	---	---	---	---	0.5	0.5	g/dl

TABLA 8.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.5 g/dl

medio	52	53	54	55	56	57	
pulque a pH=6	---	100	---	100	---	100	ml
agua	100	---	100	---	100	---	ml
ager	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
dextrosa	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0	g/dl

2. SEGUNDA ETAPA: Selectividad del medio

Se procedió a utilizar diversas sustancias inhibidoras de desarrollo bacteriano, las lecturas se realizaron a los ocho días posteriores a la inoculación. Desde ésta etapa en adelante se incluyeron cepas bacterianas, para control de E. coli se realizaron pruebas bioquímicas, para P. aeruginosa pruebas bioquímicas, cata-

lase, oxidasa, difusión de pigmento verde en agar cetrinida, para S. aureus la prueba de coagulasa, catalasa, y manitol desde los medios 58-62.

TABLA 9.- Adición de Lauril Sulfato de sodio. Concentración de dextrosa = 0.5 g/dl

medio	58	59	60	61	62	63	
LSS	---	0.01	0.02	0.025	0.05	0.10	g/dl
pulque a pH=6	100	100	100	100	100	100	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	g/dl

TABLA 10.- Variación de E.D.T.A

medio	64	65	66	67	68	69	
E.D.T.A.	---	.005	.010	.025	.05	.10	g/dl
pulque a pH=6	100	100	100	100	100	100	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	g/dl

TABLA 10.- Variación de E.D.T.A. (Continuación).

medio	70	71	
E.D.T.A.	.15	.20	g/dl
pulque a pH=6	100	100	ml
agar	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	g/dl

TABLA 11.- Variación de bisulfito de sodio

medio	72	73	74	75	76	
bisulfito de sodio	---	0.05	0.1	0.15	0.2	g/dl
pulque a pH=6	100	100	100	100	100	ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	g/dl

TABLA 12.- Adición de antibióticos

medio	77	78	79	80	81	82
					D.S	M.B.
Cicloheximida	---	0.5	---	0.5		g/ 1
Cloranfenicol	---	---	0.5	0.5		g/ 1
pulque a pH=6	100	100	100	100		ml
agar	1.5	1.5	1.5	1.5		g/dl
peptona	1.0	1.0	1.0	1.0		g/dl
dextrosa	0.5	0.5	0.5	0.5		g/dl

D.S.- Dextrosa Sabouraud

M.B. Micobiotico

En ésta etapa se hicieron microcultivos de los medios 77,78,79---80,81,82, para las cepas de hongos, y las correspondientes pruebas ya mencionadas para las cepas bacterianas.

3. TERCERA ETAPA: Estabilidad del medio formulado.

Se colocó un lote de 64 tubos con 10 ml c/u de medio, 32 tubos con antibiótico y 32 sin antibiótico, de la siguiente formulación.

medio	sin antibiótico	con antibiótico	
cicloheximida	---	0.05	g/l
cloranfenicol	---	0.05	g/l
pulque a pH=6	100	100	ml
agar	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	g/dl

Se mantuvieron a 4°C y en bolsas de polietileno, después --- de haber pasado la prueba de esterilidad de 24 horas a 37°C, se -- inoculó a diferentes periodos a lo largo de dos meses, los perio-- dos de siembra fueron cada 15 días, 8 medios con antibióticos y - 8 sin antibióticos, las lecturas de los resultados fueron a los - 8 y 16 días después de la inoculación. Las cepas inoculadas fueron

- Aspergillus niger
- Criptococcus neoformans
- Penicillium notatum
- Sporothrix shenckii
- Trichophyton tonsurans
- Escherichia coli
- Pseudomonas aeruginosa
- Staphylococcus aureus

En ésta etapa se hicieron observaciones microscópicas con -- algodón-azul de lactofenol.

4. CUARTA ETAPA: Reproducibilidad del medio con pulque de diversas fuentes.

Los medios formulados estan constituidos por:

medio	con antibiótico	sin antibiótico	
cicloheximida	0.05	---	g/l
cloranfenicol	0.05	---	g/l
pulque a pH=6	100	100	ml
agar	1.5	1.5	g/dl
peptona	1.0	1.0	g/dl
dextrosa	0.5	0.5	g/dl

Se elaboraron 6 veces con pulque obtenido de diversas fuentes; Tláhuac, Benito Juárez, Ixtapalepa, Texcoco y se inocularon -- las cepas ya mencionadas en la tercera etapa en las mismas condiciones, temperatura ambiente y tomando ocho días de incubación posteriores a la siembra como primer período de lectura y 16 como segundo período.

En ésta etapa se hicieron observaciones directas de los --- cultivos observandose la misma morfología microscópica en los--- diversos pulques la cual fué igual que la encontrada en Dextrosa Sabouraud (medio 81) y micobiotic (medio 82) en la tabla 12 de--- la segunda etapa de formulación, e igual también con lo reportado en la bibliografía, (3,9,21).

5. QUINTA ETAPA: Comparación del medio formulado con medios comerciales.

El medio de cultivo formulado descrito en la cuarta etapa -- tanto con antibiótico como sin antibiótico se comparó con los -- siguientes medios de cultivo comerciales: Agar dextrosa Sabou---raud, agar micológico (Micofil), agar micobiotico (Micobiotic), a--ger patata glucosa; para observar ventajas y desventajas.

Esta etapa se realizó 4 veces tomando lecturas a los ocho-- y dieciséis días. Se realizaron pruebas de control a las cepas -- bacterianas y observación directa a la morfología microscópica - de las cepas de hongos para corroborar que coincidieran con las-- ya conocidas bibliográficamente (3,9,21).

6. SEXTA ETAPA: Prueba del medio con muestras clínicas.

El medio se preparó adicionando los ingredientes al pulque-- el cual se ajustó primero a pH 6, se lleva a ebullición y se vier-- te en tubos de ensayo 10 ml en cada tubo y se esterilizan 15 mi--nutos a 15 libras, se sacan y en caliente se agitan en un vor---tex y se inclinan para que solidifiquen, una vez solidificados - se someten a prueba de esterilidad a 37°C X 24 horas, se sacan y-- guardan en bolsas de polietileno a 4°C, hasta el momento de su -- uso, las muestras clínicas se tomaron de diferentes sitios anató--micos, se sembraron en los medios con y sin antibióticos, y en -- los dos controles que fueron agar dextrosa Sabouraud y Micobio--tic, se incubaron a la misma temperatura y se tomaron lecturas a-- los 8 y 16 días posteriores al muestreo, junto con la siembra de-- la muestra se procedió a realizar observaciones directas con ---

KOH 25% de las muestras clínicas y observaciones directas con---
algodón azul de lactofenol y técnica de cinta adhesiva para ob--
servar la morfología microscópica de los hongos que desarrolla--
ron en los medios.

8) RESULTADOS

Claves usadas en la consistencia de los medios.

l = líquido

v = viscoso

ss = semisólido

s = sólido

d = duro

Claves de crecimiento

- negativo

± escaso desarrollo

⊕ moderado desarrollo

⊕⊕ buen desarrollo

⊕⊕⊕ excelente desarrollo

1. PRIMERA ETAPA: Formulación del soporte de crecimiento

TABLA 1.- Consistencia del medio

medio	1(l)	2(v)	3(ss)
<u>A.niger</u>	-	-	-
<u>C.neoformans</u>	-	-	-
<u>E.notatum</u>	-	-	-
<u>S.shanckii</u>	-	-	-
<u>I.tenureans</u>	-	-	-

TABLA 2.- Consistencia del medio

medio	4(v)	5(s)	6(s)
<u>A.niger</u>	-	-	±
<u>C.neoformans</u>	-	-	-
<u>P.notatum</u>	-	±	±
<u>S.shenckii</u>	-	-	-
<u>I.tenurans</u>	-	-	-

TABLA 3.- Consistencia del medio

medio	7(s)	8(s)	9(s)
<u>A.niger</u>	±	±	±
<u>C.neoformans</u>	-	-	-
<u>P.notatum</u>	±	±	±
<u>S.shenckii</u>	-	-	-
<u>I.tenurans</u>	-	-	-

TABLA 4.- Variación de peptone, concentración de agar=1.5 g/dl --
pH = 6 .

medio	10	11	12	13	14	15
<u>A.niger</u>	±	++	±	++	+	+++
<u>C.neoformans</u>	±	++	+	++	++	++
<u>P.notatum</u>	±	+++	+	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	±	++	+	++	++	++
<u>I.tenurans</u>	±	++	+	++	++	++

TABLA 5.- Variación de peptona, concentración de agar= 1.5g/dl.

medio	16	17	18	19	20	21
<u>A.niger</u>	+	-	++	++	+++	+++
<u>C.neoformans</u>	+	+	++	++	+++	+++
<u>P.notatum</u>	+	+	++	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	++	++	+++	+++	+++	+++
<u>I.tenurens</u>	++	++	+++	+++	+++	+++

TABLA 6.- Variación de dextrosa, concentración de agar =1.5 g/dl.

medio	22	23	24	25	26	27
<u>A.niger</u>	+	++	+	++	+	+++
<u>C.neoformans</u>	+	+	+	++	+	+++
<u>P.notatum</u>	+	++	+	++	+	++
<u>S.shenckii</u>	+	++	+	++	+	+++
<u>I.tenurens</u>	+	+	+	+	++	++

TABLA 6.- Variación de dextrosa, concentración de agar =1.5 g/dl-
pH= 6 (continuación).

medio	28	29	30	31	32	33
<u>A.niger</u>	+	+++	++	+++	+++	+++
<u>C.neoformans</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>P.notatum</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	+	+++	+	+++	+	+++
<u>I.tenurens</u>	++	+++	++	+++	++	+++

TABLA 7.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.0g/dl

medio	34	35	36	37	38	39
<u>A.niger</u>	±	±	±	+++	++	+++
<u>C.neoformans</u>	±	+	+	++	++	+++
<u>P.notatum</u>	-	±	++	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	-	±	±	+++	++	+++
<u>I.tenurens</u>	±	+	+	++	++	+++

TABLA 7.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.0g/dl
(Continuación)

medio	40	41	42	43	44	45
<u>A.niger</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>C.neoformans</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>P.notatum</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>I.tenurens</u>	++	+++	++	+++	++	+++

TABLA 8.- Variación de dextrosa, concentración de peptona=1.5g/dl

medio	46	47	48	49	50	51
<u>A.niger</u>	±	±	±	+++	+	+++
<u>C.neoformans</u>	±	+	++	++	++	+++
<u>P.notatum</u>	-	±	++	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	-	±	±	+++	+	+++
<u>I.tenurens</u>	±	+	+	++	++	+++

TABLA 8.- Variación de dextrosa, concentración de peptona 1.5 g/dl (Continuación).

medio	52	53	54	55	56	57
<u>A.niger</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>C.neoformans</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>P.notatum</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>S.shenckii</u>	++	+++	++	+++	++	+++
<u>I.tonarens</u>	++	+++	++	+++	++	+++

2. SEGUNDA ETAPA: Selectividad del medio.

Los resultados de ésta etapa fueron tomados a los ocho días posteriores a la inoculación de los medios.

De los medios 58-76 el control de las cepas micológicas se realizó mediante observación directa con algodón-azul de lactofenol y técnica de cinta adhesiva, corroborando así la morfología microscópica, como control de las cepas bacterianas se realizaron las pruebas ya mencionadas en la segunda etapa de la metodología.

TABLA 9.- Adición de Lauril sulfato de sodio, concentración de dextrosa = 0.5 g/dl.

medio	58	59	60	61	62	63
<u>A.niger</u>	+++	+++	+++	+++	++	±
<u>C.neoformans</u>	+++	++	++	++	±	-
<u>P.notatum</u>	+++	+++	++	++	±	+
<u>S.shenckii</u>	+++	++	++	++	±	±

<u>I. tonsurens</u>	+++	++	+	-	-
<u>E. coli</u>	+++	+++	+++	+++	+++
<u>P. aeruginosa</u>	+++	+++	+++	+++	+++
<u>S. aureus</u>	+++	++	±	-	-

TABLA 10.- Variación de E.D.T.A.

medio	64	65	66	67	68	69
<u>A. niger</u>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>C. neoformans</u>	+++	+++	+++	+++	+++	++
<u>P. notatum</u>	+++	+++	+++	+++	+++	++
<u>S. shenckii</u>	+++	+++	+++	+++	+++	++
<u>I. tonsurens</u>	+++	+++	+++	+++	+++	++
<u>E. coli</u>	+++	+++	++	+++	+++	+
<u>P. aeruginosa</u>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>S. aureus</u>	+++	+++	+++	+++	+++	++

TABLA 10.- Variación de E.D.T.A (continuación)

medio	70	71
<u>A. niger</u>	+++	+++
<u>C. neoformans</u>	+++	++
<u>P. notatum</u>	++	+
<u>S. shenckii</u>	++	+
<u>I. tonsurens</u>	++	++
<u>E. coli</u>	+	±
<u>P. aeruginosa</u>	+++	++
<u>S. aureus</u>	++	+

TABLA 11.- Variación de bisulfito de sodio

medio	72	73	74	75	76
<u>A.niger</u>	+++	+	+	+	±
<u>C.neoformans</u>	+++	++	+	±	-
<u>P.notatum</u>	+++	-	-	-	-
<u>S.shenckii</u>	+++	-	-	-	-
<u>I.tenurana</u>	+++	-	-	-	-
<u>E.coli</u>	+++	±	-	-	-
<u>P.aeruginosa</u>	+++	++	++	++	++
<u>S.aureus</u>	+++	±	±	±	-

TABLA 12.- Adición de Antibióticos.

medio	77	78	79	80	81	82
<u>A.niger</u>	+++	++	+++	+	+++	++
<u>C.neoformans</u>	+++	+	+++	-	+++	++
<u>P.notatum</u>	+++	+	+++	-	+++	+++
<u>S.shenckii</u>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>I.tenurana</u>	+++	+++	+	+	+++	+++
<u>E.coli</u>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>P.aeruginosa</u>	+++	+++	+	+	+++	+++
<u>S.aureus</u>	+++	+++	++	++	+++	+++

Los microcultivos realizados a las cepas de hongos de los medios 77,78,79,80,81,82 presentaron la misma morfología microscópica.

3. TERCERA ETAPA: Estabilidad del medio formulado.

	medio con antibiótico	sin antibiótico
<u>A.niger</u>	+	+++
<u>C.neoformans</u>	-	+++
<u>P.notatum</u>	-	+++
<u>S.shenckii</u>	+++	+++
<u>I.tenaxans</u>	+	+++
<u>E.coli</u>	+++	+++
<u>P.aspergillus</u>	+	+++
<u>S.aureus</u>	++	+++

Los resultados obtenidos fueron los mismos en cada uno de los periodos de siembra y lectura durante el tiempo requerido en esta etapa.

Las observaciones microscópicas directas no presentaron variaciones entre ellas, ni tampoco con lo reportado en la bibliografía (3,9,21).

4. CUARTA ETAPA: Reproducibilidad del medio con pulques diferentes.

medio	con antibiótico	sin antibiótico
<u>A.niger</u>	+	+++
<u>C.neoformans</u>	-	+++
<u>P.notatum</u>	-	+++
<u>S.shenckii</u>	+++	+++
<u>I.tenaxans</u>	+	+++
<u>E.coli</u>	+++	+++
<u>P.seruginea</u>	+	+++
<u>S.aureus</u>	++	+++

Los resultados fueron los mismos tanto para los medios con antibióticos como sin antibiótico para los pulques de Tláhuac,-- Benito Juárez, Iztapalapa, Texcoco y para las seis veces que se-- realizó cada uno, las observaciones microscópicas directas de -- las cepas de hongos no presentaron variaciones entre ellas ni -- con la reportada en la bibliografía (3,9,21).

5. QUINTA ETAPA: Comparación del medio formulado con comerciales

	con antibiótico	sin antibiótico
<u>A.niger</u>	+	+++
<u>C.neoformans</u>	-	+++
<u>P.notatum</u>	-	+++
<u>S.shenckii</u>	+++	+++
<u>I.tenurens</u>	+	+++
<u>E.coli</u>	+++	+++
<u>P.aspergillus</u>	+	+++
<u>S.aureus</u>	++	+++

MEDIO	Agar Dextrosa Sabouraud	Micofil	Micobiotic	Agar Patata Dextrosa
<u>A.niger</u>	+++	+++	++	+++
<u>C.neoformans</u>	+++	+++	++	+++
<u>P.notatum</u>	+++	+++	+++	+++
<u>S.shenckii</u>	+++	+++	+++	+++
<u>I.tenurens</u>	+++	+++	+++	+++
<u>E.coli</u>	+++	+++	+++	+++
<u>P.aspergillus</u>	++	++	+++	+++
<u>S.aureus</u>	+++	+++	+++	+++

Se realizaron en esta etapa pruebas de control a las copas bacterianas, las indicadas en la segunda etapa de la metodología coincidiendo con las esperadas, las copas de hongos fueron observadas por examen microscópico directo coincidiendo en todos los medios y con lo señalado en la bibliografía (3,9,21).

6. SEXTA ETAPA: Prueba del medio con muestras clínicas.

número	sitio de aislamiento	diagnóstico clínico	Observación directa
1	manos	T.corporis	filamentos
2	boca	candidosis	pseudofilamentos
3	pierna	esporotricosis	-----
4	ingle	tiña	pseudofilamentos
5	pie izquierdo	micetoma	grano tipo Nocardia
6	pene	candidosis	pseudofilamentos
7	uña	candidosis	pseudofilamentos
8	boca	candidosis	pseudofilamentos
9	pierna	esporotricosis	-----
10	brazo	esporotricosis	-----
11	cuello	tiña	filamentos
12	paladar	candidosis	pseudofilamentos
13	garganta	candidosis	pseudofilamentos
14	expectoración	candidosis	-----
15	vaginal	levaduras	levaduras
16	expectoración	-----	-----
17	vaginal	-----	levaduras
18	vaginal	-----	levaduras
19	urocultivo	-----	levaduras
20	urocultivo	-----	levaduras
21	expectoración	-----	levaduras
22	expectoración	-----	levaduras
23	expectoración	-----	levaduras
24	expectoración	-----	levaduras
25	lavado bronquial	-----	levaduras
26	expectoración	-----	-----
27	vaginal	-----	levaduras
28	urocultivo	-----	levaduras
29	lavado bronquial	-----	pseudofilamentos
30	uña	candidosis	pseudofilamentos
31	cido	-----	-----

(Continuación)

número	pulque sin antibiótico	pulque con antibiótico	DS	MB	Diagnóstico de laboratorio
1	sc	sc	sc	sc	negativo
2	++	+	++	++	<u>Candida sp.</u>
3	++	+	++	++	<u>S.shenckii</u>
4	-	-	-	-	- - - - -
5	+	-	+	+	<u>Nocardia sp</u>
6	+++	++	+++	++	<u>Candida sp</u>
7	+++	++	+++	++	<u>Candida sp</u>
8	+++	++	+++	++	<u>Candida sp</u>
9	++	++	++	-	<u>S.shenckii</u>
10	++	++	++	+	<u>S.shenckii</u>
11	+	+	+	+	<u>I.tonsurans</u>
12	++	++	++	++	<u>Candida sp.</u>
13	++	++	++	++	<u>Candida sp.</u>
14	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
15	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
16	+	+	+	+	<u>C.albicans</u>
17	+	+	++	+	<u>C.albicans</u>
18	++	++	++	++	<u>C.albicans</u>
19	++	++	++	++	<u>C.albicans</u>
20	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
21	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
22	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
23	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
24	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
25	+	-	++	++	<u>C.albicans</u>
26	+	+	+	+	<u>C.albicans</u>
27	++	-	++	++	<u>C.albicans</u>
28	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
29	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
30	++	+	++	++	<u>C.albicans</u>
31	++	+	++	++	<u>A.niger</u>

• DS = Dextrose Sabouraud

• MB = Micobiotic

sc = sin crecimiento

9) ANALISIS DE COSTOS

- Precios al 17 de Enero de 1989

Medios Bioxon	Precio por fresco al manudeo	contenido	gramos para preparar un litro	precio por litro de medio pre- parado
<u>Agar Bacterio</u>				
lógico	\$152,510.00	450 g	-----	-----
Dextrosa	\$ 22,066.00	450 g	-----	-----
Peptona de				
caseína	\$ 59,761.00	300 g	-----	-----
<u>Agar Maltosa</u>				
Sabouraud	\$123,136.00	450 g	65 g	\$17,786.00
Agar Micobiotic	\$157,268.00	450 g	36 g	\$12,581.00
Agar Micofil	\$ 94,621.00	450 g	36 g	\$ 7,569.00
<u>Agar Dextrosa</u>				
Sabouraud	\$ 74,806.00	450 g	65 g	\$10,905.31
Agar Dextrosa				
y Papa	\$101,128.00	450 g	39 g	\$ 9,764.42
Hidróxido de				
sodio	\$ 1,200.00	100 g	-----	-----

Costos del medio elaborado tomando precios de menudeo para el valor de los componentes.

	cantidad	medio con antibiótico	sin antibiótico
pulque	1000 ml	\$ 500.00	\$ 500.00
agar	15 g/l	\$ 5083.00	\$ 5083.00
peptona	10 g/l	\$ 1992.00	\$ 1992.00
dextrosa	5 g/l	\$ 245.00	\$ 245.00
hidróxi- do de			
sodio	2 g/l	\$ 96.00	\$ 96.00
Ciclo- heximida	.05 g/l	\$ 53.30	-----
Cleran- fenicol	.05 g/l	\$ 28.75	-----

Precio por litro de medio elaborado

con antibiótico \$ 7,998.00

sin antibiótico \$ 7,916.00

*
\$ = pesos mexicanos

10) ANALISIS DE RESULTADOS

En la primera etapa se realizaron ensayos para obtener un soporte de crecimiento, se procedió a hacer variaciones de pH y de concentración de agar. Al inocular las cepas en los medios se observó que el crecimiento era nulo en la mayoría de los medios y solo en algunos casos en los que la consistencia del medio era sólida, se obtuvo crecimiento, una consistencia aceptable se obtuvo con un pH mínimo de 6 y una concentración mínima de agar de 1.5 g/dl.

Se procedió también dentro de esta etapa a enriquecer el medio de cultivo adicionando peptona de caseína como fuente de proteínas y aminoácidos (medios 10-21) obteniéndose los mejores crecimientos desde que la concentración de peptona fué de 1.0 g/dl y la de agar 1.5 g/dl, utilizando pulque como base tanto a pH 6 como 7.

Se utilizaron cepas de contaminantes y patógenos como dermatofitos, un hongo de micosis inicialmente tegumentaria y uno de secundariamente tegumentaria.

En ésta etapa pudo observarse que Penicillium notatum y Aspergillus niger no son tan exigentes como Trichophyton tonsurans y Sporothrix shenckii.

Se adicionó dextrose como nutriente y se observó que el crecimiento de todas las cepas mejoraba desde 0.5 g/dl de dextrosa, se continuo entonces con la búsqueda de la mejor relación dextrosa-peptona para establecer en la formulación la concentración de ambos componentes, observándose desde una concentración mínima de

1.0 g/dl y de dextrosa 0.5 g/dl los mejores desarrollos por lo--- que se establecieron las siguientes cantidades en la formulación.

El medio base obtenido hasta la primera etapa fué:

Dextrosa	0.5 g/dl
Peptona	1.0 g/dl
agar	1.5 g/dl
pulque a pH=6	100 ml

En la segunda etapa se comenzó a trabajar con bacterias ya-- que éstos microorganismos por lo general acompañan a las muestras micológicas como contaminantes.

Debido a que las bacterias utilizadas también presentaron -- buenos crecimientos en dicho medio, se procedió a buscar inhibido-- res para ellas.

El primer inhibidor usado fué el lauril sulfato de sodio --- (medios 58-63) a concentraciones bajas no se observó inhibición - de ningún microorganismo. En cuanto se aumentó la concentración de este inhibidor Staphylococcus aureus se inhibió completamente, --- Escherichia coli solo se inhibía escasamente pero también Tricho-- phyton tonsurans se inhibía por lo que se probó otro inhibidor-- que fué el E.D.T.A (medios 64-71), a bajas concentraciones no fun-- cionó como inhibidor, al aumentar la concentración ningún hongo-- se vió afectado y solo se inhibió muy escasamente Escherichia -- coli (medio 71) por lo que se descartó como inhibidor.

Se añadió bisulfito de sodio al medio (medios 72-76), se --- observó que a la concentración de 0.1 g/dl inhibía a Escherichia coli no inhibía a Pseudomonas aeruginosa e inhibía escasamente -- a Staphylococcus aureus, pero también se observó que desde la -- concentración de 0.05 g/dl, Penicillium notatum, Sporothrix shen-- skii y Trichophyton tonsurans se veían inhibidos.

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Se llegó entonces a la adición de antibióticos como inhibidores bacterianos utilizándose cicloheximida 0.05 g/l y cloranfenicol-- 0.05 g/l (medios 72-82), se pudo observar el crecimiento en dicho medio el cual fué bueno para los hongos aunque se observó desarrollo de Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa, resultados que también fueron observados en los medios comerciales Micofil y -- Micobiotic (81-82).

Para el caso de Penicillium notatum la difusión del pigmento amarillo-verde en el medio de pulque sin antibióticos y del que -- contenía antibióticos es equiparable con el observado en los medios comerciales, la morfología microscópica de los hongos tampoco presentó variación comparada con los medios comerciales, por -- lo que el medio puede ser utilizado para montar microcultivos.

En cuanto a las muestras clínicas probadas pudo observarse -- que en muchos de los casos el desarrollo era similar tanto en los medios de pulque, pulque con antibiótico, dextrosa Sabouraud y -- Micobiotic, y para muchas de las muestras era mejor el medio de -- pulque que el de pulque con antibióticos, ya que éste último inhibía el crecimiento de la colonia, sobre todo en el caso de las -- tífias, o retrasaba demasiado el crecimiento. Para todos los me---- dios incluso los comerciales el crecimiento de los hongos era mucho más lento que cuando se trabajaba con cepas previamente ais-- ladas y en muchas ocasiones tanto en los medios de pulque como en los comerciales crecían bacterias que comunmente se hayan en piel asociadas a cultivos de hongos.

Para el análisis de costos, el medio con antibióticos resultó --- más caro que el que carecía de ellos, sin embargo resulta ligeramente más bajo el costo de éste comparado con el agar Micobiotic- el cual también contiene antibióticos.

Por otra parte el medio sin antibióticos resultó más bajo en precio que el agar Maltosa Sabouraud, Dextrosa Sabouraud y Dextro- sa y Papa y también Micobiotic.

Amos medios formulados en el presente trabajo no abatieron en costos al micofil que es el de más bajo costo en el mercado.

No obstante hay que considerar que en los medios formulados- el costo de las materias integrantes fué por separado y al menu- deo, siendo que los precios al menudeo también, de los medios co- merciales engloban sus componentes adquiridos al mayoreo, Habría - que hacer en caso de desear prepararlo a escala comercial, la re- visión de costos, proveedores a éste nivel, así como también in- cluir los gastos en la producción.

11) CONCLUSIONES

El medio de pulque formulado esta constituido como sigue:

agar	1.5 g/dl
peptona de	
caseina	1.0 g/dl
pulque a pH=6	100 ml
dextrosa	0.5 g/dl

El medio de pulque adicionado con antibióticos esta constituido como sigue:

agar	1.5 g/dl
peptona de	
caseina	1.0 g/dl
pulque a pH=6	100 ml
dextrosa	0.5 g/dl
Cicloheximida	0.05g/l
Cloranfenicol	0.05g/l

Los medios de cultivo para hongos no son empleados con mucha frecuencia en laboratorios clínicos, el costo de éstos puede ser reducido considerablemente con la formulación dado que es económica y de fácil preparación.

En el desarrollo de las colonias, la morfología macroscópica no cambia, tampoco el color del pigmento difundible, ni la morfología microscópica. Por lo que puede ser usado para el aislamiento y para el montaje de preparaciones semipermanentes o permanentes.

El hecho de que ninguno de los inhibidores probados haya sido empleado en la formulación es porque no mejoró mucho la inhibición de microorganismos asociados a piel, comparandose con los medios comerciales. Tampoco fué posible el uso de colorantes como-

inhibidores ya que estos modificaban el color del pigmento difundible así como el color del reverso de la colonia, importantes en la clasificación de muchos géneros.

La adición de antibióticos al medio sirvió para disminuir la flora bacteriana asociada en piel, sin embargo no ayudó en mucho - al desarrollo de las colonias aisladas a partir de muestras clínicas, comparando en el medio que carecía de antibióticos, ambos medios, con y sin antibióticos usando pulque como base dan los mismos resultados que los medios comerciales.

Amos medios formulados resultaron más bajos en precio que los medios más usuales en el laboratorio micológico como el agar Maltosa Sabouraud, Dextrosa Sabouraud, PDA, sin embargo no logré abatir el precio del agar Micofil que es el de más bajo costo.

PROPUESTAS:

- Se sugiere que se hagan más pruebas con muestras clínicas en -- ambos medios con y sin antibióticos, y que se investigue más ---- acerca de las necesidades nutricionales de éstos microorganismos.
- Por otra parte, si el medio se quisiera llevar a escala indus -- trial sería conveniente hacer un análisis de mercados, en cuanto -- a componentes incluidos en la formulación, e incluir los costos -- de producción para poder hacer un análisis más preciso.

12) BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed & Blose (1983); Delayed-Type Hypersensitivity skin--testing. Arch. Dermatol. 119; 934-945.
2. Alba Flores José: Manual de Micología Médica. Lab de Micología, Depto. de Micología ENCB-IPN.
3. Alexopolus C.J. (1979); Introducción a la Micología, Manuales Eudeba. Argentina.
4. Baquet F. (1967); aspectos científicos actuales del pulque--en México, Tesis del Instituto de Biología; 20-32.
5. Bille Jacques (1982); Detection of Yeasts in filamentous -- Fungi in blood cultures during a 10 year period (1972-81) Journal of clinical Microbiology. Vol 16(5). 1968-1970.
6. Brillanda Timothyw (1979). The efficacies of common Dyes -- in primary Isolation media for recovery of Pathogenic fungi. Am. J. Clin. Pathol. 72(5); 868-870.
7. Conant F. Norman. (1972); Micología; Interamericana.
8. Deshmukh S.K. (1985); Degradation of human hair by some dermatophytes and other keratinophilic fungi. MYCOSEN 28(9) -- 463-66.

9. Estrada Camuñez José. Las micosis o fungosis en Medicina y Veterinaria. Ed. Jims.
10. Gip Lennart (1977); A new method for the rapid identification of Pathogenic Fungi on the skin. Current Therapeutic Research; 22(1) 57-64.
11. González Ochoa A. (1963); Epidemiología de las Histoplasmosis primarias en México. Rev. Ins. Salud. Enf. Tropicales - (México); 23; 65-80.
12. González Ochoa A. (1955); Las enfermedades por hongos en México. Rev. Inst. Salub. Enf. Tropicales (México) 15(3) 133-147
13. González Ochoa A. (1969); Las micosis pulmonares en México y centroamerica; Rev. Invest. Salud. Publica (México) 29; -- 179-196.
14. Harris James L. (1936); Modified method for fungal slides culture. Journal of clinical Microbiology. 24(38); 460-461.
15. Hernández M. (1977) Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Publicaciones de la division de nutrición mexicana.

16. Henry K.Nancy (1984) Comparasion of the Roche septi ----
Chek Blood culture Bottles with a brain infusion biphasic
medium bottle and with a tryptic soy broth bottle, Jour--
nal of clinical microbiology. 315-317.
17. Hefherr.(1978) A new technique for the preparation of ---
permanent reference cultures of fungi.Canadian Journal of
Microbiology; 24(10); 1275-1277.
18. IMSS; Boletín Epidemiológico Mensual; (1978);Casos noti--
ficados de padecimientos transmisibles segun años, en la--
población dorechoebiente.Vol.VI No.12.
19. IMSS; Boletín Epidemiológico Mensual;(1984)Casos notifi--
cados de padecimientos transmisibles segun meses 60-61.
20. Keeslem A.(1981) Aminoacida in Dermatophytes under va---
ried substrates.MYKUSEN; 24(7) 444-449.
21. Koneman (1985); Diagnóstico Microbiológico.Ed.Panameric
na.tercera edición 426-468.
22. Koneman (1987); Micología Practica de laboratorio;Ed.Pa---
namericana.Tercera edición.

23. Lennart Gjp. A new method for the rapid identification of-
Pathogenic Fungi on the skin. Current therapeutic research
22(1) 57-64.
24. Lennette (1983) Manual de Microbiología clínica, tercera -
edición. ed. Panamericana; Buenos Aires Argentina; 428-68.
25. Marton G. Balance de nitrógeno en la elaboración del pul-
que tesis del Instituto de Biología. México 1976.
26. Massieu S. (1970) Determination of some essential amino-
acids in several uncooked Mexican Foodstuffs. J. Nutrition--
28; 293-94.
27. McBride B.C. (1966); Oxidative Metabolism of Dermatophytes
Applied Microbiology; 14(6); 973-979.
28. Figueroa M.P (1985) Methods for maintaining stock cultures
Mikosen. 28(3), 134-137.
29. Monroy E. (1967) Valor nutritivo del Xestle. IPN. México, ---
203-214.

30. Kossel D.A.(1983) Quality assurance of selective culture-media for bacteria mould and yeasts: An attempt of standardization at the International level. *Journal of Applied Bacteriology*;54;313-327.
31. Nielsen P.G.(1980) A comparison between direct microscopy and culture in Dermatological, mycotic material, *MYKOSEN* 24(9).555-560.
32. Nielsen P.G.(1982) A simple method to reduce growth of -- contaminants in Routine Mycological Procedure. *MYKOSEN*,25-(7).368-376.
33. Rinaldi Michael G.(1982) Use of potato flakes agar in clinical Mycology. *Journal of clinical microbiology*. Vol 15(6) 1159-1160.
34. Rojo García L.(1987). *Formulación de un medio de cultivo - para bacterias anaerobias a base de pulque*. TESIS ENEP-Zaragoza. México; 18-27.
35. Rose A.(1977) *Microbiología química*. Ed. Alhambra. España.
36. Singh K.V (1981) Growth responses of Keratinophilic fungi to some volatile substances. *MYKOSEN*;630-634.

37. Swanson Gail C.(1982) Novel Approach to transfer and preparation of replicate Micological cultures.Journal of --- clinical Microbiology; 15(2);335-336.
38. Tay Zavala;Introducción a la Micología;ed.Fco.Mendez C.
39. Webster Rod.(1983) Simple staining of bacteria and fungi in hide,skin and Leather.Stain Technology.58(6).315-18
40. Weissmann Gerald.(1967).The action of Polyens Antibiotics on Phospholipid Cholesterol structures.The journal of ---- Biological Chemistry.242(4);616-625.
41. Wright Douglas F. (1968) Toxins produced by Fungi.A.Rev.- Microbiol;22;269-282.